

100583

5100 Gammertshausen 851 Furtth  
Prommer 817080 10  
Telefonnummer 79 72 08



Katharina Kellner

Amplified Fragment Length Polymorphism  
(AFLP) bei Nashörnern  
(*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*,  
*Rhinoceros unicornis*)

Ein Modell  
zum genetischen Wildtiermanagement

SCHÜLING VERLAG



Aus dem Institut für Tierzucht  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München  
Lehrstuhl für Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. habil. M. Förster

**Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)  
bei Nashörnern  
(*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*,  
*Rhinoceros unicornis*):  
Ein Modell zum genetischen Wildtiermanagement**

Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Von  
Katharina Kellner  
aus  
Weil am Rhein

München 2000

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

**Kellner, Katharina:**

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) bei Nashör-  
nern (*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*, *Rhinoceros*  
*unicornis*): Ein Modell zum genetischen Wildtiermanagement /

Katharina Kellner . - Münster : Schöling, 2001

Zugl.: München, Univ., Diss., 2000

ISBN 3-934849-75-X

ISBN 3-934849-75-X



Münster 2001



Evelyn Suerk  
Jan 2001

The only problems that you will fail to conquer  
are the ones that you refuse to face.

(G.G. Lafond)

1. EINLEITUNG.....	1
2. LITERATUR .....	3
2.1 Zur Biologie der Nashörner ( <i>Ceratotherium simum</i> , <i>Diceros bicornis</i> , <i>Rhinoceros unicornis</i> ) .....	3
2.1.1 Geschichte.....	3
2.1.2 Hintergründe für den Rückgang der Nashörner .....	4
2.1.3 Populationsstatus und Systematik der verschiedenen Arten .....	6
2.1.4 Afrikanische Nashörner .....	8
2.1.4.1 Breitmaulnashorn ( <i>Ceratotherium simum</i> ) .....	8
2.1.4.1.1 Unterarten .....	8
2.1.4.1.2 Habitat.....	10
2.1.4.1.3 Reproduktion und Sozialverhalten .....	11
2.1.4.2 Spitzmaulnashorn ( <i>Diceros bicornis</i> ) .....	11
2.1.4.2.1 Unterarten .....	12
2.1.4.2.2 Habitat.....	14
2.1.4.2.3 Reproduktion und Sozialverhalten .....	14
2.1.5 Asiatische Nashörner .....	15
2.1.5.1 Indisches Panzernashorn ( <i>Rhinoceros unicornis</i> ) .....	15
2.1.5.1.1 Habitat.....	15
2.1.5.1.2 Reproduktion und Sozialverhalten .....	16
2.1.6 Zuchtmanagement zur Arterhaltung kleiner Populationen .....	16
2.1.7 Unterscheidung der Unterarten bei afrikanischen Nashörnern .....	18
2.1.8 Untersuchungen zur genetischen Variabilität bei Nashörnern .....	20
2.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	22
2.2.1 Allgemeines zur Methode .....	22
2.2.2 AFLP Reaktion .....	23
2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	25
2.2.4 DNA Fingerprinting.....	25
2.2.5 AFLP Polymorphismen.....	26
2.2.6 Sequenzunabhängige Methoden im Vergleich.....	27
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN .....	29

<b>3.1 Zielsetzung und Problematik</b> .....	29
<b>3.2 Material und Methode</b> .....	31
3.2.1 Problematik der Probenentnahme.....	31
3.2.1.1 Probenentnahme in freier Wildbahn .....	31
3.2.1.2 Probenentnahme im Zoo.....	32
3.2.2 Probenkonservierung .....	33
3.2.3 Probenmaterial und untersuchte Tiere .....	33
3.2.4 DNA Isolierung .....	40
3.2.5 Restriktion.....	41
3.2.6 Ligation .....	43
3.2.7 Präamplifikation .....	44
3.2.8 Selektive Amplifikation.....	46
3.2.8.1 Auswahl der Primer.....	47
3.2.9 Meßgerät .....	50
3.2.10 Auswertung.....	51
3.2.10.1 Dominanz .....	51
3.2.10.2 Codominanz .....	51
3.2.10.3 Programme .....	52
3.2.10.4 Standard.....	52
3.2.11 Populationsgenetische Auswertung .....	55
3.2.11.1 Anzahl der Allele und Allelfrequenz .....	55
3.2.11.2 Genetische Ähnlichkeit und Genetische Distanzen innerhalb und zwischen Arten .....	56
3.2.11.2.1 Eindimensionale Darstellung der genetischen Distanzen.....	58
3.2.11.3 Schätzung der genetischen Variabilität innerhalb der Populationen.....	59
3.2.11.4 Berechnung der Ausschlußwahrscheinlichkeit für den Abstammungsnachweis.....	60
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	64
<b>4.1 Reproduzierbarkeit</b> .....	64
<b>4.2 Ergebnisse der Genotypisierung</b> .....	64
<b>4.3 Anzahl polymorpher Loci</b> .....	72

<b>4.4 Allelfrequenzen</b> .....	74
<b>4.5 Heterozygotiegrade</b> .....	75
<b>4.6 Ergebnisse des Abstammungsnachweises</b> .....	76
<b>4.7 Ähnlichkeit zwischen und innerhalb der Populationen</b> .....	78
<b>4.8 Genetische Distanzen innerhalb der Populationen</b> .....	79
4.8.1 Genetische Distanzen innerhalb der Populationen des Südlichen Breitmaulnashornes .....	81
4.8.2 Genetische Distanzen innerhalb der Population des Nördlichen Breitmaulnashornes .....	86
4.8.3 Genetische Distanzen innerhalb der Population des Spitzmaulnashornes.....	87
4.8.4 Genetische Distanzen innerhalb der Population des Indischen Panzernashornes .....	90
<b>4.9 Genetische Distanzen zwischen den Populationen</b> .....	90
<b>5. DISKUSSION</b> .....	93
<b>5.1 Beurteilung der Methode AFLP für die Anwendung bei Wildtieren</b> .....	93
<b>5.2 Variabilität innerhalb der Populationen</b> .....	95
<b>5.3 Unterscheidung zwischen Arten und Unterarten</b> .....	99
<b>5.4 Schlußbetrachtung und Folgerungen für die Strategie der Erhaltungszucht     von Nashörnern und anderen Wildtieren</b> .....	102
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	105
<b>7. SUMMARY</b> .....	108
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	111
<b>9. ANHANG</b> .....	119
<b>9.1 Bezugsquellen für Chemikalien, Enzyme und Material</b> .....	119
<b>9.2 Übersicht über das Probenmaterials</b> .....	123
<b>9.3 Darstellung der Rohdaten</b> .....	133
<b>9.4 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b> .....	144

## 1. Einleitung

Durch Zerstörung ihres Lebensraumes und durch Wilderer sind inzwischen viele Tierarten sehr stark dezimiert worden und vom Aussterben bedroht. Hierzu gehören auch die verschiedenen Arten der afrikanischen (*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*) und asiatischen Nashörner (*Rhinoceros unicornis*).

Um die wenigen verbleibenden Tiere dieser bedrohten Arten und ihre genetische Vielfalt auch für zukünftige Generationen erhalten zu können, reicht es nicht aus, nur ihren Lebensraum zu schützen, sondern der Mensch muß nun auch mit gezielten Zuchtprogrammen eingreifen, da die Populationen in den meisten Fällen so klein und weit von einander entfernt sind, daß ein natürliches Zu- und Abwandern von Tieren aus anderen Populationen und somit ein genetischer Austausch nicht mehr stattfinden kann. Da bei Wildtieren die Verwandtschaftsverhältnisse vielfach unbekannt sind und auch bei vielen Wildfängen in Tierparks nicht genau bekannt ist, aus welcher Gegend sie stammen und ob sie mit anderen Nashörnern vielleicht schon sehr nahe verwandt sind, kann ein genetischer Nachweis für ein sinnvolles Zuchtmanagement eine große Hilfe sein, um Inzucht sowie Verlust von genetischer Variabilität zu vermeiden, da sonst die Anpassungsfähigkeit der Populationen an verschiedene Umweltfaktoren sinken würde.

Dies war der Anlaß für die vorliegende Arbeit, in der daran gearbeitet wurde, ein gendiagnostisches Verfahren zur Abstammungs- und Identitätskontrolle für Wildtiere am Beispiel der Nashörner zu entwickeln. Es soll die Frage geklärt werden, wie groß die genetische Variabilität innerhalb der untersuchten Nashorn-Arten und -Unterarten überhaupt noch ist und wie viel Inzucht bereits vorhanden ist. Weiter sollen mehr Informationen über die Populationsstruktur gesammelt werden und der Versuch der Entwicklung eines Abstammungsnachweises für Einzeltiere unternommen werden. Dieser Abstammungsnachweis soll am Beispiel einer Population Südlicher Breitmaulnashörner von einer Wildtierfarm in Südafrika durchgeführt werden.

Für eine Umsiedelung von Tieren muß auch geklärt werden, ob es sich bei den teilweise geographisch sehr weit voneinander entfernten Populationen morphologisch und genetisch gesehen um Unterarten handelt oder um Einheiten, die nicht vermischt werden sollten. In der folgenden Arbeit wird untersucht, ob mit Hilfe von AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) zwischen den Arten

Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*), Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis*) und Panzernashorn (*Rhinoceros unicornis*) unterschieden werden kann, sowie zwischen den beiden Unterarten Nördliches und Südliches Breitmaulnashorn und einer Zoo- und Wildpopulation des Südlichen Breitmaulnashornes.

Da nur sehr wenige DNA Sequenzen beim Nashorn bekannt sind, wie dies bei den meisten Wildtieren der Fall ist, mußte eine Methode gefunden werden, die sequenzunabhängig ist. Es wurde versucht, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) als eine neue Methode der genetischen Abstammungssicherung für Nashörner zu etablieren. Da für dieses Verfahren genomische DNA benötigt wird, mußten Methoden der Probenentnahme beim Nashorn gefunden werden, die es ermöglichten, Blut- oder Gewebeproben zu entnehmen, ohne das Tier extra zu anästhesieren.

Das Nashorn steht als Symbol für viele andere bedrohte Tierarten und ist auch das Symboltier des Europäischen Erhaltungszuchtprogrammes (EEP). Diese Arbeit soll ein neuer Beitrag zur Arterhaltungszucht bedrohter Wildtiere sein.

Sie entstand in Zusammenarbeit mit den dem EEP angeschlossenen Zoologischen Gärten, den Zuchtbuchhaltern und Koordinatoren des EEP, sowie in Zusammenarbeit mit Thaba Tholo Game Farm in Südafrika. Weiter steht diese Arbeit im Gesamtrahmen eines umfassenden Forschungsprojektes über Breitmaulnashörner, in dem unter anderem in einer anderen Doktorarbeit das Reproduktions- und Revierverhalten untersucht wird. Diese wildbiologischen Daten geben zusammen mit einem genetischen Abstammungsnachweis mehr Informationen über die Populationsstruktur beim Breitmaulnashorn und sind somit wichtige Anhaltspunkte für Umsiedelungsprojekte.

## 2. Literatur

### 2.1 Zur Biologie der Nashörner (*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*, *Rhinoceros unicornis*)

#### 2.1.1 Geschichte

Nashörner und ihre sehr unterschiedlichen Vorfahren existieren schon seit über 50 Millionen Jahren. Der früheste Vorfahre der Nashörner heißt *Hyrachyus*. Er lebte vor 45 bis 50 Millionen Jahren in Nordamerika und Europa und hatte noch kein Horn. Wie man anhand von Skelettfunden nachweisen kann, liefen die Vorfahren der Nashörner alle auf 3 Zehen und zählen damit, wie alle heute noch lebenden Nashörner, Tapire und Pferdeartige, zu den Unpaarhufern. In der Vergangenheit gab es sehr viele verschiedene Arten von Nashörnern, darunter das größte bisher lebende Landsäugetier, das hornlose, graffenartige *Indricotherium*, das vor ca. 37 bis 32 Millionen Jahren in Mittel- und Zentralasien lebte und eine Widerristhöhe von 5,5 Metern erreichte. Das Wollnashorn (*Coelodonta antiquitatis*) lebte noch vor ca. 25.000 Jahren in den Steppen Europas (Groves, 1997; Wiesner & Mattei, 1998). Vor etwa 40 Millionen Jahren waren Nashörner auch in Nordamerika sehr häufig vorkommende Pflanzenfresser, die durch einen dramatischen Klimawechsel vor ca. 4 Millionen Jahren, zusammen mit den meisten anderen großen Säugetieren ausstarben. Die noch heute existierenden Spitzmaulnashörner (*Diceros*) kamen vor 10 Millionen Jahren nicht nur in Afrika, sondern auch in Spanien, Italien und Griechenland vor, während die Breitmaulnashörner (*Ceratotherium*) erst vor ca. 7 Millionen Jahren auftraten und dem Anschein nach auf den afrikanischen Lebensraum beschränkt blieben. Man schätzt, daß die Trennung zwischen den beiden gemeinsamen Vorfahren der heute noch lebenden afrikanischen Arten *Diceros bicornis* und *Ceratotherium simum* vor ca. 4 Millionen Jahren stattgefunden hat, während die Trennung von afrikanischem und asiatischem Nashorn ca. 6 Millionen Jahre zurückliegt (Merenlender et al., 1989; Prothero, 1991).

Heute sind weltweit nur noch 5 Arten übrig geblieben, davon 3 Arten in Asien und 2 Arten in Afrika. Die Ausrottung dieser Arten setzte schon im letzten Jahrhundert ein und so galten die Breitmaulnashörner (*Ceratotherium simum*) in Afrika und die Indischen Panzernashörner (*Rhinoceros unicornis*) in Asien bereits am Anfang des

20. Jahrhunderts beinahe als ausgestorben (Ashley et al., 1990; Baur et al., 1995). Im Jahre 1895 wurden im Umfolozi/Hluhluwe Nationalpark in Südafrika nur noch 20 Breitmaulnashörner gezählt, im Jahr 1929 war nur noch ein Bestand von ca. 100 Tieren vorhanden (Walker, 1994; Emslie & Adcock, 1997, S. 196). Man schätzt, daß der Bestand der Indischen Panzernashörner zeitweise ebenfalls weniger als 100 Tiere betrug (Laurie, 1982). Im Jahre 1961 wurden noch 300 Tiere gezählt (Laurie, 1997). Doch Dank wirkungsvoller Schutzmaßnahmen konnten sich die Bestände bis zum 2. Weltkrieg wieder etwas erholen. Danach nahm vor allem in den Jahren 1970 bis 1980 die Zahl der Wilderer wieder drastisch zu. Besonders dramatisch stellt sich hier der Rückgang der Spitzmaulnashörner (*Diceros bicornis*) dar, die von einem geschätzten Bestand von 60.000 Tieren 1970 auf einen Bestand von heute ca. 2.600 Tieren reduziert wurden (Foose, 1996) (Tabelle 1 und Bild 2). Aber auch alle anderen Arten stehen am Rande der Ausrottung und es wird insgesamt weltweit nur noch ein Bestand von ca. 12.500 Tieren in freier Wildbahn geschätzt, wovon allein die Hälfte sich aus einer einzigen Unterart, den Südlichen Breitmaulnashörnern (*Ceratotherium simum simum*) zusammensetzt, deren Bestand sich wieder sehr gut erholt hat und die heute auf einen Bestand von über 8.000 Tieren geschätzt werden (Tabelle 1 und Bild 1) (International Rhino Foundation, 1999).

### 2.1.2 Hintergründe für den Rückgang der Nashörner

Das Nashorn steht als Sinnbild für Kraft und Unbesiegbarkeit, jedoch wurde ihm gerade dieser Vergleich zum Verhängnis. Schon in der Mitte des 19. Jahrhunderts kam die Jagd auf Großwild in Afrika in Mode. Zusätzlich zur Bejagung hatte die europäische Besiedlung des afrikanischen Kontinents zur Folge, daß sowohl natürlicher Lebensraum verschwand, als auch Nashörner zum Schutz der bewohnten Gebiete auf staatlichen Geheiß abgeschossen wurden (Meister & Owen-Smith, 1997). Auch die asiatischen Nashörner verloren durch die zunehmende Besiedelung und Reisanbau in den für sie notwendigen Feuchtgebieten ihren Lebensraum. Dies erleichterte die Jagd auf sie, da keine Verstecke im hohen Gras und in den Wäldern mehr vorhanden waren, so daß die Bestände Anfang dieses Jahrhunderts schon sehr stark dezimiert waren (Laurie, 1997).

Auch in heutiger Zeit ist der starke Rückgang der Nashornpopulationen nicht nur durch den Verlust ihres Lebensraumes bedingt, sondern auch durch Wilderei.

Wilderer beliefern vor allem 2 große Märkte im arabischen und asiatischen Kulturkreis, einerseits den Nordjemen, Oman und die Vereinigten Arabischen Emirate, wo aus dem Horn Dolchgriffe geschnitzt werden, die als Statussymbol gelten und andererseits Asien, wo das Horn vielfältig in der Volksmedizin eingesetzt wird. Pulver und Elixiere aus Nashorn werden schon seit über 2000 Jahren in der traditionellen chinesischen Medizin zur Behandlung lebensbedrohlicher Fieberzustände und anderer Krankheiten eingesetzt. Eine antipyretische Wirkung konnte bisher pharmakologisch jedoch nicht nachgewiesen werden (Ashley et al., 1990; Emslie & Adcock, 1997, S. 205-207; Neuschulz & Meister, 1998). Im asiatischen Raum hat sich teilweise auch der Aberglaube gehalten, daß pulverisiertes Nashorn potenzfördernde Wirkung hat, obwohl auch dies wissenschaftlich widerlegt wurde. Die Ursache für diese Annahme liegt wohl im Deckakt der Nashörner, der z. B. beim Panzernashorn bis zu einer Stunde dauern kann. Auch in Indien werden Haut, Knochen, Haare und nahezu alle Organe des Nashornes in der Volksmedizin für die verschiedensten Krankheitsbilder benutzt (Penny, 1988; Wiesner & Mattei, 1998).



### 2.1.3 Populationsstatus und Systematik der verschiedenen Arten

Von den 5 heute noch lebenden Arten leben 3 Arten in Asien, das Indische Panzernashorn (*Rhinoceros unicornis*), das Java Nashorn (*Rhinoceros sondaicus*) und das Sumatra Nashorn (*Dicerorhinus sumatrensis*). In dieser Studie wird jedoch nur das Indische Panzernashorn berücksichtigt, da nur dieses in europäischen Zoos gehalten wird. Die Indischen Panzernashörner konnten sich von einem geschätzten Bestand von nur noch ca. 200 Tieren um die Jahrhundertwende durch Schutzmaßnahmen wieder soweit erholen, daß der Bestand heute über 2.000 Tiere beträgt (Tabelle 1 und Bild 3).

Die 2 in dieser Studie verwendeten afrikanischen Nashornarten sind das Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis*) und das Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*). Das Spitzmaulnashorn besitzt 4 Unterarten, die sich vor allem morphologisch und geographisch unterscheiden lassen, *Diceros bicornis bicornis*, *minor*, *microchaeli* und *longipes*. Sein Bestand hat allein in den letzten 10 Jahren um 85 % abgenommen und ist von einem geschätzten Bestand von 60.000 Tieren 1970 auf einen Bestand von ca. 2.600 Tieren heute reduziert worden (Tabelle 1 und Bild 2). Das Breitmaulnashorn besitzt 2 Unterarten, *Ceratotherium simum simum* und *cottoni*, von denen das Nördliche Breitmaulnashorn (*C.s. cottoni*) mit nur noch ca. 29 verbleibenden Tieren weltweit die am meisten bedrohte Unterart ist, während das Südliche Breitmaulnashorn (*C.s. simum*) inzwischen mit beinahe 8.500 Tieren den größten Bestand aufweist (Tabelle 1 und Bild 1). Diese Unterarten werden als so unterschiedlich betrachtet, daß sie als separate Arten erhalten werden sollten, was in Anbetracht der kleinen Anzahl von Tieren oft sehr problematisch ist (Foose, 1996; International Rhino Foundation, 1999).

**Tabelle 1: Weltweiter Bestandszahlen der Nashörner:**

Art oder Unterart	geschätzte Population in der Wildnis (1997)	Weltweit in Gefangenschaft gehaltene Population (1997)	Anzahl der vorliegenden Proben in der Studie
Spitzmaulnashorn ( <i>Diceros bicornis</i> ) gesamt	ca. 2.600	240	20
Südwestafrikanisches Spitzmaulnashorn ( <i>Diceros bicornis bicornis</i> )	741	0	0
Nordwestafrikanisches Spitzmaulnashorn ( <i>Diceros bicornis longipes</i> )	ca. 10	0	0
Ostafrikanisches Spitzmaulnashorn ( <i>Diceros bicornis michaeli</i> )	485	180	20
Südafrikanisches Spitzmaulnashorn ( <i>Diceros bicornis minor</i> )	1.363	60	0
Breitmaulnashorn ( <i>Ceratotherium simum</i> ) gesamt	ca. 8.465	ca. 660	131
Nördliches Breitmaulnashorn ( <i>Ceratotherium simum cottoni</i> )	ca. 25	9	5
Südliches Breitmaulnashorn ( <i>Ceratotherium simum simum</i> )	ca. 8.440	ca. 650	126
Indisches / Nepalesisches Panzernashorn ( <i>Rhinoceros unicornis</i> )	ca. 2.050	130	6
Java Nashorn ( <i>Rhinoceros sondaicus</i> )	< 70	0	0
Sumatranashorn ( <i>Dicerorhinus sumatrensis</i> )	< 400	17	0

Quelle: IUCN/SSC African & Asian Rhino Specialist Groups & T.J. Foose, International Rhino Foundation – Stand: Juli 1998 (International Rhino Foundation, 1999)



#### Nördliches Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum cottoni*):

Seine historische Verbreitung erstreckte sich nur vom Nördlichen Uganda über den Südlichen Sudan, Nordwesten des Zaire (heute Demokratische Republik Kongo) und westlich in die Zentralafrikanische Republik hinein (Pienaar, 1994). Als es am Anfang des 20. Jahrhunderts zum ersten Mal beschrieben wurde, gab es wahrscheinlich noch Tausende von Nördlichen Breitmaulnashörnern und nur sein Südlicher Verwandter war stark bedroht (Hillman-Smith, 1997). Sogar noch im Jahre 1960 waren die Nördlichen Breitmaulnashörner noch häufiger als die Südlichen Breitmaulnashörner (Emslie & Adcock, 1997, S. 197). Heute kommt diese Unterart nur noch im Garamba Nationalpark in der Demokratischen Republik Kongo vor (Bild 1). Der Bestand von ehemals 29 Tieren ist durch den Bürgerkrieg noch weiter dezimiert worden und man schätzt, daß es heute in freier Wildbahn weniger als 25 Tiere gibt. Weitere 5 Tiere stehen im Tierpark Dvur Kralove in Tschechien und 4 Tiere im Zoo von San Diego, USA (Gölthenboth & Ochs, 1999). Hiermit handelt es sich um die am meisten bedrohte Unterart des Nashornes weltweit. Für kommende Generationen wird diese Unterart wohl nicht mehr erhalten werden können. Das Erscheinungsbild unterscheidet sich vom Südlichen Breitmaulnashorn durch kleinere Backenzähne, andere Körperproportionen und einen oberseits fast geraden Schädel (Neuschulz & Meister, 1998; International Rhino Foundation, 1999).

##### 2.1.4.1.2 Habitat

Das Breitmaulnashorn lebt in Kurz- und Langgras-Savannen und ist ein reiner Weidegänger, der relativ ortstreu ist und in individuellen Futterstreifgebieten lebt. Während der Regenzeit bevorzugt es eher kurzes Gras, während es in der Trockenzeit auch auf mittleres bis langes Gras ausweicht. Es ist auf Wasserstellen zum Trinken und Suhlen angewiesen und braucht Schattenplätze während der Hitze des Tages (du Toit, 1994; Pienaar, 1994; Meister & Owen-Smith, 1997).

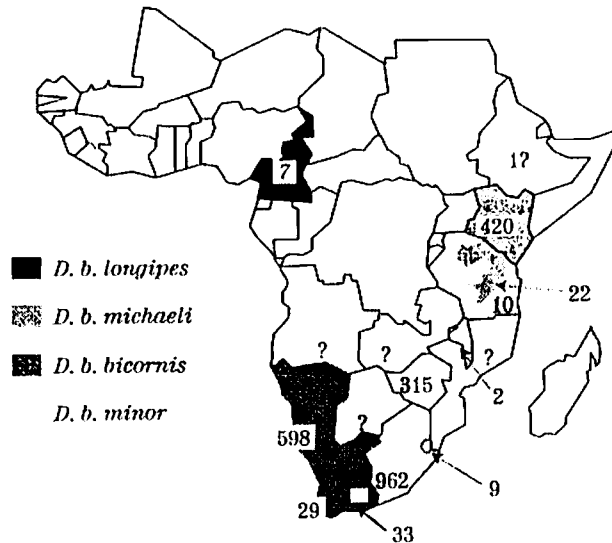
##### 2.1.4.1.3 Reproduktion und Sozialverhalten

Breitmaulnashörner leben in kleinen, nicht sehr stabilen Verbänden, die aus einem territorialen Bullen, untergeordneten Bullen, Kühen verschiedener Altersgruppen und Kälbern bestehen können. Die Futterstreifgebiete von Kühen können mit anderen Gruppen weiblicher Tiere überlappen und sie können sich auch über mehrere Bullenterritorien erstrecken. Die Größe des zentralen Streifgebietes der Weibchen liegt hier je nach Nahrungs- und Wasserangebot ungefähr bei 6,7 km<sup>2</sup>. Die Bullen verteidigen ihr Revier, das im Durchschnitt 1,65 km<sup>2</sup> groß ist und das gegen andere Territorien von Bullen abgegrenzt ist, sie dulden jedoch untergeordnete Bullen in ihrem Gebiet. Der Aufenthaltsort der weiblichen Tiere scheint vorwiegend vom Futter und Wasserangebot abzuhängen, so daß für den Bullen und seinen Fortpflanzungserfolg die Attraktivität seines Reviers entscheidend ist. Weibliche Tiere werden mit ca. 7 Jahren geschlechtsreif, Bullen mit ca. 10 bis 12 Jahren. Die Tragzeit beträgt ca. 16 Monate bei einer Zwischenkalbezeit von 2 bis 3 Jahren (du Toit, 1994; Bertschinger, 1994; Meister & Owen-Smith, 1997; International Rhino Foundation, 1999).

##### 2.1.4.2 Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis*)

Die Spitzmaulnashörner verdanken ihren Namen einer fingerartig ausgebildeten Oberlippe, die als Greiforgan für die bevorzugte Blätternahrung dient. Sie werden auch als Schwarze Nashörner bezeichnet, obwohl diese Bezeichnung irreführend ist, da sie in ihrem Erscheinungsbild keineswegs schwarz sind, sondern von grau bis graubraun variieren. Man nimmt an, daß diese Bezeichnung als Gegensatz zum falsch benannten Weißen Nashorn gewählt wurde oder daß der Name daher kommt, daß es nach dem Suhlen im Schlamm fast schwarz aussieht (Neuschulz & Meister, 1998). Es ist, wie fast alle Nashörner, beinahe haarlos. Die wissenschaftliche Bezeichnung *Diceros* ist griechisch und bezieht sich ebenso wie die lateinische Bezeichnung *bicornis* auf die beiden Hörner, beides heißt übersetzt „Zweihorn“. Mit einer Schulterhöhe von 1,4 bis 1,7 Metern und einem Gewicht von 800 bis 1.350 Kilogramm ist es kleiner und leichter als das Breitmaulnashorn (Foose, 1996; International Rhino Foundation, 1999).

**Bild 2: Verbreitungsgebiete des Spitzmaulnashornes früher und heute:**



Zahl der Spitzmaul-Nashörner nach Ländern

(aus Adcock & Emslie, 1997)

#### 2.1.4.2.1 Unterarten

Spitzmaulnashörner verschiedener Vorkommensgebiete in Afrika unterscheiden sich geringfügig im Körperbau und in ihrer Lebensweise, genetisch bestehen jedoch nur sehr geringe Unterschiede. Trotz der geographischen Unterschiede sind Unterarten schwer abzugrenzen (Groves, 1997) und man nimmt an, daß es sich um sogenannte Ökotypen handelt (Adcock & Emslie, 1997). Historisch gesehen lebten die Spitzmaulnashörner in einem großen, ehemals zusammenhängenden Gebiet, so daß gemeinsame Vorfahren wahrscheinlich sind (Bild 2).

##### Südwestliches Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis bicornis*):

Sein heutiges Vorkommensgebiet ist Südafrika und Namibia. Es ist gut an trockene bis wüstenhafte Lebensbedingungen angepaßt (Bild 2).

##### Nordwestliches Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis longipes*):

Sein Bestand wird auf weniger als 10 Tiere in Kamerun geschätzt (Bild 2).

##### Östliches Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis michaeli*):

Sein Hauptgebiet liegt heute in Kenia, einige Populationen bestehen jedoch auch in Südafrika und Tansania. In der hier vorliegenden genetischen Verwandtschaftsstudie wurden nur Proben dieser Unterart untersucht (Bild 2).

##### Südliches Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis minor*):

Diese Unterart ist mit einem Bestand von ca. 1.300 Tieren am häufigsten. Die größten Populationen leben in Südafrika und Simbabwe. Es kommen jedoch auch Tiere dieser Unterart in Tansania, Swaziland und Malawi vor. Eventuell befinden sich auch noch Tiere in Angola, Botswana, Mozambique und Sambia. Es ist vom Körperbau her etwas kleiner als die anderen Unterarten (Bild 2).

(Adcock & Emslie, 1997; Bestandszahlen: International Rhino Foundation, 1999)

#### 2.1.4.2.2 Habitat

Der Lebensraum des Spitzmaulnashornes ist vielfältig und reicht von Dornbusch-savannen, verbuschten Wüstenrändern bis hin zu lichten Galeriewäldern. Es kommt in Gegenden auf Meereshöhe vor und in Ostafrika auch auf einer Höhe von bis zu 2.700 Metern. Es frisst vor allem Blätter von Büschen und jungen Bäumen. Auf den regelmäßigen Zugang zu Wasserstellen ist es angewiesen (du Toit, 1994; Neuschulz & Meister, 1998).

#### 2.1.4.2.3 Reproduktion und Sozialverhalten

Spitzmaulnashörner leben vorwiegend tagaktiv und sie sind nicht sehr gesellig. Sie durchstreifen angestammte Gebiete, die sich mit denen anderer Artgenossen überlappen können. Obwohl die Bullen im strengen Sinn nicht territorial sind, kann es dennoch zu Kämpfen mit anderen Bullen kommen, um diese aus ihrem Gebiet zu vertreiben. Die Auswahl der Streifgebiete richtet sich vor allem nach Wasser- und Nahrungsangebot, sowie nach Deckungsmöglichkeiten. Jungtiere bleiben bei der Mutter, bis zur Geburt des nächsten Kalbes. Männliche Tiere leben vorwiegend solitär, dulden normalerweise jedoch untergeordnete Bullen in ihrem Gebiet. Beim Paarungsverhalten kann es auch zwischen dem werbenden Männchen und dem Weibchen zu Kämpfen kommen. Spitzmaulnashörner werden mit ca. 7 Jahren geschlechtsreif. Das durchschnittliche Alter bei der ersten Geburt liegt bei D.b. *minor* und *michaeli* bei 7 bis 9 Jahren, bei D.b. *bicornis*, das in ariden Gebieten lebt, sogar erst bei 9 bis 10 Jahren. Gewöhnlich bleiben die Kälber mindestens 2 bis 4 Jahre bei ihrer Mutter. Gegen Ende der Trächtigkeit verjagt das Weibchen das vorige Kalb, nach der Geburt darf es aber wieder mitlaufen. Die Tragzeit beträgt 15 bis 16 Monate bei einer Zwischenkalbezeit von 2,5 bis 4 Jahren. Bullen pflanzen sich abhängig von ihrer Rangposition erst im Alter von 10 bis 15 Jahren fort (du Toit, 1994; Adcock & Emslie, 1997; International Rhino Foundation, 1999).

### 2.1.5 Asiatische Nashörner

#### 2.1.5.1 Indisches Panzernashorn (*Rhinoceros unicornis*)

Seinen Namen verdankt es seinen dicken, bräunlich bis grauen, panzerartigen Hautfalten, welche mit nietenartigen Warzen besetzt sind. Beim Männchen sind diese Hautfalten dicker, breiter und mehr gefaltet, als beim Weibchen. Sie dienen als Schutz vor Verletzungen bei Kämpfen und betonen die darunterliegende Muskulatur. Dennoch kann es bei Kämpfen durch die bis zu 20 cm langen Schneidezähne zu erheblichen Verletzungen und sogar zu Todesfällen kommen. Das Panzernashorn wird nach seinem Verbreitungsgebiet auch Indisches oder nepalesisches Nashorn genannt. Einstmals war es vom Indus bis Nordburma verbreitet (Bild 3). Da es aber in denselben Gebieten lebt, in denen auch Reispflanzen wachsen, wurden viele ihrer Lebensräume durch menschliche Besiedlung zerstört. Inzwischen kommt es nur noch in einigen Schutzgebieten in Nordindien, Nepal und Bhutan vor (Laurie, 1997). Seine wissenschaftliche Bezeichnung *Rhinoceros* leitet sich aus den beiden griechischen Worten „rhino“, welches Nase, und „ceros“, welches Horn bedeutet, ab. Der Zusatz „unicornis“ ist lateinisch und kann mit „Einhorn“ übersetzt werden. Beide Geschlechter besitzen jeweils nur ein einziges ca. 15 bis 45 cm langes Horn. Mit einer Größe von ca. 1,7 bis 2,0 Metern und einem Gewicht von 1.800 bis 2.200 Kilogramm ist es bei weitem das größte asiatische Nashorn (Foose, 1996; International Rhino Foundation, 1999).

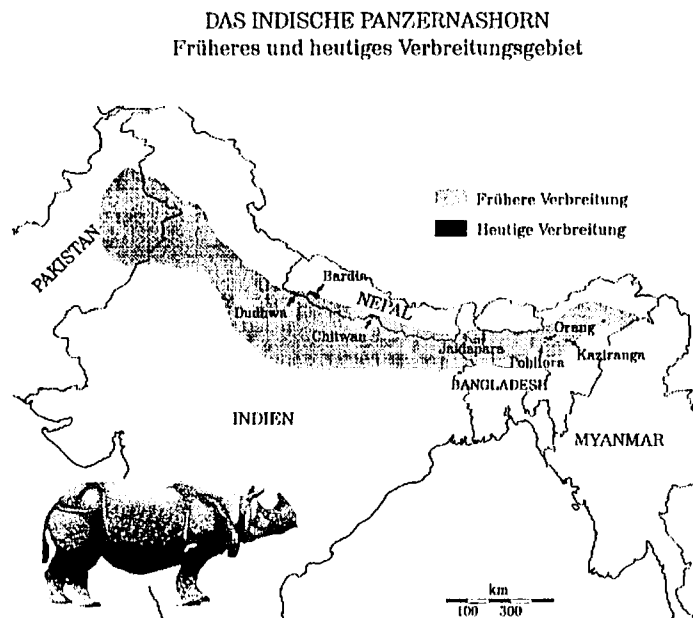
#### 2.1.5.1.1 Habitat

Das Indische Panzernashorn bewohnt mit Gras bewachsene Überschwemmungsgebiete und Flußuferwälder in den Hügelregionen am Fuß des Himalaya. Es ist überwiegend tagaktiv und ernährt sich von Sumpfpflanzen, Früchten, Gras und Blättern, welche mit seinen beweglichen Oberlippen ergriffen werden (Laurie, 1997; Neuschulz & Meister, 1998).

### 2.1.5.1.2 Reproduktion und Sozialverhalten

Panzernashörner können beim Grasens oder Schlambaden zwar lockere Verbände von bis zu 20 Tieren bilden, normalerweise leben sie jedoch als Einzelgänger und es wird nur zwischen Kalb und Kuh eine sehr enge Beziehung ausgebildet. Bullen halten keine Reviere, sondern haben überlappende Streifgebiete und Rangordnungen. Die Werbung der Panzernashorn-Bullen um eine Kuh kann sehr gewalttätig sein und es kommt vor der Paarung zu Kämpfen, bei denen manchmal sogar Kühe getötet werden. Die Tragzeit beträgt 15 bis 16 Monate, bei einer Zwischenkalbezeit von ca. 3 Jahren. Das Kalb bleibt in der Regel 3 bis 4 Jahre bei der Mutter und wird kurz vor der Geburt des nächsten Kalbes von der Mutter vertrieben. Weibchen werden im Alter von 5 bis 7 Jahren geschlechtsreif, Bullen erst im Alter von ca. 10 Jahren, sie kommen aber kaum vor 15 Jahren zur Fortpflanzung (Laurie, 1997; International Rhino Foundation, 1999).

**Bild 3: Verbreitungsgebiete des Indischen Panzernashornes früher und heute:**



(aus Laurie, 1997)

### 2.1.6 Zuchtmanagement zur Arterhaltung kleiner Populationen

Eines der Hauptziele der Erhaltungszucht ist es, den natürlichen Grad der genetischen Diversität und somit das evolutionsbedingte Potential einer Population zu erhalten.

Durch Wilderei und den Verlust ihres Lebensraumes sind die ehemals großen Nashornpopulationen inzwischen sehr klein und weit von einander entfernt, so daß ein intensives Zuchtmanagement für das Überleben der Arten nötig ist, da besonders kleine, isolierte Populationen Gefahr laufen, ihre genetische Variabilität zu verlieren und durch Inzuchtdepression Schaden nehmen. In kleinen Populationen gleichen sich die Genotypen der einzelnen Individuen mehr und mehr an, wobei einzelne Allele fixiert werden und andere für diese Population verloren gehen. Die Frequenz homozygoter Tiere steigt, d. h. der Heterozygotiegrad sinkt. Dies hat zur Folge, daß auch rezessive Defektgene phänotypisch in Erscheinung treten können und daß somit durch Inzucht die Überlebens- und Reproduktionsrate sinken kann (Falconer, 1984). So konnte z. B. für Kälber beim Indischen Nashorn mit einem Inzuchtkoeffizienten über 0,25 eine vermehrte Sterblichkeit im Jugendalter festgestellt werden (Baur & Studer, 1995). Auch beim Geparden, dessen Population erst in jüngster Zeit durch einen gravierenden Flaschenhals ging und von dem gesagt wird, daß seine genetische Variabilität inzwischen etwa zehn bis hundertfach geringer ist als bei anderen Säugetierarten, wird eine erhöhte Sterblichkeit der Jungtiere, vermehrt abnormale Spermato-genese und eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen beschrieben (O'Brian, 1985). Für das Przewalski-Pferd, das in freier Wildbahn bereits ausgestorben war, wird ebenfalls von Inzuchtproblemen berichtet (Bouman & Bos, 1979). Dies zeigt, daß eine Population um so empfindlicher gegenüber Umwelteinflüssen reagiert, je kleiner sie ist, da mit einer reduzierten genetischen Vielfalt auch die Anpassungsfähigkeit an Umweltveränderungen sinkt (Foose, 1991). Vielfach reduziert eine geringe Populationsdichte die Möglichkeit für ein Männchen, ein weibliches Tier zu finden, mit dem es sich paaren kann, da beispielsweise der Östrus beim Nashorn nur 1 bis 2 Tage dauert (Ashley et al., 1990). Aufgrund dieser Probleme muß eine Erhaltungsstrategie für Tierarten, die schon sehr stark in ihrer Zahl dezimiert sind, darauf basieren, überlebensfähige Populationen zu erhalten, d. h. Populationen, die groß genug sind und über verschiedene Gebiete verteilt sind (Minimum Viable Population Concept). Eine

Mindestgröße der Population, die das Überleben sichert, gibt es hier jedoch nicht. Sie hängt von verschiedenen umweltbedingten, genetischen und biologischen Faktoren ab, sowie von der Populationsstruktur. So wird eine Restpopulation von 13 Schwarzen Nashörnern im Ngorongoro Krater von Moehlmann et al. (1996) als sehr kritisch bezeichnet, wohingegen sich eine Population von 16 wieder- ausgewilderten Schwarzen Nashörnern im Ndumu Wildpark sehr gut vermehrt (Conway, 1989). Beide Autoren empfehlen jedoch die effektive Populationsgröße durch die Auswilderung von neuen Tieren zu erhöhen, um somit der Gefahr der reduzierten genetischen Variation innerhalb dieser sehr kleinen Populationen zu begegnen. Unter der effektiven Populationsgröße  $N_e$  versteht man die Anzahl von Zuchtindividuen, welche in einer realen Population die gleiche Inzuchtsteigerung verursachen würde, wie in einer gleich großen idealisierten Population. Wenn die Zuchtstruktur bekannt ist, kann die effektive Populationsgröße aus der tatsächlichen abgeleitet werden, nicht züchtende Tiere werden hier also nicht gezählt (Falconer, 1984; Gansloßer, 1998). Bei einer Umsiedelung von Tieren sollte jedoch darauf geachtet werden, auf bestimmte Gebiete spezialisierte Populationen und Unterarten getrennt zu erhalten, auch wenn dies teilweise sehr umstritten ist. Eine Theorie zur Erhaltung von kleinen Populationen ist es, die Tiere in geschützte Gebiete zu bringen und durch Translokationen für genetischen Austausch zu sorgen, indem man viele kleine Populationen in verschiedenen Gebieten verwaltungstechnisch zu einer großen Population (Metapopulation) zusammenfaßt, um somit die Überlebenschancen aller zu optimieren. In dieses genetische Zuchtmanagement können sowohl Populationen in freier Wildbahn, als auch in Gefangenschaft miteinbezogen werden (Foose, 1991; Price, 1991; Conway, 1995).

### 2.1.7 Unterscheidung der Unterarten bei afrikanischen Nashörnern

Eine Strategie zur Erhaltung des afrikanischen Nashornes basiert auf der Errichtung von Nashorn-Schutzgebieten, in denen sich der Tierbestand wieder erholen kann. Hier stellt sich aber die Frage, ob in diesen Schutzgebieten nur die vorhandene Population gehalten wird oder ob sie mit Tieren aus anderen Populationen aufgestockt werden soll. Hierfür muß jedoch geklärt werden, ob es sich bei den existierenden, geographisch weit verstreuten Populationen um Unterarten handelt,

die sich in ihrer Abstammung und Morphologie so sehr voneinander unterscheiden, daß man sie als getrennte Einheiten behandeln sollte (George et al., 1991).

Diese Unterscheidung ist besonders beim Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis*) schwierig. Hier wird die Einteilung der Unterarten und die separate Erhaltung der inzwischen sehr kleinen Populationen immer noch diskutiert, da sich verschiedene geographisch getrennte Populationen zwar teilweise morphologisch sehr stark unterscheiden, genetisch jedoch nur eine sehr geringe Variabilität vorhanden ist. Nach Vermessung von Nashornschädeln beschreibt Groves (1991) z. B. noch 8 Unterarten beim Schwarzen Nashorn, während Cohn (1990) je nach zitiertem Autor von 6 oder 7 Unterarten berichtet. Bei Foose (1996) oder dem International Rhino Trust Fund (1999) werden nur noch die 4 Unterarten *Diceros bicornis minor*, *bicornis*, *michaeli* und *longipes* genannt.

Untersuchungen an mitochondrialer DNA bei Tieren der 2 Unterarten des Schwarzen Nashornes *Diceros bicornis minor* und *michaeli* zeigten, daß zwischen diesen beiden Arten eine sehr enge Verwandtschaft besteht und daß sie vermutlich noch vor ca. 100.000 Jahren dieselben Vorfahren hatten. Zwischen Tieren der Unterarten *Diceros bicornis minor* aus Simbabwe und Südafrika konnte nicht differenziert werden (Ashley et al., 1990; Amato et al., 1991). Harley & O'Ryan (1991) kamen anhand von RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Untersuchungen an mitochondrialer DNA der Unterart *Diceros bicornis bicornis*, *michaeli* und *minor* und O'Ryan et al. (1994) anhand von Restriktionsenzymchnittstellen zu ähnlichen Schlüssen. Hier zeigten sich innerhalb der Unterarten kaum Unterschiede, wie dies auch von O'Ryan & Harley (1993) schon beschrieben wurde. Nur 3 Restriktionsenzyme zeigten Polymorphismen zwischen den Unterarten D.b. *minor*, *michaeli* und *bicornis*. Die genetische Variabilität der mitochondrialen DNA zwischen den Unterarten ist jedoch nur sehr gering und sie ist nicht größer, als zwischen Mitgliedern anderer Säugetiergruppen. Offensichtlich kann also zwischen Unterarten auf genetischer Ebene kaum differenziert werden und es ist somit fraglich, ob diese geographisch getrennt lebenden Populationen überhaupt als Unterarten zu betrachten sind oder nur als Ökotypen. Auch Morales & Melnick (1994) konnten in ihrer RFLP Untersuchung keine genetischen Unterschiede zwischen den Unterarten des Breitmaul- und Spitzmaulnashornes finden. Somit sind Populationen aus verschiedenen Gegenden und sogar verschiedene Unterarten der Spitzmaulnashörner nur bedingt als stammesgeschichtlich getrennte Einheiten zu sehen. Die

Gefahr einer Auszucht Depression (Out-breeding depression) bei der Zucht zwischen verschiedenen Unterarten ist aus diesem Grund nicht zu erwarten. Eine separate Behandlung dieser Gruppen ist jedoch zur Erhaltung bestimmter morphologischer oder adaptiver Spezialisierungen gerechtfertigt.

Allozymstudien von Merenlender et al. (1989) zeigten auch für die beiden Unterarten des Breitmaulnashornes wesentlich geringere genetische Distanzen, als dies für andere Säugetierarten berichtet wird. Im Gegensatz dazu konnte durch eine Studie an mitochondrialer DNA und an Serum Proteinen von George et al. (1991) ein phylogenetischer Unterschied der beiden Unterarten Nördliches Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum cottoni*) und Südliches Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum simum*) klar bestätigt werden. Er gibt eine Divergenz der Nucleotidsequenzen von 1,4 % zwischen den beiden Unterarten an. Auch Harley & O'Ryan (1994) beschreiben wesentlich größere Unterschiede zwischen diesen beiden Unterarten als beim Spitzmaulnashorn. Houck et al (1994) fanden in ihrer Studie sogar chromosomale Unterschiede zwischen den beiden Unterarten des Breitmaulnashornes (*Ceratotherium simum*). Bei 3 verwandten Tieren der Unterart Nördliches Breitmaulnashorn stellten sie eine Abweichung vom diploiden Chromosomensatz von 82 Chromosomen mit nur 81 Chromosomen fest. Der Vergleich der Giemsa gefärbten Karyotypen ergab keine Unterschiede, es zeigten sich jedoch Längenpolymorphismen am kurzen Arm verschiedener Chromosomen. Dieser Befund ist historisch gesehen nicht verwunderlich, da zwischen den Populationen des Südlichen und Nördlichen Nashornes schon seit über einer Million Jahren eine räumliche Trennung von mehr als 2.000 Kilometern bestand (Morales & Melnick, 1994; Pienaar, 1994; Emslie & Adcock, 1997, S. 196).

#### 2.1.8 Untersuchungen zur genetischen Variabilität bei Nashörnern

In einer Untersuchung von 30 proteincodierenden Loci bei 4 räumlich voneinander getrennt lebenden Populationen des Spitzmaulnashornes (*Diceros bicornis*) finden Swart & Ferguson (1994 und 1997) und Swart et al. (1994) eine wesentlich höhere genetische Diversität, als dies die jetzige Populationsgröße vermuten läßt. Dies stimmt auch mit Beobachtungen von Dinerstein & McCracken (1990) beim Indischen Panzernashorn überein. Dies führen die Autoren darauf zurück, daß der Rückgang der einstmals sehr großen Nashornpopulationen beim Spitzmaulnashorn erst in

jüngster Zeit stattfand und daß sich dieser Flaschenhals-Effekt durch die lange Generationszeit von ca. 10 Jahren noch nicht bemerkbar gemacht hat. Sie schätzen einen Heterozygotiegrad von 0.036 bis 0.059, welches in etwa dem entspricht, was auch für andere ausgezüchtete Säugetierarten mit einem Wert von 0.05 berichtet wird. Dieses Ergebnis steht allerdings im Gegensatz zu den Untersuchungen von Merenlender et al. (1989), die für 31 Loci nur einen Heterozygotiegrad von 0.013 bei 9 Schwarzen Nashörnern schätzten, und der Untersuchung von Ashley et al. (1990), in der ein sehr geringer Grad der Variabilität von mitochondrialer DNA festgestellt wurde.

Auch für das Weiße und Indische Nashorn sind die Angaben in der Literatur überaus unterschiedlich. Während eine Studie an Serumproteinen beim Breitmaulnashorn von Stratil et al. (1990) auf eine sehr große genetische Variabilität innerhalb dieser Art schließen läßt, finden George et al. (1991) nur einen geringen Variabilitätsgrad. Dinerstein & McCracken (1990) berichten für das Indische Panzernashorn, daß es noch einen sehr hohen Grad an genetischer Variabilität besitzt, wohingegen Ali et al. (1999) kaum genetische Unterschiede feststellen. Dieser Befund könnte allerdings auch durch die geringe Probenanzahl dieser Studie von nur 7 Tieren bedingt sein.



## 2.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

### 2.2.1 Allgemeines zur Methode

Für den Verwandtschaftsnachweis wird die genetische Variabilität verschiedener Allele genutzt, die von den Eltern auf die Nachkommen vererbt werden.

Eine PCR (Polymerase Chain Reaction) ist in diesem Fall besonders geeignet, da hierfür nur eine sehr geringe Menge an DNA für den Nachweis erforderlich ist.

Da beim Nashorn, wie bei den meisten Wildtieren, nicht genügend Informationen über die DNA Sequenzen vorliegen, wurde mit der Etablierung von AFLP (amplified fragment length polymorphism) für das Nashorn versucht, eine geeignete sequenz-unabhängige Methoden zu finden, die keine Sequenzinformationen über diese Tierart voraussetzt.

AFLP wird von verschiedenen Autoren als eine sehr zuverlässige und kostengünstige Technik zur Bestimmung der genetischen Variabilität und der Verwandtschaftsbestimmung sowohl zwischen als auch innerhalb von Populationen beschrieben, die viele Möglichkeiten bietet (Hill et al., 1996; Greef et al., 1997; Vos & Kuiper, 1997; Mueller & Wolfensbarger, 1999; Sharbel, 1999). Es wurde gezeigt, daß selbst sehr kleine genetische Unterschiede in eng verwandten oder ingezüchteten Individuen dargestellt werden können. So wurden mit AFLP für verschiedene Pilzspezies, die in einer RFLP Studie nur sehr geringe Unterschiede zeigten und in Sojabohnenzuchtlinien, die sich nur an einer einzigen Stelle im ganzen Genom unterschieden, Polymorphismen festgestellt (Maughan et al., 1996; Majer et al., 1996). Auch zwischen verschiedenen Bakterienstämmen, die teilweise sehr nahe miteinander verwandt sind, konnte mit Hilfe von AFLP differenziert werden (Janssen et al., 1996). Die Tatsache, daß viele über das ganze Genom verteilte, unabhängige, polymorphe Marker in einer einzigen PCR-Reaktion hergestellt werden können, nutzten Cervera et al. (1996), Mackill et al. (1996), Maughan et al. (1996), Rouppe van der Voort et al. (1997) und Simons et al. (1997) bereits erfolgreich zur Genkartierung bei verschiedenen Pflanzen.

Bisher liegen jedoch nur sehr wenig Informationen über die Anwendung von AFLP bei Tieren vor, da diese Methode ursprünglich aus der Pflanzenzüchtung kommt (Vos et al., 1995). Ihr Nutzen in der Tierzucht wurde bei der Ratte zur Unterscheidung von Inzuchtlinien (Otsen et al., 1996) und in einer Studie beim Rind beschrieben

(Ajmone-Marsan et al., 1997). Auch zur Genkartierung bei der Ratte und beim Huhn wurde AFLP bereits erfolgreich eingesetzt (Otsen et al., 1996; Knorr et al., 1999). Im Humanbereich kann AFLP für forensische Zwecke eingesetzt werden (Latorra & Schanfield, 1996).

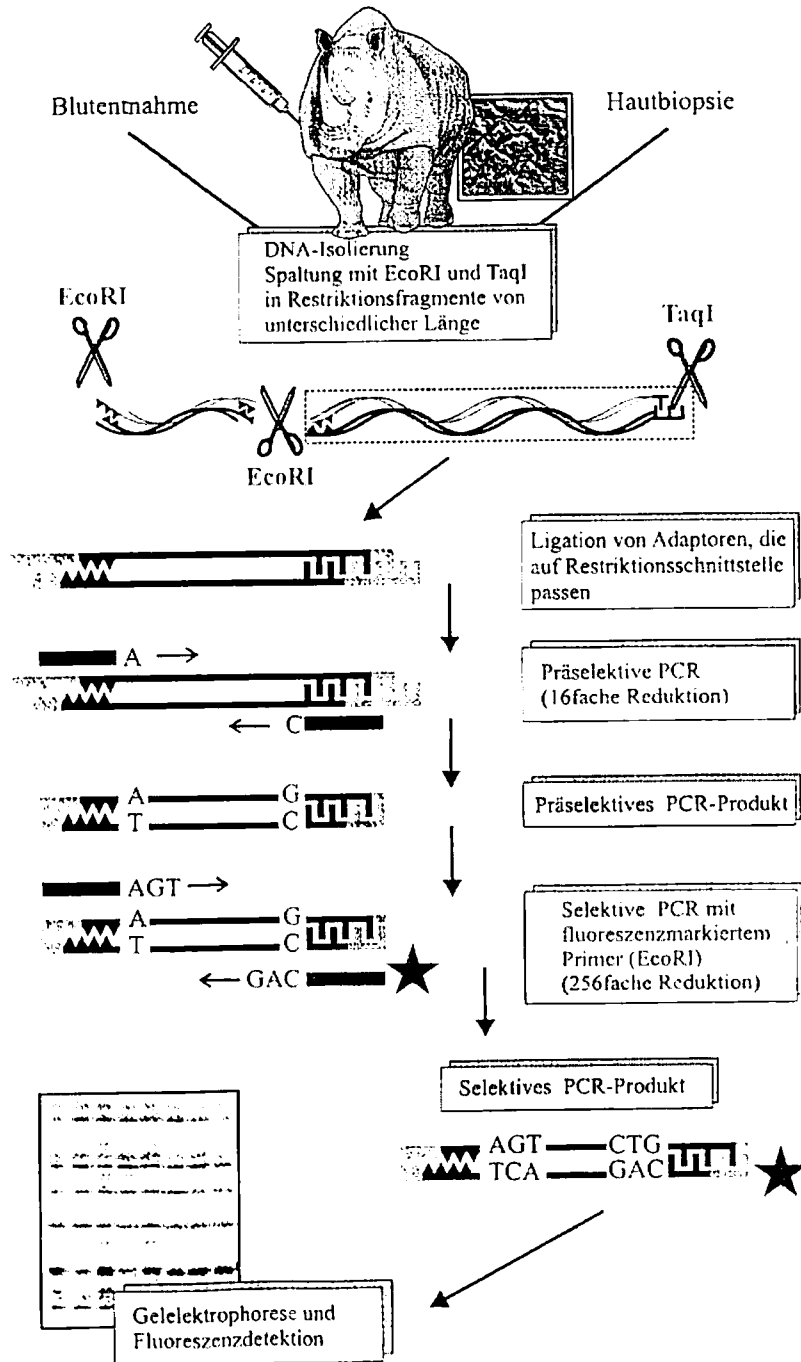
### 2.2.2 AFLP Reaktion

Als erster Schritt wird in der AFLP Reaktion die genomische DNA mit 2 verschiedenen Restriktionsenzymen aufgetrennt (Bild 4), wobei man Fragmente erhält, die in der Regel 500 Basenpaare nicht überschreiten (Majer et al., 1996). In der AFLP Reaktion wird für die meisten Pflanzen die Enzymkombination EcoRI/MseI verwendet (Vos et al., 1995; Hill et al., 1996; Mackill et al., 1996; Majer et al., 1996; Maughan et al., 1996; Trevis et al., 1996; Greef et al., 1997; Paul et al., 1997; Qi & Lindhout, 1997; Rouppe van der Voort et al., 1997; Krauss, 1999; Perkin Elmer, AFLP Plant Mapping Kit). Da diese Enzymkombination jedoch für Säugetiere trotz 3 zusätzlicher Basenpaare am 3' Ende in der selektiven Amplifikation zu viele Fragmente für eine klare Auftrennung auf dem Acrylamidgel ergibt, schlagen Ajmone-Marsan et al. (1997) und Vos & Kuiper (1997) die Kombination EcoRI/TaqI vor. An die Schnittstellen der Restriktionsfragmente werden Adaptoren mit bekannter Sequenz ligiert (Bild 4).

Im weiteren Verlauf werden diese Fragmente mit Hilfe einer Primerkombination, die am 5'Ende komplementär zur Basenpaarsequenz des Adaptors sowie dem Restriktionsende ist, in einer PCR Reaktion vervielfältigt (Bild 4).

Um eine überschaubare Anzahl von Fragmenten zu bekommen, erhalten die Primer zusätzlich an ihrem 3'Ende 1 bzw. 3 selektive Nukleotide. Diese Reaktionen erfolgen in 2 Schritten, der Präamplifikation, in der durch einen Primer mit einem selektiven Nukleotid eine 16-fache Reduzierung erfolgt und der selektiven Amplifikation, in der durch 3 selektive Nukleotide, von denen das erste mit dem in der Präamplifikation verwendeten übereinstimmt, eine 256-fache Reduzierung erfolgt (Vos & Kuiper, 1997; Sharbel, 1999). Einer der Primer ist zur Sichtbarmachung der Proben mit einem Farbstoff markiert. Das PCR Produkt wird schließlich nach Fragmentgrößen über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Bild 4: AFLP-Reaktion



### 2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Technik, mit der man *in vitro* Desoxyribonucleinsäure-(DNA-) Abschnitte, die an beiden Enden von 2 bekannten DNA-Sequenzen, den Primern, eingegrenzt sind, synthetisch vervielfältigen kann. Durch den Einsatz hitzestabiler DNA-Polymerasen und die Entwicklung von Geräten, die für einen zyklischen Temperaturwechsel bei der PCR sorgen, kam der große technologische Fortschritt in der PCR Technik. Erst dies ermöglichte den routinemäßigen Einsatz in der Forschung, denn vor der Entdeckung thermostabiler Enzyme standen nur hitzeempfindliche DNA-Polymerasen zur Verfügung, die man in jedem PCR-Zyklus erneut zusetzen mußte. In jedem neuen PCR-Zyklus wird die Anzahl der DNA-Kopien verdoppelt, so daß aus einer relativ geringen DNA Anfangsmenge gezielt DNA Abschnitte vervielfältigt werden können. Man trennt hierfür die Stränge der Ziel-DNA durch Erhitzen auf und kühlt die Reaktion anschließend wieder ab, damit sich die Primer spezifisch an die komplementäre Sequenz der Zielregion anlagern können. Die DNA-Polymerase verlängert die Primer, welche als Startpunkt der DNA Synthese in der PCR dienen. Hierzu müssen alle 4 Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs) in Puffer gelöst vorhanden sein. Diese PCR-Zyklen wiederholt man in der Regel 20 bis 40 mal. So können tausende von Kopien der Ursprung-DNA entstehen, die notwendig sind, um die Fragmente sichtbar machen zu können (Newton & Graham, 1994).

### 2.2.4 DNA Fingerprinting

Die Methode des genetischen Fingerabdruckes (Fingerprinting) beschreibt Gleichheit und Ungleichheit im Genom einzelner Individuen, Rassen, Arten und Unterarten durch individuelle Bandenmuster (Zabeau & Vos, 1993). Besonders Bereiche nicht-codierender Sequenzen im Genom, die aus hintereinander gelegenen Wiederholungen der Sequenzen bestehen, sogenannte „tandem repeats“, zeigen einen hohen Grad individuenspezifischer Polymorphismen, die vielfach über das Genom verteilt auftreten (Swatschek, 1992). Diese Stellen im Genom können als sehr variable Marker dienen. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen kann die DNA in diesem Bereich in Fragmente unterschiedlicher Größe geschnitten werden, die durch die

unterschiedliche Lage und Anzahl der Wiederholungseinheiten im Genom entstehen (Rothwell, 1993). Diese Fragmente können über ein Gel der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt werden. Da die Enzyme nur an ganz bestimmten Nukleotidsequenzen in der Größe von 4 bis 8 Basenpaaren schneiden, erhält man ein Bandenmuster, das für jeden Organismus charakteristisch und reproduzierbar ist, weshalb DNA-Fingerprinting auch oft in der Forensik eingesetzt wird.

Die Bereiche der „tandem repeats“ und damit die Muster der Längen-Polymorphismen werden nach den Mendelschen Regeln vererbt, woraus folgt, daß wenig verwandte Tiere weniger gleiche Banden zeigen, als verwandte Tiere. Um für das Säugetiergenom ein klar unterscheidbares Bandenmuster zu bekommen, darf nur ein Teil dieser Fragmente sichtbar gemacht werden (Zabeau & Vos, 1993). Um solche Bandenmuster zu erzeugen, können verschiedene molekularbiologische Verfahren eingesetzt werden, wovon AFLP eine auf einer PCR basierenden Methode ist (Swatschek, 1992).

### 2.2.5 AFLP Polymorphismen

Polymorphismen werden anhand der Präsenz oder Abwesenheit von Banden bestimmt, die sich durch verschieden lange Restriktionsfragmente ergeben (Hill et al., 1996). Diese Bandenmuster sind für jeden Organismus charakteristisch und reproduzierbar. Unterschiede im Bandenmuster ergeben sich durch den Austausch einer Base an der Restriktionsstelle und/oder an der Stelle der selektiven Nukleotide durch Mutation. So gehen Banden verloren oder es werden zusätzliche Banden amplifiziert (Sharbel, 1999).

### 2.2.6 Sequenzunabhängige Methoden im Vergleich

Es gibt eine große Anzahl verschiedener molekularbiologischer Technologien, um auf der Ebene des Erbgutes Polymorphismen und somit genetische Variabilität feststellen zu können, doch jede Methode hat Vor- und Nachteile und muß speziell nach der jeweiligen Fragestellung und technischen Möglichkeit ausgewählt werden. So ist RFLP (restriction fragment length polymorphism) eine sehr gut reproduzierbare Methode, die codominante Marker generiert. Die DNA wird mit Restriktionsenzymen verdaut und die daraus resultierenden Fragmente werden über ein Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf einen Southern Blot aufgetragen. Die Unterschiede der Fragmentlänge resultieren entweder aus einer Mutation an der Restriktionsstelle oder entstehen durch Insertion/Deletion. Die RFLP Technik ist allerdings sehr zeitaufwendig, teuer und läßt sich kaum automatisieren, außerdem sind große Mengen von qualitativ hochwertiger Ausgangs-DNA nötig (Dodgson et al., 1997; Karp et al., 1996; Karp & Edwards, 1997; Paul et al., 1997; Mueller & Wolfensbarger, 1999). Zudem ist die Anzahl polymorpher RFLP Marker pro Reaktion recht gering und für manche Spezies konnten nur sehr wenige oder gar keine Polymorphismen festgestellt werden (Mackill et al., 1996; Powell et al., 1996).

Durch den Einsatz der PCR Technik ist hier die Methode RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) eine Verbesserung im Vergleich zu RFLP, da nur kleine Mengen an DNA gebraucht werden und ein Blotting oder Hybridisieren entfällt, d. h. es ist einfacher und schneller, Marker zu erzeugen und die Methode ist automatisierbar. Mit kurzen, für gewöhnlich nur ca. 10 Nukleotiden langen Primern werden sehr unspezifisch Segmente der DNA amplifiziert, die genügend Ähnlichkeit mit den Primern aufweisen. Polymorphismen entstehen durch Unterschiede an den Bindungsstellen der Primer (Powell et al., 1996; Milbourne et al., 1997). Die geringe Selektivität der Primer kann jedoch auch zu fehlerhaften Ergebnissen und Artefakten führen. So muß bei RAPD die Reaktionsbedingung sehr strikt konstant gehalten werden, da sonst die Reproduzierbarkeit als sehr kritisch bewertet wird (Cervera et al., 1996; Dodgson et al., 1997; Karp et al., 1996; Karp & Edwards, 1997; Jones et al., 1997; Paul et al., 1997; Mueller & Wolfensbarger, 1999). Die amplifizierten Fragmente aus der RAPD Reaktion werden über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und im UV Licht sichtbar gemacht. Die

Marker sind dominant, d. h. Heterozygote können mit dieser Methode nicht erkannt werden.

AFLP kombiniert die Vorteile aus beiden Methoden. Die DNA wird mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten und in verschiedenen PCR-Reaktionen amplifiziert. Wie in einem Versuch verschiedener europäischer Labors gezeigt wurde, hat diese Methode eine ähnlich hohe Reproduzierbarkeit wie RFLP. Hier wies nur in einem Fall eine einzige Bande einen Unterschied auf (Jones et al., 1997). AFLP ist allerdings zeitaufwendiger als RAPD und benötigt mehr, qualitativ hochwertige DNA. Im Vergleich zur RAPD Technik, bei der ca. 20 Banden pro Primer erzielt werden, deckt AFLP einen weitaus größeren Teil des Genoms ab mit einem Durchschnitt von 100 Banden pro Primerkombination und weist somit auch eine höhere Anzahl Polymorphismen pro Reaktion auf (Karp et al., 1996; Paul et al., 1997).

### 3. Eigene Untersuchungen

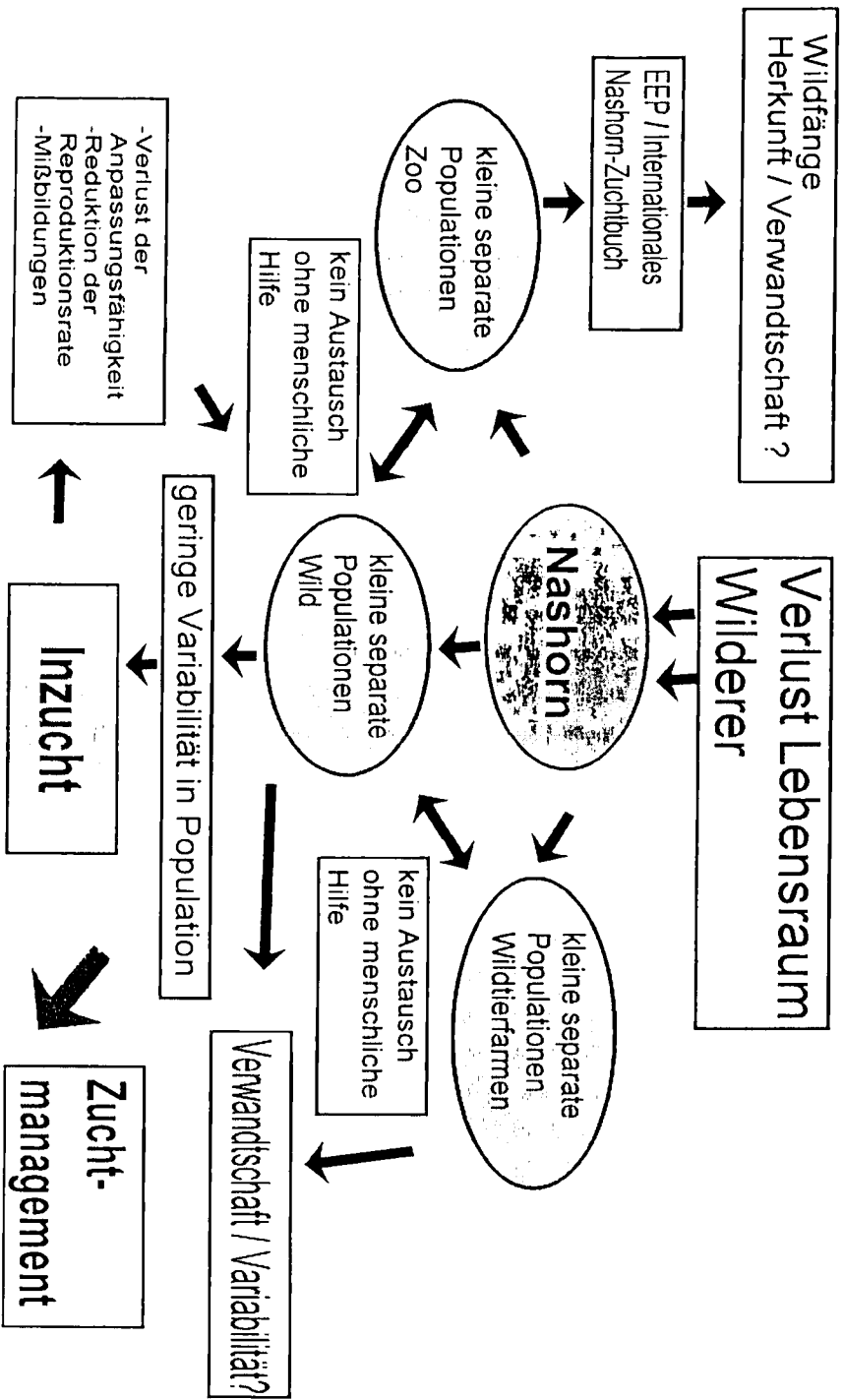
#### 3.1 Zielsetzung und Problematik

In Anbetracht der in diesem Jahrhundert durch Wilderei und Lebensraumverlust stark zurückgegangenen Bestandszahlen der afrikanischen und asiatischen Nashörner wird für deren Überleben ein intensives Zuchtmanagement dringend benötigt. Um überlebensfähige Populationen zu erhalten, bedarf es nicht nur der Sicherung ihres Lebensraumes. Da natürliches Zu- und Abwandern von Nashörnern aus unterschiedlichen Gegenden und Populationen nicht mehr ohne menschliche Hilfe stattfinden kann und die Populationsgröße in vielen Gegenden sehr klein ist, versucht man teilweise durch Umsiedlung einzelner Tiere in andere Gegenden die genetische Variabilität der Gruppe zu erhalten und so Inzuchteffekte wie z. B. eine verminderte Reproduktionsrate zu vermeiden, welche wiederum eine weitere Verminderung der Populationsgröße zur Folge hätte (Bild 5). Um Zuchtempfehlungen aussprechen zu können, muß jedoch zuerst geklärt werden, ob es sich bei den existierenden, geographisch weit verstreuten Populationen genetisch gesehen um Unterarten handelt, die sich in ihrer Abstammung signifikant unterscheiden und die deshalb nicht vermischt werden sollten. Da die Nördlichen Breitmaulnashörner momentan die am meisten bedrohte Unterart sind, für die ein Überleben bereits fraglich erscheint, soll ihre genetische Distanz zu den Südlichen Breitmaulnashörnern bestimmt werden.

Bei Tieren, bei denen die Herkunft oder die Verwandtschaftsverhältnisse unklar sind, wie dies für Wildpopulationen und auch einige Zootiere der Fall ist, wird zudem ein Abstammungsnachweis erforderlich, um Inzucht zu vermeiden und einen sinnvollen Zuchtplan aufstellen zu können. Dies soll anhand der Südlichen Breitmaulnashörner gezeigt werden.

Da man annimmt, daß die Breitmaulnashörner und die Indischen Panzernashörner bereits am Anfang des 20. Jahrhunderts durch einen genetischen Flaschenhals gegangen sind und somit ihre Variabilität schon reduziert ist, während sich die Zahl der Spitzmaulnashörner erst in den letzten 20 Jahren rapide durch Wilderei vermindert hat, muß festgestellt werden, wie groß die genetische Variabilität innerhalb der einzelnen Arten und Unterarten überhaupt noch ist und inwieweit diese Veränderungen der Bestandszahlen bereits einen Einfluß auf die

**Bild 5:** Problemstellung für die Nashornpopulationen



**3.2.1 Problematik der Probenentnahme**

3.2 Material und Methode

Populationsstruktur hatte. Weiter soll geklärt werden, ob mit der Methode AFLP eine genetische Differenzierung zwischen den beiden Unterarten des Breitmaulnashorns und zwischen den beiden afrikanischen Arten, dem Breitmaul- und dem Spitzmaulnashorn sowie dem indischen Panzernashorn gemacht werden kann.

Bedingt durch die sehr unterschiedlichen Gegebenheiten in den verschiedenen Zoos und Safariparks sowie in freier Wildbahn, mußten verschiedene Verfahren zur Probenentnahme von Blut oder Gewebe beim Nashorn gefunden werden. Eine leichter durchführbare, nicht invasive Methode, wie sie speziell für Wildtiere häufig gefordert wird, wäre z. B. die Extraktion von DNA aus Haarfollikeln oder Kolproben (Kohn & Wayne, 1997). Haarfollikeln enthalten jedoch für AFLP zu wenig DNA und bei Kolproben liegt eine starke Kontamination durch Darmbakterien und DNA der Futterpflanzen vor, so daß mit einer unspezifischen Methode nicht zwischen Nashorn-DNA und Kontaminationen unterschieden werden kann. AFLP ist für dieses Probenmaterial nicht geeignet, da nur aufgereinigte, genomische DNA als Ausgangsmaterial für die PCR-Reaktionen verwendet werden kann, damit eine vollständige Aufspaltung durch die Restriktionsenzyme gewährleistet ist. So wird der Einsatz dieser Methode häufig durch die fehlende Möglichkeit der Probenentnahme beim Wildtier limitiert.

**3.2.1.1 Probenentnahme in freier Wildbahn**

Gewebenahme auf größere Distanz, welche in freier Wildbahn und in manchen Safariparks benötigt wird, kann für viele Wildtierarten mit dem Gewehr mittels spezieller Biopsiepfleile erfolgen. Die Entwicklung von Biopsiepfleilen für das Nashorn scheiterte bisher jedoch auch nach mehreren Umbauversuchen an ihrer dicken Haut und dem dichten Unterhautgewebe, so daß die Pfeile in den meisten Fällen ohne die gewünschte Hautbiopsie wieder herausfielen (Walzer, persönliche Mitteilungen, 1997/1998). Aus diesem Grund mußte weitgehend auf Proben aus der freien

Wildbahn verzichtet werden. Die Proben von Breitmaulnashörnern der privaten Wildtierfarm Thaba Tholo in Südafrika wurden im Zuge einer Markierungsaktion entnommen, für die die Tiere extra vom Hubschrauber aus mit Hilfe eines Betäubungsgewehres in Narkose gelegt wurden. So konnten sowohl Blut- als auch Hautproben entnommen werden. Diese Methode ist jedoch nicht nur sehr kostspielig, sondern sie birgt auch ein hohes Risiko für die Tiere. Nashörner reagieren sehr empfindlich auf Opioide, und es kann zu schweren Atemdepressionen kommen (Raath, 1994).

### 3.2.1.2 Probenentnahme im Zoo

#### Blut:

Die Probenentnahme bei Zootieren erfolgte vorzugsweise als EDTA Blut nach der Methode von Walzer (Walzer, 1998) aus der Ohrvene. Um eine Gegenwehr des Tieres bei der Blutentnahme zu vermeiden, wird das Ohr lokal mit einer Mischung aus Lidocain und Prilocaine betäubt. Hierzu wurde ein EMLA® Pflaster (Astra GmbH, Wedel) verwendet.

Im Whipsnade Safaripark in England wurden die Tiere darauf trainiert, daß sie sich regelmäßig freiwillig, auch ohne lokale Betäubung, Blut abnehmen lassen.

#### Gewebe:

Gewebeproben bei Zootieren, die den Umgang mit dem Menschen gewohnt sind, können mittels einer 8 mm Biopsie-Hautstanze (Fa. Stiefel, bezogen über Fa. Lehnecke, Schortens) hinter dem Ohr unter lokaler Anästhesie nach der Methode von Walzer (Walzer, 1998) entnommen werden. Bei den übrigen Tieren wird die Biopsie mit einer Markierzange für Rinder oder Schweine, die extra leichtgängig und sehr scharf ist, aus dem Ohr gestanzt. Diese Methode hinterläßt zwar ein ca. 8 mm großes Loch oder eine ca. 1 cm lange Kerbe im Ohr, aber sie ist extrem schnell und funktioniert auch bei Tieren, die kaum an den Menschen gewöhnt sind, sehr gut.

### 3.2.2 Probenkonservierung

#### Blut:

Blutproben wurden in EDTA Röhrchen gesammelt und sofort bis zur Verwendung bei - 20 °C tiefgefroren.

#### Gewebe:

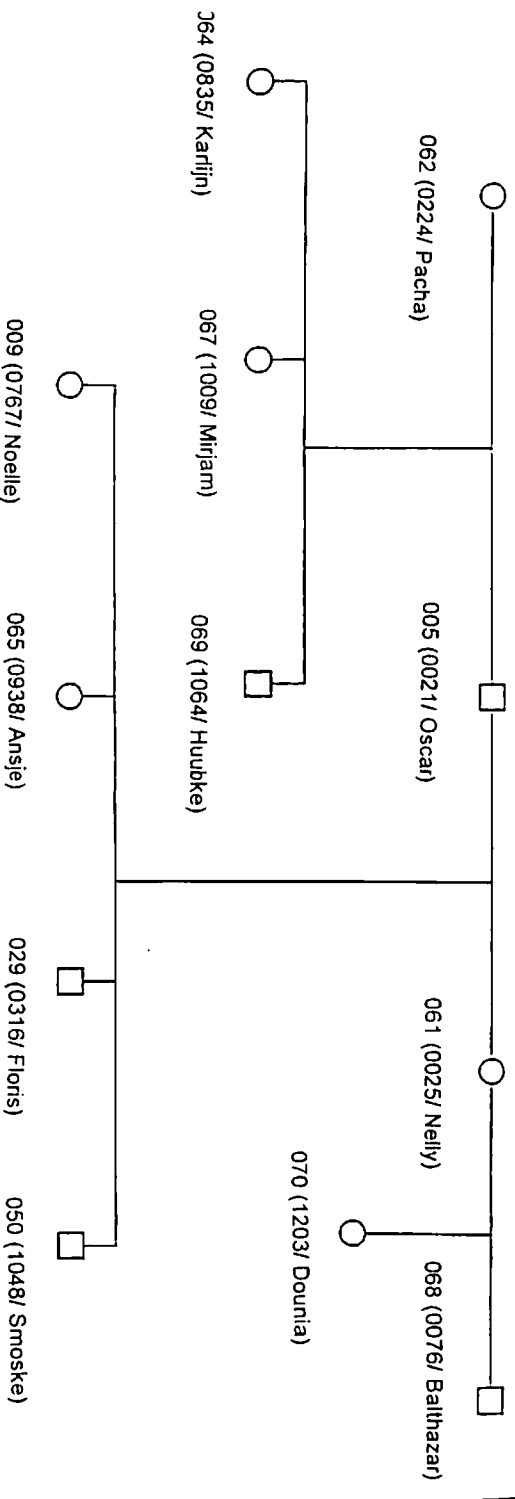
Die Gewebeproben wurden in 70 % Ethylalkohol konserviert und im Kühlschrank bei + 4 °C gelagert oder bei - 20 °C/ - 80 °C tiefgefroren.

### 3.2.3 Probenmaterial und untersuchte Tiere

Die Studie umfaßt Blut- und Gewebeproben von 69 Weißen Nashörnern der Unterart Südliches Weißes Nashorn (*Ceratotherium simum simum*) aus verschiedenen europäischen Zoos, die dem Europäischen Erhaltungszucht-Programm angeschlossen sind (EEP) und für die ein international geführtes Zuchtbuch besteht (Gölthenboth & Ochs, 1995/97/99), d. h. ihre Herkunft und Verwandtschaftsverhältnisse sind weitgehend bekannt. Diese Gruppe beinhaltet Tiere unterschiedlicher Herkunft, von denen angenommen wird, daß sie nicht miteinander verwandt sind sowie 4 Familien: Beekse Bergen, Hodenhagen, Münster und Whipsnade (Bild 6 bis 9). Von einer Wildtierfarm aus Südafrika sind weitere Gewebeproben von 56 Tieren dieser Unterart in der Studie vertreten (Anhang). Hierbei handelt es sich um 13 Kühe mit ihrer Nachzucht sowie 5 als Vätertiere in Frage kommende Bullen. Über die Verwandtschaft und Herkunft der übrigen Nashörner auf dieser Farm ist nichts bekannt. Von der seltensten Unterart, dem Nördlichen Weißen Nashorn, konnten 5 Proben gesammelt werden. Hierbei handelt es sich um einen Bullen mit 3 Nachkommen, davon 2 Vollgeschwister und ein Halbgeschwister, sowie ein Tier, das nicht mit den übrigen verwandt ist (Anhang).

Als Vergleichsgruppen wurden Proben von Spitzmaulnashörnern (*Diceros bicornis*) und von Indischen Panzernashörnern (*Rhinoceros unicornis*), für die ein separates Zuchtbuch geführt wird (Studer, 1998), aus verschiedenen europäischen Zoos auf die genetische Distanz zum Breitmaulnashorn hin untersucht und getestet, ob die Primer ebenfalls für diese Arten Polymorphismen ergeben.

Bild 6: Familienstammbaum der südlichen Breitmaulnashörner aus der Familie Beekse-Bergen:



- = weibliches Nashorn
- = männliches Nashorn
- ☐ = keine Probe in der Studie vorhanden

Bild 7: Familienstammbaum der südlichen Breitmaulnashörner aus der Familie Hodenhagen:

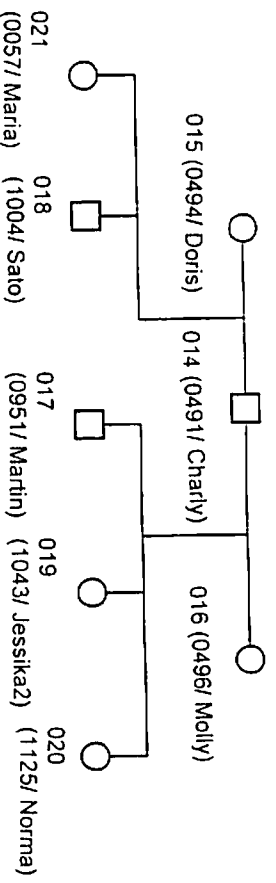


Bild 8: Familienstammbaum der südlichen Breitmaulnashörner aus der Familie Münster:

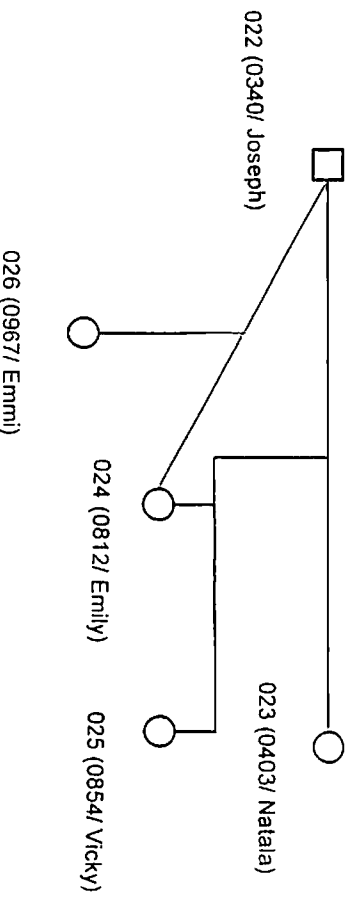






Bild 11: Familienstammbaum der Spitzmaulnashörner aus der Familie Dvur Kralove 1:

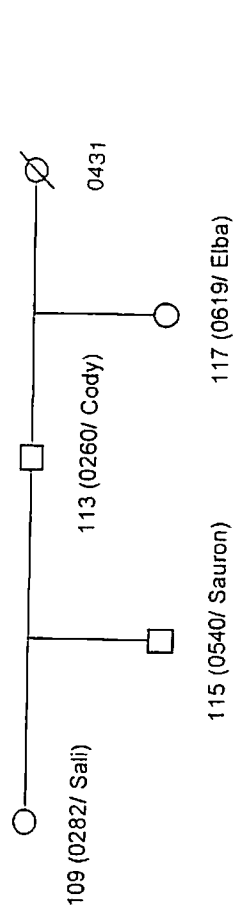
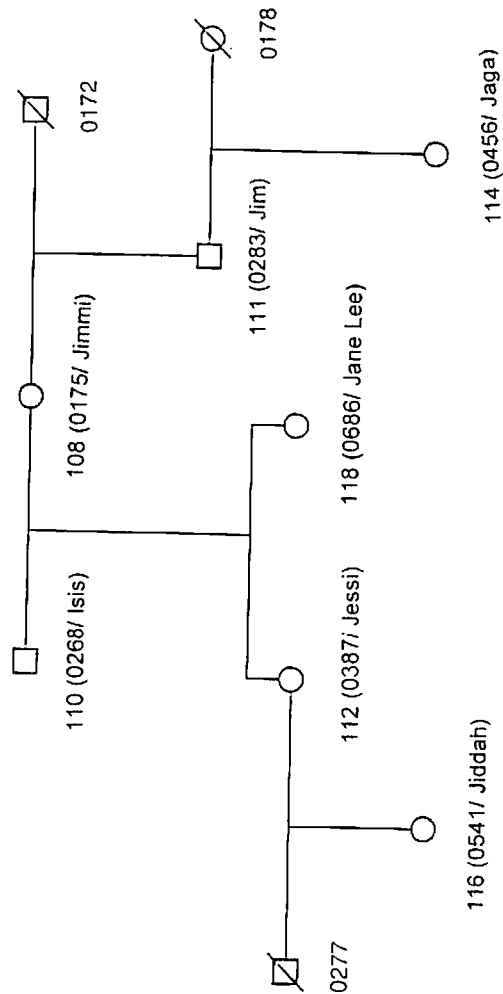


Bild 12: Familienstammbaum der Spitzmaulnashörner aus der Familie Dvur Kralove 2:



Bei den untersuchten Spitzmaulnashörnern handelte es sich um 20 Tiere der Unterart Ostafrikanisches Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis michaeli*), die aus den beiden Familien Berlin West und Dvur Kralove bestehen (Bild 10 bis 12).

Von Indischen Panzernashörnern konnten 6 Proben in Zoologischen Gärten gesammelt werden, von einer Kuh und einem Bullen mit ihrem Nachkommen, vom Vattertier des Bullen und 2 unverwandten Tieren (Anhang). Auch für diese Art existiert ein internationales Zuchtbuch (Studer, 1998).

Die Informationen, die zur Erstellen der Stammbäume nötig waren, wurden freundlicherweise von den Zoologischen Gärten und den Zuchtbuchhaltern zur Verfügung gestellt, wofür ich mich herzlich bedanke.

Tabelle 2: Übersicht über das Probenmaterial:

Tierart/ Unterart	Kurzform	Herkunft	Anzahl der Proben
Südliches Breitmaulnashorn ( <i>Ceratotherium simum simum</i> )	Css	Zoologische Gärten Europa	69
Südliches Breitmaulnashorn ( <i>Ceratotherium simum simum</i> )	Csw	Wildtierfarm Südafrika	56
Nördliches Breitmaulnashorn ( <i>Ceratotherium simum cottoni</i> )	Csc	Tierpark Dvur Kralove	5
Östafrikanisches Spitzmaulnashorn ( <i>Diceros bicornis michaeli</i> )	Db	Zoologische Gärten Europa	20
Indisches Panzernashorn ( <i>Rhinoceros unicornis</i> )	Ru	Zoologische Gärten Europa	6

### 3.2.4 DNA Isolierung

#### Phenolextraktion aus Blut:

Die Blutprobe wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und 1 ml davon in ein Eppendorf Tube überführt und für 1 Minute bei 15.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Leukozytenpellet mit 1 ml TE Puffer gewaschen, wieder zentrifugiert und der Überstand verworfen. Diesen Schritt wiederholte man mehrfach, bis das Pellet keine rote Farbe mehr zeigte. Es wurde 200 µl Lysis-Puffer (Anhang) und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und die Leukozyten wurden ca. 2 bis 3 Stunden in den Thermaschüttler bei 55 bis 62 °C gestellt, um die Zellmembran der Leukozyten zu denaturieren. Danach wurde 200 µl Phenol zugegeben und es wurde vorsichtig 3 Minuten lang mit der Probe gemischt. Nachdem 3 Minuten bei 15.000 Umdrehungen zentrifugiert wurde, wurde der Überstand abpipettiert und in ein neues Kunststoffreaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal mit 200 µl Phenol/ Chloroform Gemisch und 200 µl Chloroform wiederholt. Die DNA wurde mit 30 µl 3 M Natriumacetat und 600 µl 100 % Ethanol ausgefällt, ausgefischt und in einem neuen Kunststoffreaktionsgefäß mit 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA wurde schließlich an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet, mit 50 µl Aqua bidest aufgelöst und photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 ausgemessen.

#### Phenolextraktion aus Gewebe:

Ein kleines Stückchen Gewebe (ca. 100 mg) wurde mit dem Skalpell zerkleinert und in 500 µl Lysis Puffer (Anhang) und 100 µl Proteinase K (10 mg/ml) über Nacht im Thermomixer bei ca. 58°C inkubiert. Nachdem die Zellwände lysiert waren, wurde 500 µl Phenol zugegeben, mit der Probe vermischt und 3 Minuten bei 15.000 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Kunststoffreaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal mit Phenol, zweifach mit 500 µl Phenol/ Chloroform Gemisch und einmal mit 500 µl Chloroform durchgeführt. Die DNA wurde mit 35 µl 3M Natriumacetat und 800 µl 100 % Ethanol ausgefällt und 3 Minuten bei 15.000 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und die Probe wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, ein weiteres

Mal 3 Minuten bei 15.000 Umdrehungen zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das DNA-Pellet wurde schließlich an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet, mit 50 µl Aqua bidest aufgelöst und photometrisch ausgemessen.

### 3.2.5 Restriktion

Die genomische DNA wird mit Hilfe von Restriktionsenzymen, die nur an ganz bestimmten Stellen die Doppelhelix zerschneiden, verdaut. Das Enzym TaqI hat als Zielschnittstelle ein Tetranukleotid, d. h. wenn man annimmt, daß diese Schnittstellen gleichmäßig über das Genom verteilt sind, schneidet es alle 4<sup>4</sup> Nukleotide und sorgt so dafür, daß viele kleine Fragmente entstehen, die gut amplifiziert werden. Um nicht zu viele Fragmente in der PCR-Reaktion zu erhalten, wird EcoRI, das ein Hexanukleotid als Zielschnittstelle hat, als selten schneidendes Enzym eingesetzt, das nur alle 4<sup>6</sup> Nukleotide schneidet (Maniatis et al., 1982). Da vorwiegend Restriktionsfragmente mit zwei verschiedenen Schnittstellen amplifiziert werden, hängt die Anzahl der Fragmente von der Anzahl der Restriktionsstellen des selten schneidenden Enzymes ab.

Restriktionsenzyme (New England Bio Labs, Schwalbach/ Taunus):

EcoRI 5' G↓AATT C 3'  
C TTAA↓G

Taq I 5' T↓TCG A 3'  
A GC↓T

Folgendes Protokoll wurde zum Ansatz der Restriktion pro Probe verwendet:

		Volumina in $\mu\text{l}$
DNA	250 ng/Tier	2
Taq I (100 U/ $\mu\text{l}$ )	15 U	0.15
BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )		1.25
10x RL		2.5
H <sub>2</sub> O		<u>19.1</u>
Gesamtvolumen:		25.0
EcoRI (20 U/ $\mu\text{l}$ )	20 U	1
BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )		0.75
10x RL		1.5
H <sub>2</sub> O		<u>11.75</u>
Gesamtvolumen:		15.0

Es wurde in einem 1.5 ml Kunststoffreaktionsgefäß eine Stocklösung aus 19.1  $\mu\text{l}$  Aqua bidest, 2.5  $\mu\text{l}$  Restriktions-/ Ligationspuffer (RL) (Anhang), 1.25  $\mu\text{l}$  Bovinem Serumalbumin (BSA) und 0.15  $\mu\text{l}$  des Restriktionsenzymes Taq I pro Probe hergestellt. Es wurden 2  $\mu\text{l}$  DNA (500 ng) jedes Tieres einzeln in beschriftete 0.5  $\mu\text{l}$  Kunststoffreaktionsgefäß pipettiert und 24  $\mu\text{l}$  der Stocklösung dazugegeben. Der Restriktionsansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl abgedeckt und bei 65°C für 2 Stunden inkubiert. Da die optimale Inkubationszeit des Restriktionsenzymes Taq I wesentlich höher liegt als bei Eco RI, wird die Stocklösung bestehend aus 1  $\mu\text{l}$  des Restriktionsenzymes Eco RI, 0.75  $\mu\text{l}$  BSA, 1.5  $\mu\text{l}$  RL und 11.75  $\mu\text{l}$  Wasser erst nach der Inkubationszeit von 2 Stunden bei 65 °C zum Gesamtansatz zupipettiert und für weitere 2 Stunden bei 37 °C verdaut.

### 3.2.6 Ligation

Für den Ligationsansatz wurden folgende Primersequenzen und Konzentrationen der Adaptoren verwendet, welche genau auf die Schnittstellen der Restriktionsenzyme passen:

ECOAD:

- EHADI Bio 5' y CTC GTA GAC TGC GTA CC' - 3'
- AFLPEC.b 5' - AAT TGG TAC GCA GTC TAC - 3'

EHADI Bio + AFLPEC. b

- jeweils 10 pmol/  $\mu\text{l}$  = EcoAD

TQAD:

- TaAD1 5' - GAC GAT GAG TCC TGA C - 3'
- TaAD2 5' - CGG TCA GGA CTC AT - 3'

TaAD1 + TaAD2

- jeweils 70 pmol/  $\mu\text{l}$  = TQAD

Es wurde nach folgendem Arbeitsprotokoll gearbeitet:

	pro Reaktion in $\mu\text{l}$
EcoAD (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1
TQAD (70 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1
BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	0.5
ATP (10 mM)	1
10x RL	1
T4 DNA-Ligase	0.5
H <sub>2</sub> O	<u>5.0</u>
Gesamtvolumen:	10.0

Die Bio-Adaptoren EcoAD und TQAD wurden vor Gebrauch für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und 20-30 Minuten danach bei Raumtemperatur stehengelassen, damit sie wieder abkühlen können. Es wurde pro Reaktionsansatz eine Stocklösung aus jeweils 1 µl der Adaptoren EcoAD und TQAD, 0,5 µl BSA, 1 µl ATP, 1 µl RL-Puffer und 5,0 µl Aqua bidest hergestellt, der 0,5 µl T4 DNA-Ligase zugesetzt wurde. Dieses Volumen von 10 µl wurde dem Restriktionsansatz zugeben (25 µl + 15 µl + 10 µl = 50 µl) und bei 37 °C für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Proben noch mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen (besser über Nacht bei Raumtemperatur). Nach dieser Zeit wurde der 50 µl Reaktionsansatz mit 450 µl AFLP-Verdünner auf ein Volumen von 500 µl Restriktions-/Ligations-Template verdünnt und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.2.7 Präamplifikation

Während der Präamplifikation wird mit Hilfe von selektiven AFLP Primern erreicht, daß nur ein Teil der Restriktionsfragmente durch die PCR vervielfältigt wird. Diese AFLP Primer besitzen ein zusätzliches Basenpaar am 3' Ende, das in das Restriktionsfragment hineinragt.

Hierfür wurden folgende jeweils zu den verwendeten Bio-Adaptoren und Enzymrestriktionsstellen passende Primer verwendet:

Primer EcoRI:	E01	5'- GAC TGC GTA CCA ATT CA - 3'
Primer TaqI:	T01	5'- GAT GAG TCC TGA CCG AA - 3'
	T02	5'- GAT GAG TCC TGA CCG AC - 3'

Es wurde für die selektive Amplifikation folgender Reaktionsansatz pro Tier in µl angesetzt:

	Volumina in µl
RL-Template	5
E01	1
T01/T02	1
DNA-Polymerase (2 U/µl)	0.25
dNTP (10 mM)	0.5
Puffer 10x	2
H <sub>2</sub> O	<u>10.25</u>
Gesamtvolumen:	20.00

Pro Probe wurde ein Polymerase Prämix aus 10,25 µl Aqua bidest, 2 µl PCR Puffer, 0,5 µl dNTP, 0,25 µl DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) und 1 µl der Primer E01 und T01 oder T02 hergestellt und auf Eis gesetzt. Dieser Ansatz von 20 µl je Probe wurde in ein 0,5 ml Kunststoffreaktionsgefäß pipetiert und jeweils 5 µl des Templates aus der Restriktions-/Ligationsreaktion hinzugefügt. Jede Probe wurde mit 1 Tropfen Öl überschichtet und in den PCR Thermocycler gestellt. Der Thermocycler hatte folgende Programmierung:

1x	94 °	2'	30x	94 °	30"	1x	72 °	10'
				56 °	1'		40 °	5'
				72 °	2'			

Während der PCR Reaktion erfolgt der erste Denaturierungsschritt zur Auftrennung des DNA-Doppelstranges in die beiden Einzelstränge bei 94 °C für 2 Minuten, dann erfolgt jeweils eine Denaturierung bei 94 °C für 30 Sekunden, die Anlagerung der Primer (Annealing) bei 56 °C für 1 Minute, die Kettenverlängerung bei 72 °C für 2 Minuten während 30 Zyklen, anschließend kommt es in 10 Minuten bei 72 °C zur vollständigen Kettenverlängerung und Abkühlen auf 40 °C für 5 Minuten.

Nach der Reaktion wurden die 20 µl Reaktionsansatz mit 180 µl AFLP-Verdünner gemischt und die Proben bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.2.8 Selektive Amplifikation

Für die selektive Amplifikation wurden folgende Primerkombinationen mit 3 selektiven Basenpaaren verwendet, die eine weitere Reduktion der Fragmente bewirken:

#### Primer EcoRI\*

(IRD gelabelt):

E01	5'- GAC TGC GTA CCA ATT CA - 3'
E32	5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAA C- 3'
E33	5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAA G- 3'
E35	5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAC A- 3'
E38	5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAC T- 3'
E39	5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAG A- 3'
E42	5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAG T- 3'
E44	5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAT C- 3'
E45	5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAT G- 3'

#### Primer TaqI:

T01	5'- GAT GAG TCC TGA CCG AA - 3'
T02	5'- GAT GAG TCC TGA CCG AC - 3'
T32	5'- GAT GAG TCC TGA CCG AAA C - 3'
T33	5'- GAT GAG TCC TGA CCG AAA G- 3'
T35	5'- GAT GAG TCC TGA CCG AAC A - 3'
T38	5'- GAT GAG TCC TGA CCG AAC T - 3'
T48	5'- GAT GAG TCC TGA CCG ACA C- 3'
T49	5'- GAT GAG TCC TGA CCG ACA G- 3'
T50	5'- GAT GAG TCC TGA CCG ACA T- 3'
T48	5'- GAT GAG TCC TGA CCG ACC A- 3'

### 3.2.8.1 Auswahl der Primer

Die Vorauswertung der Banden und Selektion der Primer erfolgte mit 6 nicht verwandten Tieren aus Zoologischen Gärten und der freien Wildbahn der Unterart Südliches Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum simum*): Labornummer 001, 002, 004, 022, 203, 204. Diese Nashörner wurden ausgewählt, da es sich hier um den Hauptanteil im Probenmaterial handelt und da speziell für diese Unterart ein Abstammungsnachweis durchgeführt werden sollte. Um eine möglichst große Anzahl der möglichen Allele dieser Spezies zu erfassen, wurden nicht verwandte Tiere von verschiedenen Herkunftsorten ausgewählt, da nicht verwandte Tiere auch weniger gemeinsame Banden aufweisen als verwandte Tiere und somit mehr polymorphe Banden zeigen. Die Banden wurden auf ihre Auswertbarkeit sowie auf auftretende Polymorphismen hin untersucht. Es wurden schließlich die Primerkombinationen für die Versuche ausgewählt, die die meisten Polymorphismen zwischen den Tieren zeigten und welche die stärksten und deutlichsten Banden aufwiesen. Diese Banden ließen eine gute Reproduzierbarkeit erwarten (Tabelle 3). Es wurde darauf geachtet, daß die Polymorphismen auf alle Tiere verteilt auftraten und nicht nur bei einem Einzeltier, da z. B. Nummer 022 häufig zusätzliche Banden aufwies. Zur Übersichtlichkeit wurden die Primerkombinationen von N01 bis N64 durchnummeriert.

Wie in Tabelle 3 zu sehen ist, wurden die 12 dunkel und mit einem Ausrufezeichen markierten Primerkombinationen N02, N03, N04, N10, N25, N26, N27, N28, N41, N52, N57 und N59 als beste Primer für das Südliche Breitmaulnashorn, der größten Gruppe in dieser Studie, ausgewählt und für die gesamte Anzahl der Nashörner aus allen Populationen ausgewertet. Von Primerkombination N35, die in Tabelle 3 etwas heller markiert ist als die anderen verwendeten Primerkombinationen, wurden nur 2 Marker verwendet, um die Ergebnisse des Abstammungsnachweises für die Wildpopulation Südlicher Weißer Nashörner der Thaba Tholo Game Farm zu verbessern. Die hellmarkierten Primerkombinationen N09, N11, N12, N18, N22, N30, N51, N61, N62 und N64 wären ebenfalls in der engeren Wahl gewesen. Sie hätten benutzt werden können, um noch genauere Ergebnisse im Abstammungsnachweis oder bei der Berechnung der genetischen Distanzen zu erhalten. Für die hier gestellte Fragestellung reichen die verwendeten Marker aber aus.

**Tabelle 3:** Übersicht über die 64 getesteten AFLP-Primerkombinationen:

EcoRI/ TaqI	E01 E32 / AAC*	E01 E33 / AAG*	E01 E35 / ACA*	E01 E38 / ACT*	E01 E39 / AGA*	E01 E42 / AGT*	E01 E44 / ATC*	E01 E45 / ATG*
<b>T01</b> T32 / AAC	N01 6	<b>N09</b> 9	N17 4		N33 5		N49 6	<b>N57</b> 7
<b>T01</b> T33 / AAG			<b>N18</b> 10		N34 3	N42 4	N50 5	N58 7
<b>T01</b> T35/ ACA		<b>N11</b> 10	N19 6		<b>N35</b> 11	N43 7	<b>N51</b> 9	<b>N59</b> 10
<b>T01</b> T38 / ACT		<b>N12</b> 9	N20 4		N36 3	N44 3	<b>N52</b> 12	N60 6
<b>T02</b> T48 / CAC	N05 4	N13 3	N21 3	N29 4	N37 5	N45 6	N53 6	<b>N61</b> 11
<b>T02</b> T49 / CAG	N06 7	N14 5	<b>N22</b> 8	<b>N30</b> 11	N38 3	N46 5	N54 3	<b>N62</b> 10
<b>T02</b> T50 / CAT	N07 6	N15 4	N23 4	N31 3	N39 0	N47 0	N55 3	N63 7
<b>T02</b> T51 / CCA	N08 3	N16 4	N24 1	N32 2	N40 2	N48 0	N56 4	<b>N64</b> 9

In **Tabelle 3** werden die gefundenen Polymorphismen für 6 nicht verwandte Breitmaulnashörner angegeben. Die in der Studie verwendeten Primorkombinationen sind mit einem Ausrufezeichen versehen und dunkel markiert, andere in Frage kommende Primerkombinationen sind hell markiert.

Für den Reaktionsansatz pro Primerkombination wurde folgendes Arbeitsprotokoll verwendet:

	Volumina in µl
Prä-Amplifikation	5
Primer E + NNN* (15 ng/µl)	1
Primer T + NNN (30 ng/µl)	1
DNA-Polymerase (2 U/µl)	0.25
dNTP (10 mM)	0.5
Puffer 10x	2
H <sub>2</sub> O	<u>10.25</u>
Gesamtvolumen:	20.00

Pro Probe wurde aus 10.25 µl destilliertem Wasser, 2 µl PCR Puffer, 0.5 µl dNTP, 0.25 µl DNA- Polymerase, 1 µl des IRD (Infrared Dye) markierten Primers E + NNN\* (15 ng/µl) und 1 µl des nicht markierten Primers T + NNN (30 ng/µl) ein Prämix hergestellt und auf Eis gesetzt. Das Volumen von 20 µl Prämix pro Probe wurde jeweils in ein 0.5 ml Tube überführt und mit 5 µl Template aus der selektiven Amplifikation gemischt. Die Proben wurden mit 1 Tropfen Öl überschichtet und in den Cycler gestellt. Der Cycler hatte folgende Programmierung:

1.)	4.)	6.)
2x 94 ° 1'	3x 94 ° 30"	1x 94 ° 30"
65 ° 30"	62 ° 30"	58 ° 30"
72 ° 1'30"	72 ° 1'30"	72 ° 1'30"
2.)	5.)	94 ° 30"
2x 94 ° 30"	1x 94 ° 30"	57 ° 30"
64 ° 30"	61 ° 30"	72 ° 1'30"
72 ° 1'30"	72 ° 1'30"	7.)
3.)	94 ° 30"	24x 94 ° 30"
3x 94 ° 30"	60 ° 30"	56 ° 30"
63 ° 30"	72 ° 1'30"	72 ° 1'30"
72 ° 1'30"	94 ° 30"	8.)
	59 ° 30"	1x 72 ° 3'
	72 ° 1'30"	40 ° 5'

Während der PCR Reaktion erfolgt der erste Denaturierungsschritt zur Auftrennung des DNA-Doppelstranges in die beiden Einzelstränge bei 94 °C für 1 Minuten, dann erfolgt die Anlagerung der Primer (Annealing) bei 65 °C für 30 Sekunden, die Kettenverlängerung bei 72 °C für 1,5 Minuten, während 2 Zyklen, anschließend werden weitere 2 Zyklen auf dieselbe Weise mit einer Annealing Temperatur von 64 °C programmiert, 3 Zyklen mit einer Annealing Temperatur von 63 °C und 62 °C und jeweils 1 Zyklus mit Absteigender Annealing Temperatur von 61 °C bis 57 °C, worauf 24 Zyklen mit einer Annealing Temperatur von 56 °C folgen. Am Ende kommt es in 3 Minuten bei 72 °C zur vollständigen Kettenverlängerung und es wird für 5 Minuten auf 40 °C abgekühlt.

Für die Auftrennung im LICOR DNA-Sequencer wird den Proben jeweils 10 µl Formamid + Blaupuffer zugegeben. Bevor die Proben auf das Polyacrylamidgel aufgetragen werden, werden sie für 3 Minuten bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt, um die Fragmente einzelsträngig zu haben.

### 3.2.9 Meßgerät

Die Messungen wurden auf einem LI-COR DNA Sequencer Model 4000L, vertrieben durch die Firma MWG Biotech, Ebersberg, durchgeführt. Die amplifizierten Fragmente wurden über ein 0,25 mm dickes und 25 cm langes, denaturierendes Polyacrylamidgel nach Basenpaargrößen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in etwa proportional zum Molekulargewicht der DNA-Fragmente (Mertes et al., 1997). Die Fragmente sind mit einem Infrarot-Farbstoff markiert (infra red dye, IRD). Sie werden, nachdem sie die gesamte Länge des Gels durchwandert haben, am unteren Ende des Gels mittels einer Laserdiode gemessen. Die Daten wurden im zum LI-COR gehörenden Computerprogramm Base ImageIR, Version 4.0 automatisch gespeichert.

Für die Elektrophorese wurde 1x TE Puffer verwendet, welcher sich in 2 Behältern befindet, die oberhalb und unterhalb des Gel befestigt sind. Es wurde eine Spannung von 1100 V angelegt, bei einer Stromstärke von 37 mA und einer Leistung von 40 W. Das Gel wurde während des Laufes konstant bei einer Temperatur von 50 °C gehalten, und es wurde mit ca. 12 Frames gemessen.

Zusammensetzung des Acrylamidgels (25 cm/ 0,25 mm):

Sequagel XR (6 %)	30 ml
Sequagel Puffer	7,5 ml
DMSO	400 µl
APS 10 %	300 µl

## 3.2.10 Auswertung

### 3.2.10.1 Dominanz

AFLP Marker sind, genauso wie RAPD Marker, für gewöhnlich dominant, d. h. Banden können nur als vorhanden oder fehlend gewertet werden (Milbourne et al., 1997; Mueller & Wolfensbarger, 1999). Dies bedeutet, daß heterozygote Tiere nicht von Homozygoten unterschieden werden können. Einzeltiere können nur dadurch unterschieden werden, daß ihnen an bestimmten AFLP Loci Banden fehlen oder diese Banden vorhanden sind. Gemeinsame Banden lassen hier auf einen gemeinsamen Ursprung des Markers schließen. Der Verlust einer Bande hingegen kann verschiedene Ursachen haben, wie z. B. eine Mutation im Bereich der Restriktionsstelle oder der selektiven Nukleotide, d. h. er zeigt, daß Variabilität vorhanden ist. Im Vergleich zu codominanten Markern, wie z. B. RFLP oder Mikrosatelliten, ist der Informationsgehalt der AFLP Polymorphismen wesentlich geringer. Dieser geringere Informationsgehalt kann jedoch für die statistische Auswertung durch die große Anzahl amplifizierter AFLP Marker pro Reaktion und durch eine größere Probenanzahl ausgeglichen werden. Um eine statistisch aussagekräftige Anzahl von Markern zu erhalten, müssen mehr dominante Loci ausgewertet werden, als dies für codominante der Fall wäre (Bild 13), d. h. es sollten je nach Frequenz mindestens 50 Marker verwendet werden und Loci, die bei weniger als 3 Tieren den Phänotyp 0 zeigen, entfernt werden (Sharbel, 1999). Zeigen bei 50 Tieren nur 3 Tiere den Phänotyp 1, ist es sehr wahrscheinlich, daß diese Tiere im Genotyp heterozygot sind. Die Frequenz des rezessiven Locus *p* wird somit sehr klein, so daß auch hier die statistische Aussagekraft dieser Marker nur sehr gering ist.

### 3.2.10.2 Codominanz

Codominante Marker ermöglichen die Unterscheidung für ein Merkmal zwischen homozygoten und heterozygoten Tieren. Durch definierte Reaktionsmethoden in Kombination mit technischen Verbesserungen im Bereich der Datenverarbeitung, Messung und Sichtbarmachung der AFLP Proben, wurde es möglich, auch quantitative Aussagen zu treffen. So kann in Abhängigkeit vom Meß-System auch für

AFLP bei einer Bandenintensität (Peakhöhe) von 50 % im Vergleich zu Homozygoten eine Aussage über heterozygote Tiere gemacht werden. Dies wird möglich, da Unterschiede in der DNA Konzentration am Anfang keine unterschiedlichen Ergebnisse bei der Messung der AFLP Banden am Schluß ergeben, da der markierte Primer vollständig aufgebraucht wird. Es muß jedoch ausgeschlossen werden, daß Unterschiede in der Bandenintensität durch das Experiment selbst oder durch Schwankungen des Meßgerätes entstehen. So sollten sich für den AFLP Locus eines diploiden Organismus 3 verschiedene, genau meßbare Stadien der Bandenintensität ergeben, doppelt für den Genotyp 1/1, einfach für 0/1 und null für 0/0 (Sharbel, 1999; Vos & Kuiper, 1997). Mit dem in dieser Studie verwendeten Meßgerät LI-COR DNA Sequencer und der verwendeten Software erscheint eine quantitative Detektion der Banden derzeit problematisch. Detaillierte Informationen über die Stammbäume und Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten Tiere können es ebenfalls ermöglichen, AFLP Marker als codominante Marker auszuwerten und somit eine genauere Schätzung der Allelfrequenz zu erzielen (Ajmone-Marsan et al., 1997; Krauss, 1999; Mueller & Wolfensbarger, 1999). Für Nashörner liegen diese Informationen leider nicht vor.

### 3.2.10.3 Programme

- Base Image IR 4, LICOR, Vertrieb über MWG Biotech, Ebersberg
- RFLPscan Plus-Version 3.0, Scanalytics, Vertrieb über MWG Biotech, Ebersberg
- CYRILLIC 1.13 pedigree editor
- PHYLIP (Felsenstein, 1993)
- Tree View (Win 32) 1.52 (Page, 1998)
- Fortran, zwei speziell für diese Arbeit programmierte Auswertungsprogramme (Medjugorac, 2000; nicht publizierte Arbeit)

### 3.2.10.4 Standard

Das Sequenziergerät erkennt infrarotfluoreszierende Fragmente (IRD). Um diese definierten Größen zuordnen zu können, wird für die Proben ein externer Längensstandard mit genau definierten infrarotfluoreszenzmarkierten Fragmenten benötigt.

Der hier verwendete Standard wurde mit dem Farbstoff IRD 800 (MWG Biotech, Ebersberg) markiert. Mittels einer PCR wurden 23 IRD-markierte Fragmente genau definierter Länge im Institut für Tierzucht der Tierärztlichen Fakultät hergestellt. Grundlage dieser Fragmente bildete DNA des Phagen M13MP18 mit den folgenden Primersequenzen:

Fragmentlänge	Primersequenz	Gruppe 1:
50 bp (49 bp)	5'- GCG GAT AAC AAT TTC ACA - 3'	
75 bp (74 bp)	5'- GCT CGT ATG TTG TGT GGA - 3'	
100 bp (99 bp)	5'- CCA GGC TTT ACA CTT TAT - 3'	
105 bp (104 bp)	5'- GCA CCC CAG GCT TTA CAC - 3'	
120 bp (119 bp)	5'- TAG CTC ACT CAT TAG GCA - 3'	
145 bp (144 bp)	5'- TGA GCG CAA CGC AAT TAA - 3'	
175 bp (174 bp)	5'- CGA CAG GTT TCC CGA CTG - 3'	
200 bp (199 bp)	5'- GGC CGA TTC ATT AAT GCA - 3'	
204 bp (203 bp)	5'- CGT TGG CCG ATT CAT TAA - 3'	
230 bp (229 bp)	5'- CAA TAC GCA AAC CGC CTC - 3'	
255 bp (254 bp)	5'- TGA AAA GAA AAA CCA CCC - 3'	
300 bp (298 bp)	5'- AGG GCC AGG CGG TGA AGG - 3'	
325 bp (324 bp)	5'- GTG GAC CGC TTG CTG CAA - 3'	
350 bp (349 bp)	5'- TTT TCG CCT GCT GGG GCA - 3'	

Gegenprimer:

POS G212 5'- GAA TTC GTA ATC ATG GTC ATA GCT GT - 3'

Der IRD-800 markierte Gegenprimer zu den Primern der ersten 14 Fragmente (Gruppe 1) heißt POS G212 und wurde von MWG Biotech, Ebersberg, hergestellt. Der Gegenprimer der restlichen 10 großen Fragmente (Gruppe 2) ist der IRD-800 markierte Primer -49-Reverse, der ebenfalls von MWG Biotech hergestellt wurde. Damit ergeben sich 24 Standardfragmente, die den Bereich von 50 bis 838 Basenpaaren abdecken.



Fragmentlänge	Primersequenz	Gruppe 2:
375 bp	5'- TCG TAA CCG TGC ATC TGC CAG TTT G - 3'	
425 bp	5'- ACG GCG GAT TGA CCG TAA TGG GAT A - 3'	
460 bp	5'- CGA GTA ACA ACC CGT CGG ATT CTC - 3'	
500 bp	5'- GGC CTT CCT CTA GCC AGC TTT CAT C - 3'	
510 bp	5'- ATT CGC GTC TGG CCT TCC TGT AG - 3'	
544 bp	5'- CAT TTT TTA ACC AAT AGG AAC GCC ATC - 3'	
635 bp	5'- CCC AAA AAC AGG AAG ATT GTA TAA G - 3'	
693 bp	5'- CGG TAA TCG TAA AAC TAG CAT GTC - 3'	
785 bp	5'- TTA ATG CCG GAG AGG GTA GCT A - 3'	
838 bp	5'- CGG AGA CAG TCA AAT CAC CAT CA - 3'	

Gegenprimer:

-49-Reverse 5'- GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG<sup>3</sup>

Folgendes PCR-Protokoll wurde für den Standard verwendet:

Puffer	1x	(Sigma, Deisenhofen)
dNTP	200 µM	(Peqlab, Erlangen)
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	(Sigma, Deisenhofen)
Primer	je 0.5 µM	
Taq-Pol	0.5 U	(Sigma, Deisenhofen)
M13MP18-DNA	50 ng	(MBI Fermentas)

Temperaturzyklen des Thermocyclers:

1x	94 °C	4'
35x	94 °C	1'
	55 °C (für POS G212)	1' bzw. (für -49-Reverse) 60 °C 1'
	72 °C	1'
1x	72 °C	7'
	4 °C	5'

Die einzelnen PCR-Produkte wurden gemischt. Von den längeren Fragmenten von 375 bis 838 Basenpaaren wurde jeweils die doppelte Menge eingesetzt. Pro Probe wurde 1 µl dieser Fragmentmischung als externer Längenstandard eingesetzt.

### 3.2.11 Populationsgenetische Auswertung

#### 3.2.11.1 Anzahl der Allele und Allelfrequenz

Die Allelfrequenz wurde durch Auszählen der rezessiven 0 Phänotypen bzw. der 0/0 Genotypen für jede der 5 Populationen ermittelt. Die Frequenz des 0 Allels berechnet sich nach Falconer (1984) aus dem rezessiven Genotypen  $q^2$  als :

$$q = \sqrt{q^2}$$

Diese Allelfrequenzberechnung untersteht dem Hardy Weinberg Gesetz und setzt ein Hardy Weinberg Gleichgewicht (HWG) voraus. Diese Annahme ist nicht immer richtig, aber sie bietet die einzige Möglichkeit, die Allelfrequenz dominanter Loci zu berechnen. Die Allelfrequenz gilt hier als Grundlage für die Abschätzung aller weiterer populationsgenetischer Parameter. Anhand der Allelfrequenzen der Einzelloci kann die durchschnittliche Allelfrequenz der Gruppe berechnet werden, mit deren Hilfe eine Aussage über die erwartete genetische Variabilität innerhalb der Gruppe gemacht werden kann (Reeve et al., 1992).

Eine Bande wurde als ein Locus mit 2 Allelen betrachtet und Fragmente der gleichen Größe wurden als gleiches Allel gewertet. Es wurde davon ausgegangen, daß die Segregation polymorpher Fragmente nach den Mendelschen Regeln erfolgt und daß für die Nashornpopulation ein Hardy-Weinberg Gleichgewicht vorliegt.

Die Banden wurden visuell ausgewertet, wobei jede klar erkennbare Bande als ein dominanter Phänotyp mit 1 oder wenn nicht vorhanden mit 0 als rezessiver Phänotyp bewertet wurde. Der dominante Phänotyp kann sowohl für den Genotypen 1/1 als auch 1/0 stehen und er wird durch  $p$  ausgedrückt. Für die innerartliche Auswertung wurden nur die besten polymorphen Loci benutzt, die sich klar voneinander unterscheiden ließen. Für das Südliche Weiße Nashorn ( $n=125$ ) wurden nur Loci gewertet, die über die ganze Population verteilt bei mindestens 3 Tieren den

Phänotypen 1 bzw. den Phänotypen 0 zeigten. Für die übrigen Populationen wurden alle polymorphen Loci gewertet. Die Banden, die innerhalb der Arten klar differenzierbare Polymorphismen zeigten, wurden anhand eines externen Standards Basenpaargrößen zugeordnet. Es wurden nur Banden ausgewertet, die sich klar einer bestimmten Basenpaargröße zuordnen ließen, um zu vermeiden, daß durch leicht abweichendes Laufverhalten der Banden auf verschiedenen Gelen Fehler auftreten, da sich die Basenpaargrößen auf verschiedenen Gelen teilweise um 1 bis 2 Fragmentlängen unterscheiden können. In jeder Primerkombination wurden die Marker nach der Primerkombination und den Basenpaargrößen der Banden, die Polymorphismen zeigten, benannt.

### 3.2.11.2 Genetische Ähnlichkeit und Genetische Distanzen innerhalb und zwischen Arten

Die Auswertung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Für jede Nashornart und Unterart wurden von 3 Tieren für alle 12 Primerkombinationen alle Banden zwischen 50 und 510 Basenpaargrößen ausgezählt. Danach wurde verglichen, wieviele monomorphe und polymorphe Banden innerhalb der Art vorhanden sind und wie viele Banden zwischen den Arten gleich oder voneinander abweichend sind.

Die genetische Ähnlichkeit ( $G_s$ ) wird nach Nei & Li (1979) und Hill et al. (1996) wie folgt berechnet:

$$G_s(i, j) = C(i, j) / N(i, j)$$

$G_s$  beschreibt hier den Anteil der gemeinsamen Banden zwischen Individuum  $i$  und  $j$  und ist somit Index für die genetische Ähnlichkeit.  $C(i, j)$  steht für die Anzahl der gemeinsamen Banden von Individuum  $i$  und  $j$ ,  $N(i, j)$  ist die Gesamtzahl der Banden, die bei Individuum  $i$  und  $j$  festgestellt wurden.

Von jedem der 3 ausgewählten Nashörner jeder der 4 Arten und Unterarten wurden die Banden für alle 12 Primerkombinationen mit jedem anderen Nashorn innerhalb der gleichen Art und zwischen den verschiedenen Arten verglichen. Für jeden Vergleich wurden  $C(i, j)$  und  $N(i, j)$  summiert. Aus der Summe, die sich innerhalb der

Art ergab, wurde der Ähnlichkeitskoeffizient für jedes Arten-Paar und innerhalb der Art berechnet. Zwischen allen Nashörnern verschiedener Arten wurden die gemeinsamen Banden zwischen den Tieren bestimmt und die Gesamtzahl der Banden für jede Art berechnet und summiert. Aus der Summe aller Vergleiche zwischen 2 Arten ergibt sich der Ähnlichkeitskoeffizient zwischen den Arten.

Der Ähnlichkeitskoeffizienten ( $G_s$ ) kann einen Wert von 0 bis 1 annehmen. Ein Wert von 1 bedeutet, dass vollkommene Gleichheit besteht und keine Polymorphismen gefunden wurden. Ein Wert, der nahe bei 1 liegt, zeigt eine große genetische Ähnlichkeit und somit ebenfalls einen hohen Grad an genetischer Verwandtschaft. Ein niedriger Wert, der gegen den Wert 0 geht, bedeutet einen geringen Grad an genetischer Ähnlichkeit. Bei einem Wert von 0 bestünde überhaupt keine Gemeinsamkeit zwischen den untersuchten Tieren.

Aus dem Ähnlichkeitskoeffizienten ( $G_s$ ) kann die genetische Distanz zwischen Tieren unterschiedlicher Populationen und innerhalb einer Population berechnet werden. Sie berechnet sich nach Nei & Li (1979) und Hill et al. (1996) aus dem negativen Logarithmus von ( $G_s$ ) als  $-\ln(G_s)$ . Die genetische Distanz kann theoretisch einen Wert von 0 bis  $\infty$  annehmen. Wenn nur 1 Bande von 1000 Banden gemeinsam ist, liegt  $-\ln(0.001)$  noch bei 6.9, so daß sehr viel höhere Werte unwahrscheinlich sind. Ein hoher Wert bedeutet hier eine große genetische Distanz, d. h. eine geringe genetische Verwandtschaft.

Die Statistik für genetische Distanzen ist nach Nei (1978) relativ unabhängig von der Probenanzahl, wenn genügend Loci untersucht werden. Allerdings muß man hier berücksichtigen, daß genetische Distanzen bei Populationen, die durch einen Flaschenhals gegangen sind, auch manchmal überbewertet werden, da es zu einer kurzzeitigen Beschleunigung der Unterschiede kommen kann (Merenlender et al., 1989; Nei, 1987, S.240).

### 3.2.11.2.1 Eindimensionale Darstellung der genetischen Distanzen

Die eindimensionale Darstellung der genetischen Distanzen ermöglicht es, genetische Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb und zwischen Populationen für das Auge anschaulicher darzustellen, indem Dendrogramme bzw. phylogenetische Bäume konstruiert werden. Hier wurde nach Sneath und Sokal (1973) die Methode des Unweighted Pair Group Method Average (UPGMA) verwendet. Diese Methode hat sich als einfachste und zugleich stabilste Methode etabliert (Nei et al., 1985; Nei, 1987, S.293-295; Rossnagel, 1999) und wird recht häufig zur Darstellung genetischer Distanzen oder genetischer Gleichheit für AFLP Marker verwendet (Hill et al., 1996; Greef et al., 1997; Paul et al., 1997; Krauss, 1999). Die Dendrogramme wurden mit Hilfe des Programmes CONSENSE aus dem Programmpaket PHYLIP (Felsenstein, 1993) konstruiert und mit dem Programm Tree View (Page, 1998) bearbeitet. Um stochastische Fehler, und damit ein Abweichen der konstruierten Bäume von der Wirklichkeit zu vermeiden, kann die Stabilität der Dendrogramme durch verschiedene Methoden überprüft werden (Lanyon, 1985). Hier wurde die Methode des Bootstrapping über Loci verwendet. Bei dieser Methode bildet wiederholtes, zufälliges Resampling der verwendeten Loci die Grundlage für die Distanzschätzung, aus der entsprechend 1000 oder für das Südliche Breitmaulnashorn wegen der großen Probenanzahl nur 500 Bootstrap-Bäume konstruiert werden. Aus der Häufigkeit der entstehenden Teilcluster wird die Stabilität der phylogenetischen Bäume abgeleitet (Felsenstein, 1985).

### 3.2.11.3 Schätzung der genetischen Variabilität innerhalb der Populationen

Die genetische Variabilität innerhalb einer Population kann nach Nei et al. (1975), Nei (1978) und Nei (1987, S. 177) durch den durchschnittlichen Heterozygotiegrad  $H$  beschrieben werden:

$$H = 1 - \sum x_i^2$$

$H$  = Heterozygotiegrad bzw. Maß für genetische Variabilität

$x_i$  = Frequenz des Allels  $i$  in der Population

Der Heterozygotiegrad wurde über alle Loci der 5 Populationen berechnet. Die nach diesem Modell errechnete genetische Variabilität für einen Locus mit 2 Allelen ergibt Werte zwischen 0 und 0.5. Hier beschreibt 0 die geringste genetische Variabilität für einen monomorphen Locus, während der höchste Heterozygotiegrad  $H = 0.5$  für die gleichmäßige Verteilung der Frequenzen über alle Allele an einem Locus steht. Der höchste Wert wird bei  $p = q = 0.5$  erreicht und zeigt die größte genetische Variabilität an. Der durchschnittliche Heterozygotiegrad für mehrere Loci soll die genetische Variabilität im gesamten Genom widerspiegeln.

Geht eine Population durch einen genetischen Flaschenhals (bottleneck), nimmt die Anzahl der Allele in der Population ab, und es wird erwartet, daß der Heterozygotiegrad während der ersten Generationen nach dem Flaschenhals bis zu einem bestimmten, minimalen Wert absinkt. Wie stark dieser Wert abfällt, hängt von der Wachstumsrate der Population ab und davon, wie stark die Population reduziert wurde. Je größer die verbleibende Anzahl von Tieren ist, desto größer ist die Chance, daß Allele mit einer niedrigen Frequenz erhalten bleiben und nicht verlorengehen. Mit zunehmender Größe der Population steigt der Heterozygotiegrad sehr langsam wieder an (Nei et al., 1975).

### 3.2.11.4 Berechnung der Ausschlußwahrscheinlichkeit für den Abstammungsnachweis

Die Ausschlußwahrscheinlichkeit  $P$  beschreibt die Wahrscheinlichkeit, daß ein zufällig ausgewähltes Tier aus der selben Population als Elternteil ausgeschlossen werden kann. Zur Berechnung der Ausschlußwahrscheinlichkeit gibt es verschiedene Formeln, für dominante, rezessive Marker sollten aber beide Elternteile vorhanden sein. Hier wird angenommen, daß die Mutter jedes Nachkommen bekannt ist (Chakraborty et al., 1988). Die Ausschlußwahrscheinlichkeit  $P$  wird anhand der Anzahl und Frequenz der Allele unter verschiedenen Annahmen berechnet. Sie errechnet sich für bialele Loci nach Pirchner (1979) und Falconer (1984) wie folgt:

Codominanter Erbgang:  $PE_C = pq(1-pq)$

Rezessiver Erbgang, für den Fall, daß beide Eltern vorhanden sind:  $PE_R = pq^4$

Hier beschreibt  $PE_C$  die Ausschlußwahrscheinlichkeit für einen codominanten Marker und  $PE_R$  die Ausschlußwahrscheinlichkeit für einen rezessiven Marker. Die Genfrequenz  $p$  steht für den dominanten Genotyp und  $q$  für die Genfrequenz des rezessiven Genotypen.

Um eine ausreichend hohe Ausschlußwahrscheinlichkeit zu erreichen, wird die kombinierte Ausschlußwahrscheinlichkeit  $P$  nach Jamieson & Taylor (1997) verwendet:

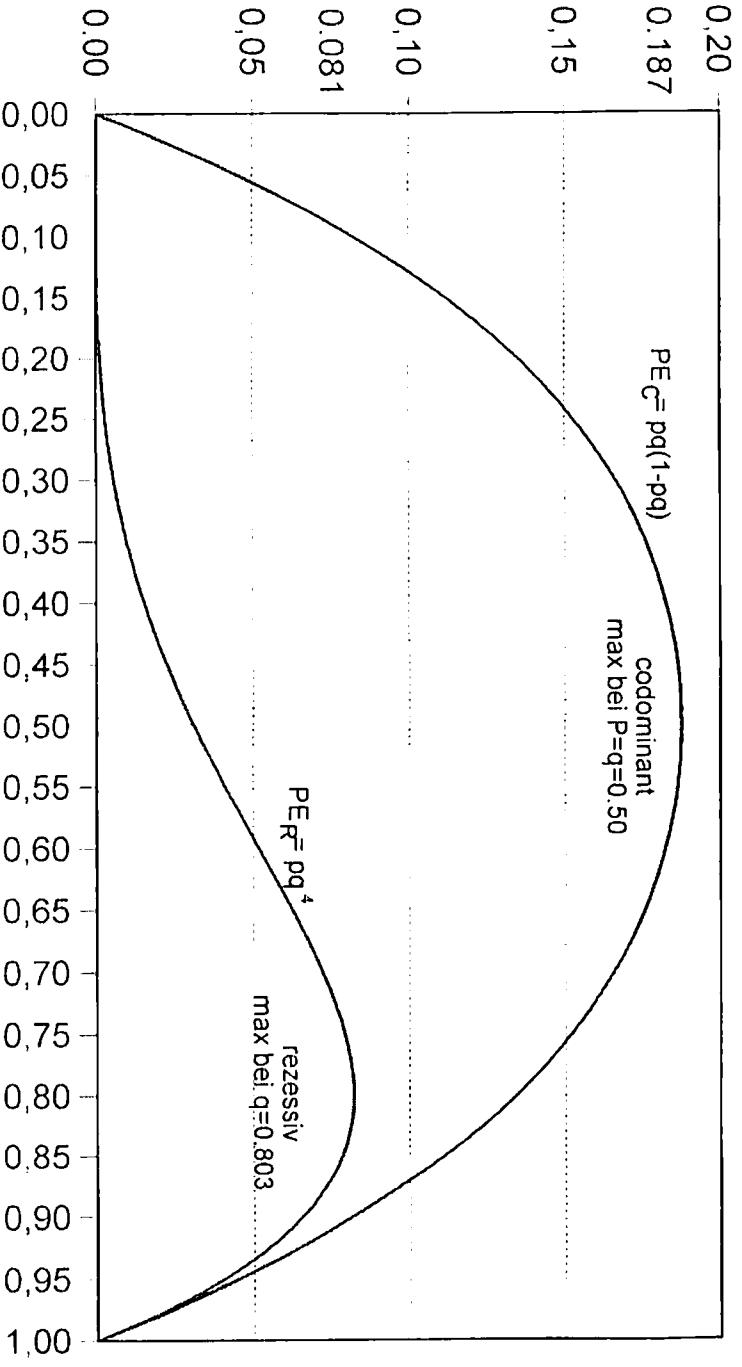
$P = 1 - (1-P_1) (1-P_2) (1-P_3) \dots (1-P_k)$ , nach der  $P_k$  die Ausschlußwahrscheinlichkeit für den Locus  $k$  darstellt.

In der Tierzucht strebt man eine kombinierte Ausschlußwahrscheinlichkeit von mindestens 95 %, besser 99 % an. Wie viele genetische Marker für eine solche Ausschlußwahrscheinlichkeit verwendet werden müssen, hängt jedoch sehr stark davon ab, ob codominante oder dominante, rezessive Marker verwendet werden. Aufgrund des dominant, rezessiven Charakters der AFLP Marker kann nur ein

Abstammungsnachweis erfolgen, wenn sowohl Blut- oder Gewebeproben des Vatertieres, als auch der Mutter für einen Nachkommen vorhanden sind.

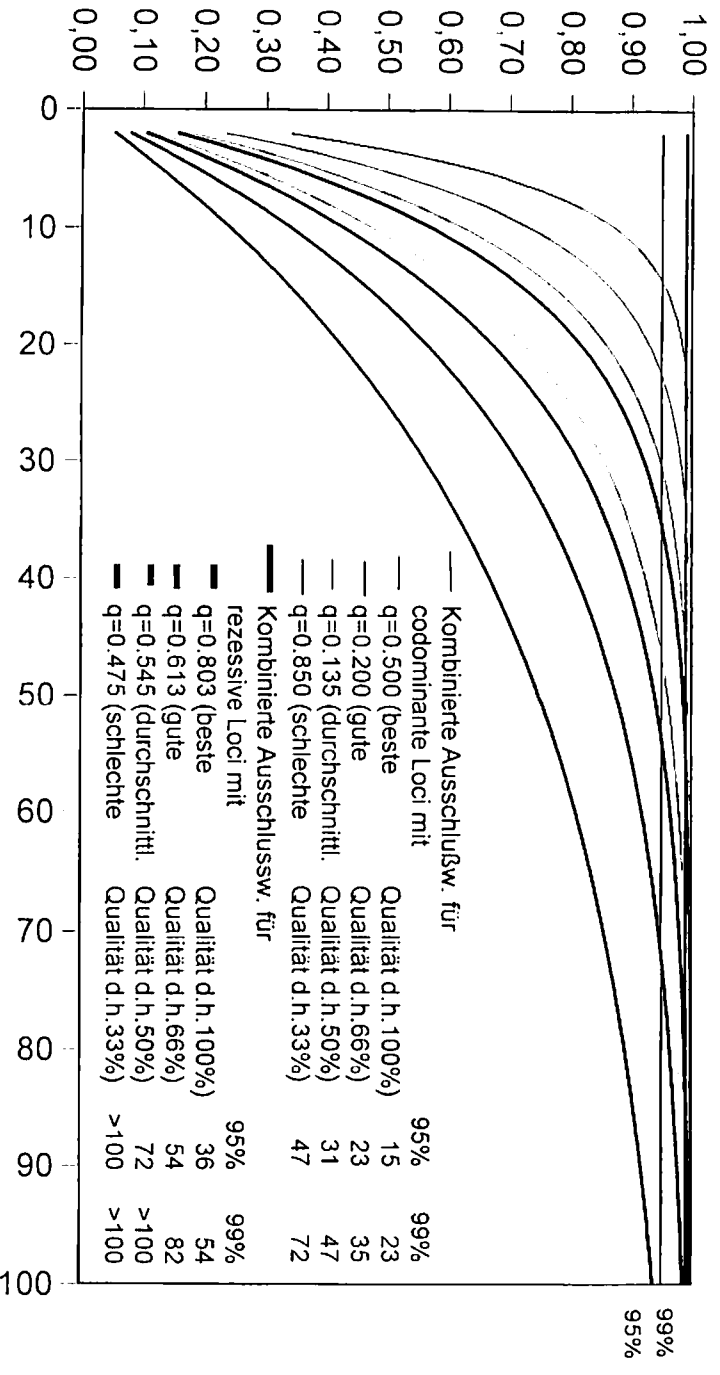
Abbildung 13 und 14 zeigen, daß der Informationsgehalt für dominante Marker wesentlich geringer ist als für codominante, bialele Marker. Wenn man einen Genort mit 2 Allelen betrachtet, zeigen rezessive Marker mit einer Allelfrequenz von  $q = 0.803$  eine maximale Ausschlußwahrscheinlichkeit von 0.081, wohingegen für bialele codominante Marker mit  $q = 0.50$  eine maximale Ausschlußwahrscheinlichkeit von 0.187 erreicht wird (Bild 13). Das heißt, daß für eine maximale kombinierte Ausschlußwahrscheinlichkeit von 95 % oder 99 % wesentlich mehr rezessive Marker, als codominante Marker gebraucht werden. Wie eine Berechnung in Bild 14 zeigt, braucht man für eine gewünschte Mindestausschlußwahrscheinlichkeit von 95 % nur 15 bialele codominante Marker, die höchste Qualität aufweisen ( $p = q = 0.5$ ), aber bereits 36 dominante AFLP Marker der höchsten Qualität ( $p = q = 0.803$ ), d. h. mehr als doppelt so viele. Eine maximale Ausschlußwahrscheinlichkeit von 99 % wird für dominante, rezessive Marker mit durchschnittlicher Qualität ( $p = q = 0.545$ ) auch mit 100 Markern nicht erreicht (Bild 14).

Bild 13: Vergleich der Ausschlußwahrscheinlichkeiten für einen codominanten und rezessiven biallelen Locus in Abhängigkeit zur Allelfrequenz:



Die Formel der rezessiven Marker gilt nur für den Fall, daß beide Eltern vorhanden sind

Bild 14: Vergleich der Ausschlußwahrscheinlichkeit für biallele Loci in Abhängigkeit von der Anzahl der benötigten codominanten (dünne Linie) und rezessiven Marker (dicke Linie), um eine Ausschlußwahrscheinlichkeit von 95% oder 99% zu erreichen :



Die Frequenz des rezessiven Allels (q) mit der höchsten Ausschlußwahrscheinlichkeit pro Locus benötigt hier auch die geringste Anzahl Marker und sie wird somit als beste Qualität mit 100% normiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Reproduzierbarkeit

Die Ergebnisse der AFLP Reaktionen sind reproduzierbar. Um Artefakte zu vermeiden, wurden die Versuche mehrfach wiederholt. Sie zeigten auch bei unterschiedlicher DNA-Extraktion und -Konzentration bei Ansätzen gleicher Primerkombinationen und bei gleichen Tieren immer die gleichen Bandenmuster, auch wenn die Intensität der Banden von Reaktion zu Reaktion etwas abweichen kann. Bedingt durch leicht abweichendes Laufverhalten der Banden auf verschiedenen Gelen und dem verwendeten externen Standard, der bei etwas welligen Gelen zu Ungenauigkeiten führen kann, wurden nur polymorphe Banden gewertet, die sich klar einer bestimmten Basenpaargröße zuordnen ließen und die, anhand ihrer Lage zu monomorphen Banden, nicht mit anderen Banden verwechselt werden konnten.

### 4.2 Ergebnisse der Genotypisierung

AFLP wurde für Nashörner etabliert und die einzelnen Schritte der AFLP Reaktionen wurden optimiert. Es wurden 64 AFLP-Primerkombinationen für 6 Südliche Weiße Nashörner, welche die größte Gruppe im Untersuchungsmaterial darstellen, getestet, um geeignete Primer zu selektieren (Tabelle 3). Von diesen wurden 12 AFLP Primerkombinationen ausgewählt und für alle 156 Nashörner aus 5 Populationen untersucht. Zwei Marker aus einer weiteren Primerkombination wurden nur für den Vaterschaftsnachweis für 31 Weiße Nashörner einer Wildtierfarm in Südafrika herangezogen, um das Signifikanzniveau zu erhöhen. Es ergaben sich durchschnittlich pro Primerkombination und Tier ca. 60 bis 80 klar sichtbare Banden im Bereich des Standards von 50 bis 510 Basenpaarlängen, für manche Primerkombinationen bis in den Bereich von 800 Basenpaarlängen. Es konnten sowohl Polymorphismen zwischen Tieren unterschiedlicher Arten als auch zwischen einzelnen Individuen der gleichen Art beim Nashorn festgestellt werden.

**Tabelle 4: Gesamtanzahl der Banden, die für das Südliche (Css) und Nördliche Weiße Nashorn (Csc), das Schwarze Nashorn (Db) und das Indische Nashorn (Ru), berechnet wurden:**

Banden	1 Css	2 Csc	3 Db	4 Ru
<b>1 Css</b>				
Gesamtzahl	4550	13770	13545	12942
Gemeinsame Banden	4390	12554	7734	5370
Verschiedene Banden	160	1216	5811	7572
Verhältnis der Banden	0.0352			
<b>2 Csc</b>				
Gesamtzahl		4615	13681	13122
Gemeinsame Banden		4432	7774	5366
Verschiedene Banden		183	5907	7756
Verhältnis der Banden		0.0396		
<b>3 Db</b>				
Gesamtzahl			4480	12870
Gemeinsame Banden			4270	4916
Verschiedene Banden			210	7954
Verhältnis der Banden			0.0469	
<b>4 Ru</b>				
Gesamtzahl				4086
Gemeinsame Banden				3982
Verschiedene Banden				104
Verhältnis der Banden				0.0255

In Tabelle 4 wurden gemeinsame Banden und verschiedene Banden sowohl innerhalb als auch zwischen den Populationen für alle 12 ausgewählten Primerkombinationen für eine Probenzahl von 3 Tieren berechnet. Weiter wird das Verhältnis der polymorphen Banden zur Gesamtzahl der Banden innerhalb der Population gezeigt.

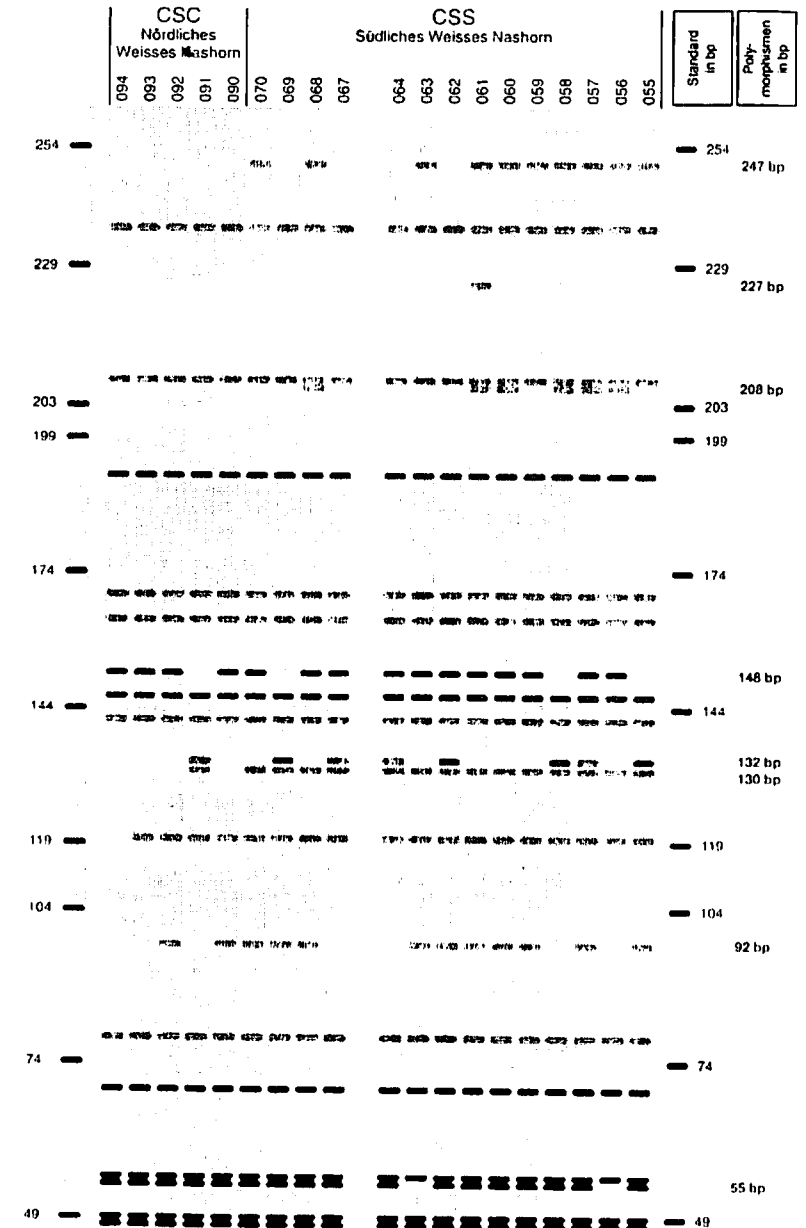
Beim Vergleich einer zufällig ausgewählten Probenzahl von 3 nicht miteinander verwandten Tieren des Südlichen Weißen Nashornes konnten im Bereich von 50 bis 510 Basenpaarlängen für alle 12 ausgewählten Primerkombinationen insgesamt 4.550 Banden festgestellt werden, davon 160 polymorphe Banden (Tabelle 4). Das Verhältnis der polymorphen Banden zur Gesamtzahl der Banden innerhalb dieser Population beträgt 0.0352, d. h. es wurden ca. 3.5 % polymorphe Banden gefunden. Beim Nördlichen Weißen Nashorn waren es für 3 Tiere für 12 Primerkombinationen insgesamt 4.615 Banden, davon 183 polymorphe Banden, welches einem Verhältnis von 0.0396, d. h. ungefähr 4 % entspricht. Für 3 Schwarze Nashörner wurden

insgesamt 4.480 Banden gezählt, davon 210 polymorphe Banden, welches einem Verhältnis polymorpher Banden an der Gesamtzahl der Banden von 0.0469 oder 4.7 % entspricht. Für 3 Indische Nashörner ergaben sich für alle 12 Primerkombinationen 4.086 Banden, davon 104 polymorphe Banden, was einem Verhältnis von 0.0255 oder 2.6 % entspricht (Tabelle 4).

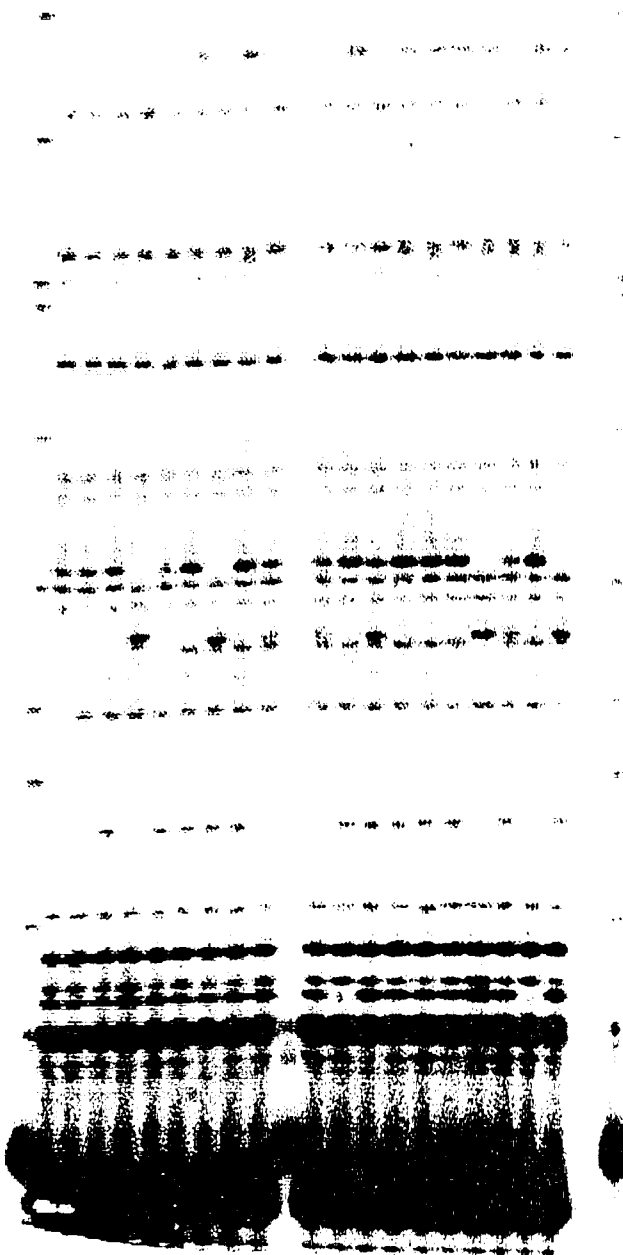
Im Vergleich zwischen 3 Tieren der Unterarten Südliches und Nördliches Breitmaulnashorn konnten insgesamt für alle Primerkombinationen 13.770 Banden gezählt werden, wovon 1.216 Banden unterschiedlich waren (Tabelle 4). Zwischen Südlichen Weißen Nashörnern und Schwarzen Nashörnern wurden insgesamt für beide Arten 13.545 Banden gezählt, davon 5.811 Banden, die sich zwischen den Einzeltieren der beiden Arten unterschieden. Zwischen den Arten Nördliches Weißes Nashorn und Schwarzes Nashorn wurden insgesamt 13.681 Banden ermittelt, wovon sich 5.907 Banden zwischen den Arten unterschieden. Im Vergleich zwischen den Arten Südliches Weißes Nashorn und Indisches Panzernashorn konnten insgesamt 12.942 Banden für beide Arten zusammen ermittelt werden, wovon nur 5.366 Banden gemeinsam sind. Für die Arten Nördliches Weißes Nashorn und Indisches Panzernashorn konnten insgesamt 13.122 Banden ermittelt werden, wovon 5.366 Banden gemeinsam sind. Zwischen den Arten Schwarzes Nashorn und Indisches Panzernashorn wurden 12.870 Banden festgestellt, wovon 4.916 Banden gemeinsam für beide Arten vorkommen (Tabelle 4).

Wie **Abbildung 15** und das entsprechende **Original-Gel** (Bild 16) am Beispiel von Primerkombination N02 zeigen, haben die beiden Unterarten Nördliches und Südliches Weißes Nashorn ein sehr ähnliches Bandenmuster, sie konnten jedoch durch fast alle Primerkombinationen klar anhand von fehlenden oder zusätzlich vorhandenen Banden voneinander unterschieden werden. Die größten Unterschiede konnten anhand der Primerkombinationen N02 und N25 mit 5 unterschiedlichen Banden festgestellt werden. Nur die Primerkombination N03 zeigte innerhalb der 12 ausgewählten Primerkombinationen keine Unterschiede (Tabelle 3).

**Bild 15: Schematische Darstellung der Bandenmuster des Nördlichen und Südlichen Breitmaulnashornes im Vergleich und Polymorphismen in Basenpaargrößen (bp) für Primerkombination N02:**



**Bild 16: Original LI-COR Gelbild der Bandenmuster des Nördlichen und Südlichen Breitmaulnashornes im Vergleich für Primerkombination N02:**



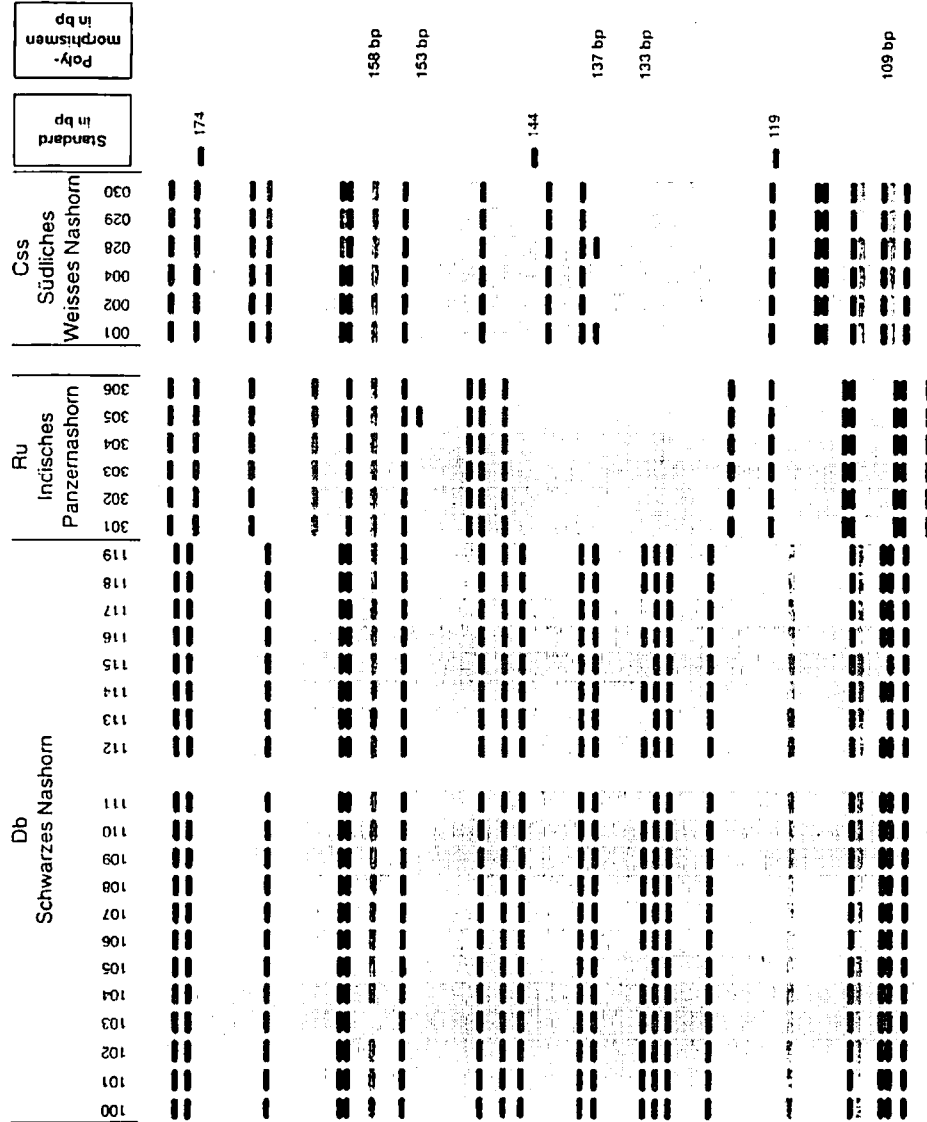
Es wurden Banden zur Unterscheidung herangezogen, die jeweils bei der anderen Unterart Südliches oder Nördliches Weißes Nashorn nicht vorkamen. Für das Nördliche Weiße Nashorn wurden auch polymorphe Banden gewertet, die beim Südlichen Weißen Nashorn mit einer wesentlich größeren Probenzahl ( $n=125$ ) zwar ebenfalls vorhanden waren, an dieser Stelle jedoch keine Polymorphismen zeigten. Bei Polymorphismen, die nur bei einer der beiden Unterarten vorkommen, muß beachtet werden, daß die Probenzahl beim Nördlichen Weißen Nashorn mit nur 5 Tieren sehr klein ist und somit nicht alle Allele dieser Population repräsentiert werden.

Auf Bild 15 kann man für Tier 094 bei 119 bp eine fehlende Bande erkennen, die bei allen anderen Tieren vorhanden ist. Für das Nördliche und Südliche Breitmaulnashorn können auf diesem Bild im Bereich von 92 bp, 130 bp, 132 bp und 148 bp bei beiden Unterarten polymorphe Banden festgestellt werden, während im Bereich von 55 bp, 208 bp, 227 bp und 247 bp polymorphe Banden nur beim Südlichen Breitmaulnashorn vorkommen und im Bereich von 130 bp nur beim Nördlichen Breitmaulnashorn.

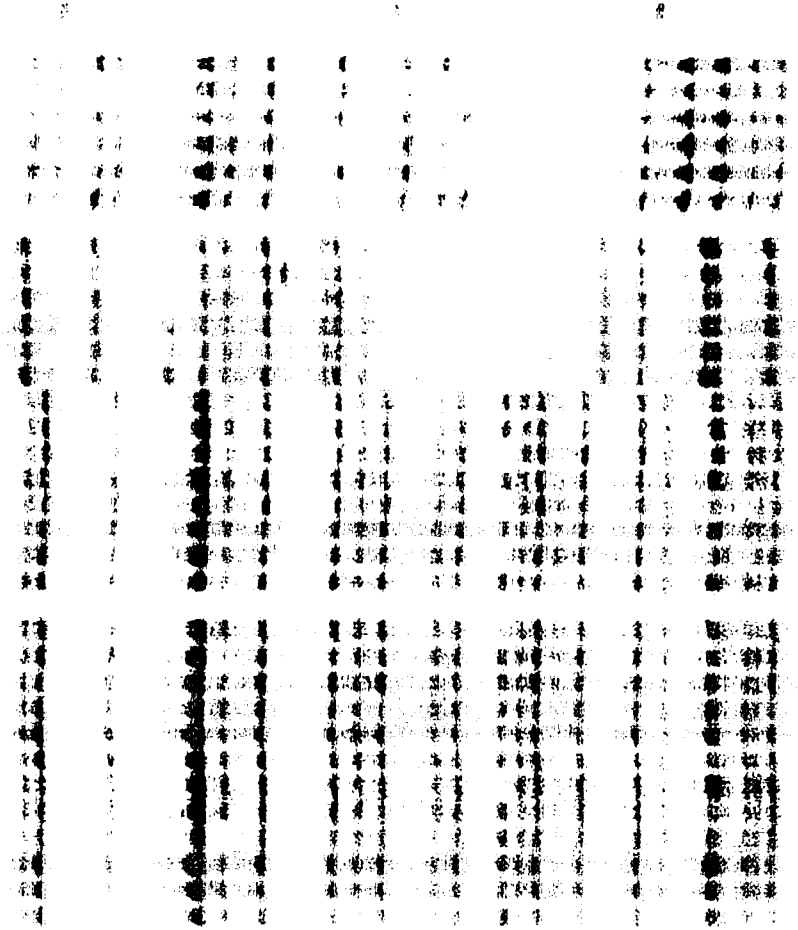
Abbildung 17 und das entsprechende Original Gel (Bild 18) zeigen, daß bei einer Primerkombination, in dem Fall N26, für die verschiedenen Nashornarten sehr unterschiedliche Bandenmuster entstehen und daß sie somit klar voneinander unterschieden werden können. Dieser zufällig ausgewählte Bildausschnitt zeigt auch, daß zwischen den beiden afrikanischen Arten, dem Schwarzen Nashorn und dem Südlichen Weißen Nashorn mit 13 Banden mehr gemeinsame Banden vorhanden sind und somit ein ähnlicheres Banden-Muster besteht, als zwischen den Südlichen Weißen Nashörnern und den Indischen Panzernashörnern mit 10 gemeinsamen Banden und zwischen Schwarzen Nashörnern und Indischen Panzernashörnern mit 6 gemeinsamen Banden. Auch die Polymorphismen sind bei den 3 hier gezeigten Arten an ganz unterschiedlichen Stellen. So zeigt das Breitmaulnashorn im Bereich von 137 bp polymorphe Banden, während nur Tier 305 beim Indischem Panzernashorn bei 153 bp eine polymorphe Bande aufweist. Beim Spitzmaulnashorn kann man im Bereich von 109 bp, 133 bp und 158 bp polymorphe Banden erkennen.



**Bild 17: Schematische Darstellung der Bandenmuster des Schwarzen Nashornes, des Indischen Panzernashornes und des Südlichen Breitmaulnashornes im Vergleich und Polymorphismen in Basenpaargrößen (bp) für Primerkombination N26:**



**Bild 18: Original LI-COR Gelbild der Bandenmuster des Schwarzen Nashornes, des Indischen Panzernashornes und des Südlichen Breitmaulnashornes im Vergleich für Primerkombination N26:**



### 4.3 Anzahl polymorpher Loci

Die Anzahl der Allele wurde durch Auszählen der polymorphen Banden für jede der 5 Populationen ermittelt. Eine Bande wurde als ein bialleler Locus betrachtet, der entweder für den Genotyp 1/1 oder 1/0 den dominanten Phänotyp 1 zeigt oder für den Genotyp 0/0 den rezessiven Phänotyp 0. Der dominante Phänotyp wird als  $p$  beschrieben und der rezessive Phänotyp als  $q$ . Fragmente der gleichen Größe wurden als gleicher Locus gewertet. Es wurden nur Banden in die Wertung aufgenommen, die klar differenzierbare Polymorphismen zeigten. Für das Südliche Weiße Nashorn wurden nur Banden gezählt, die über die ganze Population verteilt bei mindestens 3 Tieren vorkamen. Bei den übrigen Nashörnern wurden alle polymorphen Banden gewertet. Die Ergebnisse werden in **Tabelle 5** aufgezeigt.

Für 125 Südliche Weiße Nashörner wurden 71 polymorphe Banden innerhalb der ausgewählten 12 Primerkombinationen gewertet mit einem Durchschnitt von 5.90 Banden pro Primerkombination (Tabelle 5). Hier konnte man anhand von Primerkombination N02 und N41 mit jeweils 10 polymorphen Banden die größte Anzahl Polymorphismen zeigen. Für das Nördliche Weiße Nashorn konnten nur 37 polymorphe Banden in der gesamten Population gezählt werden, mit einem Durchschnitt von 3.08 polymorphen Banden pro Primerkombination, wobei N25 mit 8 polymorphen Banden die höchste Aussagekraft aufwies. Diese geringe Anzahl gewerteter polymorpher Banden im Vergleich zum Südlichen Weißen Nashorn kann auf die geringe Probenanzahl von nur 5 Tieren zurückzuführen sein, da nicht alle in der Gesamtpopulation vorkommenden Allele bei so wenigen Tieren vorhanden sein können. Für 20 Schwarze Nashörner wurden für alle 12 Primerkombinationen zusammen 106 polymorphe Banden festgestellt und somit die höchste Zahl an Polymorphismen innerhalb der untersuchten Arten. Es ergab sich ein Durchschnitt von 8.83 polymorphen Banden pro Primerkombination. Durch die Primerkombinationen N03 und N59 mit 14 und 12 Polymorphismen konnte die größte Anzahl polymorpher Banden nachgewiesen werden. Trotz der geringen Probenanzahl von 6 Tieren konnten für das Indische Nashorn 54 polymorphe Banden gezählt werden mit einem Durchschnitt von 4.50 polymorphen Banden pro Primerkombination, wobei die Primer N02 und N27 mit 10 polymorphen Banden die höchste Aussagekraft zeigten (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Anzahl gewerteter polymorpher Banden für 12 ausgewählte AFLP Primerkombinationen in 4 Nashornpopulationen:**

	Primer- kombination	Südliches	Nördliches	Schwarzes	Indisches	Ø Loci/ Primer
		Weißes Nashorn/ Ccs (n=125)	Weißes Nashorn/ Csc (n=5)	Nashorn/ Db (n=20)	Panzer- nashorn/ Ru (n=6)	
1	N02	10	5	8	10	8.25
2	N03	7	1	14	6	7.00
3	N04	5	3	8	1	4.25
4	N10	6	2	11	2	5.25
5	N25	3	8	9	2	5.50
6	N26	7	1	11	3	5.50
7	N27	5	3	3	10	5.25
8	N28	6	0	9	5	5.00
9	N41	10	4	8	3	6.25
10	N52	2	2	8	3	3.75
11	N57	4	3	5	8	5.00
12	N59	6	5	12	1	6.00
Summe		71	37	106	54	
Ø Banden / Population		5.90	3.08	8.83	4.50	

Tabelle 5 zeigt die Anzahl der Proben (n=) in jeder Population, für die polymorphe Banden ausgewertet wurden, durchschnittliche Anzahl polymorpher Loci über alle Populationen für eine Primerkombination (Ø Loci/ Primer) und durchschnittliche Anzahl Banden in einer Population (Ø Banden/ Population).

#### 4.4 Allelfrequenzen

Die Allelfrequenz gilt als Grundlage für die Schätzung populationsgenetischer Parameter. Über sie wird unter anderem der Heterozygotiegrad und die Qualität der Marker für den Abstammungsnachweis bestimmt. Die Qualität der einzelnen Marker entscheidet wiederum darüber, wie viele Marker für einen Abstammungsnachweis erforderlich sind. So werden für rezessive Marker der besten Qualität mit  $q = 0.803$  für einen Abstammungsnachweis mit 99 % Wahrscheinlichkeit ca. 54 Marker gebraucht (Bild 14). Da die gefundenen Allelfrequenzen niedriger sind und naturgemäß nicht alle Marker in dieser Studie die gleiche Qualität aufweisen, ist auch die entsprechende Anzahl der benötigten Marker wesentlich höher.

**Tabelle 6:** Durchschnittliche Frequenz der rezessiven Allele ( $q$ ), durchschnittlicher Heterozygotiegrad ( $H$ ), Ausschlußwahrscheinlichkeit für rezessive Marker ( $PE_R$ ) und kombinierte Ausschlußwahrscheinlichkeit ( $P$ ):

Population	Anzahl Individuen $N$ / Marker	rezessive Allelfrequenz $q$	Heterozygotiegrad $H$	Ausschlußwahrsch. $PE_R$	kombinierte Ausschlußw. $P$
Css	69 / 71	0.60	0.36	0.0403	0.96
Csw	56 / 73	0.60	0.36	0.0426	0.96
Csc	5 / 37	0.65	0.40	0.0545	0.90
Db	20 / 106	0.68	0.31	0.0464	0.99
Ru	6 / 54	0.65	0.38	0.0539	0.95

In Tabelle 6 wird die Anzahl der Individuen ( $N$ ) und der zur Berechnung verwendeten Marker für die Zoo- (Css) und Wildpopulation (Csw) des Südlichen Breitmaulnashornes, für die Population Nördliches Breitmaulnashorn (Csc), Spitzmaulnashorn (Db) und Indisches Panzernashorn (Ru) angegeben.

Im Durchschnitt lag die Allelfrequenz für die Wild- und Zoopopulation des Südlichen Weißen Nashornes bei 0.60 (Tabelle 6). Diese Allelfrequenz von 0.6 entspricht einer Ausschlußwahrscheinlichkeit von  $0.4 \times 0.6^4 = 0.05184$  und es werden 63.3 % der

maximalen Ausschlußwahrscheinlichkeit (0.0819) erreicht. Die Allelfrequenz gilt also für rezessive Marker als relativ gut (Bild 13). Auch das Nördliche Weiße Nashorn liegt mit einer durchschnittlichen Allelfrequenz von 0.65 in diesem Bereich, sowie das Schwarze Nashorn mit 0.68 und das Indische mit einer durchschnittlichen Allelfrequenz von 0.65 (Tabelle 6). Die Allelfrequenzen für die einzelnen Loci sind im Anhang nachzulesen.

#### 4.5 Heterozygotiegrade

Der durchschnittliche Heterozygotiegrad  $H$  kann nach Nei et al. (1975) und Nei (1978) als Anhaltspunkt dafür genommen werden, wie viel genetische Variabilität oder auch genetische Diversität (Nei, 1987), in einer Population vorhanden ist. Er wurde für jeden Locus anhand der Allelfrequenz berechnet. Da die Werte, in der die möglichen Allelfrequenzen liegen können, auch von der Stichprobengröße abhängen, muß man bei der Betrachtung des Heterozygotiegrades die sehr unterschiedliche Stichprobengröße der in dieser Studie untersuchten Populationen im Auge behalten. Der Heterozygotiegrad hängt zudem von der Verteilung der Allele innerhalb einer Population ab. Er kann bei biallelen Markern Werte von 0 bis 0.5 annehmen, wobei 0 die kleinste genetische Diversität bedeutet mit einem monomorphen Locus und 0.5 für eine gleichmäßige Verteilung der Allele steht.

Wie in Tabelle 6 dargestellt ist, beträgt der durchschnittliche Heterozygotiegrad sowohl für die Wild- (Csw) als auch für die Zoopopulation (Css) des Südlichen Breitmaulnashornes 0.36. Der Wert für die Nördlichen Breitmaulnashörner (Csc) liegt trotz der wesentlich geringeren Probenanzahl mit 0.40 höher als beim Südlichen Breitmaulnashorn. Für das Spitzmaulnashorn (Db) wurde ein durchschnittlicher Heterozygotiegrad von 0.31 bestimmt, der im Vergleich zu der sehr hohen festgestellten Anzahl polymorpher Loci, relativ niedrig erscheint. Für das Indische Panzernashorn (Ru) wurde ein Wert von 0.38 berechnet. Im Durchschnitt ergab sich für alle Populationen zusammen ein Heterozygotiegrad von 0.36. Diese relativ hohen Heterozygotie-Werte und die große Anzahl festgestellter polymorpher Loci innerhalb der einzelnen Populationen, kann als Hinweis dienen, daß in diesen Nashornpopulationen noch eine recht große genetische Variabilität vorhanden ist.

#### 4.6 Ergebnisse des Abstammungsnachweises

AFLP-Marker werden normalerweise als dominant, rezessive Marker gewertet. Wenn eine Bande vorhanden ist, kann bei einer auf dem LI-COR DNA Sequencer gemessenen Bande nicht zwischen Homozygoten 1/1 und Heterozygoten 0/1 unterschieden werden, so daß nur rezessive Banden mit 0/0 zu einem Abstammungsnachweis herangezogen werden können. Ein rezessiver Locus mit 0/0 bei beiden Elterntieren, muß auch für den Nachkommen 0/0 ergeben. Ein Abstammungsnachweis ist aus diesem Grunde nur möglich, wenn beide Elterntiere vorhanden sind.

Um eine hohe Ausschlußwahrscheinlichkeit für einen Abstammungsnachweis zu erreichen, wurde die kombinierte Ausschlußwahrscheinlichkeit nach Jamieson & Taylor (1997) berechnet.

Wie **Tabelle 6** zeigt, ergab sich für das Südliche Breitmaulnashorn (C<sub>ss</sub> + C<sub>sw</sub>) eine kombinierte Ausschlußwahrscheinlichkeit von 96 % und beim Indischen Panzernashorn (R<sub>u</sub>) von 95 %, was als niedrigster erwünschter Ausschlußwert in der Tierzucht gilt. Für das Nördliche Breitmaulnashorn (C<sub>sc</sub>) lag der Wert nur bei 90 %. Für das Spitzmaulnashorn konnte mit über 100 Markern die beste Ausschlußwahrscheinlichkeit von über 99 % erreicht werden, wie dies für kommerzielle Abstammungsnachweise angestrebt wird.

Es wurde eine Gruppe von 21 Nachkommen der Südlichen Breitmaulnashörnern (C<sub>ss</sub>), aus den Familien Beekse Bergen (Bild 6), Hodenhagen (Bild 7), Münster (Bild 8) und Whipsnade (Bild 9), 5 Nachkommen der Spitzmaulnashörner (D<sub>b</sub>) aus den Familien Berlin (Bild 10) und Dvur Kralove (Bild 11 und 12) und 1 Nachkomme aus der Population der Indischen Panzernashörner (R<sub>u</sub>) (Anhang 9.2), die alle aus verschiedenen europäischen Zoologischen Gärten kommen, auf ihre Abstammung hin überprüft. Innerhalb dieser Gruppe von 27 Nachkommen für die von beiden Elterntieren, die durch das Zuchtbuch bekannt sind, Probenmaterial in dieser Studie vorhanden war, zeigte sich nur für ein einziges Tier eine Bande, die eine Abstammung von den vorgegebenen Eltern ausschloß. Da Mutationen vorkommen, sind normalerweise mindestens 2 Banden für den sicheren Ausschluß einer Abstammung nötig. Durch die Übereinstimmung des Abstammungsnachweises für

das Probenmaterial mit bekannten Eltern konnte die Verläßlichkeit und Eignung der AFLP Marker als Abstammungsnachweis bestätigt werden. So konnte ein Nachweis zur besseren Aufklärung der bisher unbekanntenen Populationsstruktur bei einer frei lebenden Population des Südlichen Breitmaulnashornes einer Wildtierfarm in Südafrika durchgeführt werden.

**Tabelle 7: Anzahl der Loci von 13 Südlichen Weißen Nashorn Kälbern einer Wildtierfarm in Südafrika (C<sub>sw</sub>), durch die eine Vaterschaft für jeden der 5 in Frage kommenden Bullen ausgeschlossen werden kann:**

Kalb	Bulle 1	Bulle 2	Bulle 3	Bulle 4	Bulle 5
Labornr.	220	229	240	242	247
252	0	3	4	3	3
257	0	5	4	5	4
259	0	5	3	4	3
218	2	0	1	2	0
246	2	0	1	2	0
214	5	1	0	3	1
222	4	1	0	5	3
249	1	1	0	1	1
228	0	0	0	0	0
236	1	2	1	0	2
241	0	0	0	0	0
209	1	2	2	2	0
212	0	0	0	0	0

Für eine Wildpopulation des Südlichen Breitmaulnashornes auf einer Wildtierfarm in Südafrika sollte für 13 Kälber mit einer bekannten Mutter und fünf als Vatertier in Frage kommenden Bullen ein Abstammungsnachweis durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieses Abstammungsnachweises zeigt **Tabelle 7**. Hier wird dargestellt, daß für Kalb Nummer 212, 228, 241, 252, 257 und 256 vier der fünf möglichen Bullen als Vatertiere mit mehr als 2 Banden ausgeschlossen werden konnten. Diese Tiere

sind in Tabelle 7 dunkel markiert. Auch für die Nachkommen 209, 214, 222, 236 und 249 bleibt nur einer von fünf Bullen als mögliches Vatertier übrig, obwohl sie nur mit einer Bande ausgeschlossen werden konnten, so daß auch hier die Wahrscheinlichkeit recht groß ist, daß es sich hierbei auch wirklich um das Vatertier handelt. Diese Tiere sind durch eine etwas hellere Markierung gekennzeichnet. Nur für 2 der 13 Kälber bleiben 2 mögliche Vatertiere. Um die Ausschlußwahrscheinlichkeit weiter zu erhöhen, müßten noch weitere Primerkombinationen untersucht werden.

#### 4.7 Ähnlichkeit zwischen und innerhalb der Populationen

Verwandtschaftsbeziehungen können durch den Ähnlichkeitskoeffizienten (Gs) ausgedrückt werden, der nach Nei & Li (1979) und Hill et al. (1996) berechnet wurde. Hierfür wurden die Banden von 3 Proben nicht miteinander verwandter Tieren jeder Population verglichen. Ein hoher Wert drückt hier auch einen hohen Grad an genetischer Ähnlichkeit aus und ein kleiner Wert einen geringen Grad an genetischer Verwandtschaft.

**Tabelle 8: Ähnlichkeitskoeffizienten (Gs) innerhalb und zwischen den Populationen des Südlichen (Css) und Nördlichen Breitmaulnashornes (Csc), dem Spitzmaulnashorn (Db) und dem Panzernashorn (Ru):**

	1 Css	2 Csc	3 Db	4 Ru
1 Css	0.964835	0.911692	0.570986	0.414928
2 Csc		0.960347	0.568233	0.408932
3 Db			0.953125	0.381974
4 Ru				0.974547

Es wurden jeweils die Banden von 3 zufällig ausgewählten Nashörnern der gleichen Population verglichen. **Tabelle 8** zeigt, daß innerhalb der 4 untersuchten Populationen das Spitzmaulnashornes (Db) mit 0.953 den kleinsten Ähnlichkeitskoeffizienten aufweist. Im Vergleich zu den anderen 3 Populationen bestehen innerhalb dieser Population am meisten polymorphe Banden und es ist die höchste Variabilität vorhanden. Dies entspricht den Erwartungen, da die Bestandszahlen erst in den letzten Jahrzehnten zurückgingen und somit noch eine große Anzahl seltener

Allele erhalten sein müßte, die genetisch die einstmals wesentlich größere Population repräsentieren (Swart et al., 1994; Foose, 1996; Swart & Ferguson, 1997; International Rhino Foundation, 1999). Dies trifft auch noch in einem etwas geringeren Prozentsatz für das Nördliche Breitmaulnashorn (Csc) zu, das ebenfalls mit 0.960 einen etwas kleineren Wert aufweist, als das Südliche Breitmaulnashorn (Css) mit dem Wert 0.965, von dem gesagt wird, daß es bereits am Anfang diesen Jahrhunderts durch einen genetischen Flaschenhals ging (Walker, 1994; Foose, 1996; International Rhino Foundation, 1999). Den höchsten Ähnlichkeitskoeffizienten mit 0.974 kann man beim Indischen Panzernashorn (Ru) finden (Tabelle 8), das ebenfalls durch einen genetischen Flaschenhals gegangen ist und dessen Bestand sich noch nicht wieder so gut erholt hat, wie der des Südlichen Breitmaulnashornes (Laurie, 1997; International Rhino Foundation, 1999).

Der Ähnlichkeitskoeffizient zwischen den 4 Populationen wurde durch den Vergleich aller Banden der 3 untersuchten Nashörner berechnet, die jedes mit jedem innerhalb und zwischen den Populationen verglichen wurden.

Zwischen den Unterarten Nördliches und Südliches Breitmaulnashorn läßt sich erkennen, daß mit 0.911 ein kleinerer Ähnlichkeitskoeffizient als innerhalb der Arten besteht, d. h. sie können als Unterarten abgegrenzt werden, sie sind jedoch sehr nahe miteinander verwandt (Tabelle 8). Das Schwarze Nashorn ist von diesen beiden Unterarten wesentlich weiter entfernt mit einem Wert von 0.570 bzw. 0.568. Dennoch sind sich die beiden afrikanischen Nashornarten immer noch näher miteinander verwandt, als mit dem Indischen Panzernashorn, das zum Breitmaulnashorn einen Ähnlichkeitskoeffizienten von 0.414 bzw. 0.408 aufweist und zum Spitzmaulnashorn sogar nur von 0.381 (Tabelle 8).

#### 4.8 Genetische Distanzen innerhalb der Populationen

Die genetische Distanz ist eine Form, Unterschiede im Genom innerhalb und zwischen Populationen numerisch und quantitativ auszudrücken (Nei, 1987, S. 208). Die Grundlage für die individuelle Schätzung der Distanz bildet der Anteil gleicher Allele in Bezug auf die Gesamtzahl der gewerteten Allele innerhalb einer Population. Sie berechnet sich nach Nei & Li (1979) und Hill et al. (1996) aus dem Koeffizienten

der genetischen Ähnlichkeit ( $G_s$ ) durch  $-\ln(G_s)$ , dem negativen Logarithmus von ( $G_s$ ). Es können Werte zwischen Null und  $\infty$  angenommen werden, wobei der unendliche Wert nur theoretisch erreicht wird. So ergeben als Beispiel 1 gleiche Bande von 100 eine genetische Distanz von 2.3 ( $-\ln$  von 0.1), 1 gleiche Bande von 1000 ( $-\ln$  von 0.001) eine genetische Distanz von 6.9. Ein noch höherer Wert würde bedeuten, daß so gut wie keine einzige Bande gemeinsam ist.

Ein kleiner Wert, der gegen 0 geht, drückt eine kleine genetische Distanz aus und damit eine nähere genetische Verwandtschaft. Die Daten aus den genetischen Distanzmatrizes können nach Sneath und Sokal (1973) mit Hilfe des Unweighted Pair Group Method Average (UPGMA) als eindimensionale phylogenetische Bäume dargestellt werden. Die Stabilität der so erhaltenen Dendrogramme wurde durch Bootstrapping über die Loci nach Felsenstein (1985) durch 1000 bzw. durch 500 Wiederholungen geprüft und somit Fehler für jede Position berechnet. Stabilitätswerte, die in diesem Bootstrapping Resampling über 50 % ergaben und somit eine höhere Wahrscheinlichkeit der richtigen Zuordnung aufweisen, sind in den Abbildungen 19 bis 23 an den Verzweigungen der Dendrogramme dargestellt.

**Tabelle 9:** Durchschnitt der Distanzen innerhalb und zwischen den Populationen des Südlichen (Css) und Nördlichen Breitmaulnashornes (Csc), dem Spitzmaulnashorn (Db) und dem Panzernashorn (Ru):

	1 Css	2 Csc	3 Db	4 Ru
1 Css	0.035798	0.092453	0.560391	0.879650
2 Csc		0.040461	0.565223	0.894207
3 Db			0.048009	0.962404
4 Ru				0.025782

Wie in Tabelle 9 zu sehen ist, sind die durchschnittlichen genetischen Distanzen innerhalb der Arten wesentlich kleiner, als zwischen den Arten. Das Indische Panzernashorn zeigt mit einem Wert von 0.0258 die kleinste genetische Distanz und das Spitzmaulnashorn mit 0.0480 die größte Distanz. Auch hier ist die genetische Distanz zwischen den Nördlichen Breitmaulnashörnern mit einer Distanz von 0.0405 größer als zwischen den Südlichen Breitmaulnashörnern mit einem Wert von 0.0358.

#### 4.8.1 Genetische Distanzen innerhalb der Populationen des Südlichen Breitmaulnashornes

In der UPGMA-Darstellung der individuellen Distanzen beim Südlichen Breitmaulnashorn (Bild 19 und 20) ergeben sich recht ungewöhnliche Dendrogramme mit sehr langen Seitenästen (tip branches) und sehr kurzen internen Ästen und Verzweigungen (internal branches). Die Seitenäste geben die Distanzen zwischen den Tieren an, wie der Maßstab auf der linken unteren Seite des Bildes zeigt (0.1). Diese Form der phylogenetischen Bäume könnte darauf zurückzuführen sein, daß nur 71 polymorphe Banden für die Population des Südlichen Breitmaulnashornes in die Berechnung miteinbezogen wurden und diese Marker wenig informativ oder, daß die Unterschiede zwischen den individuellen Distanzen sehr klein sind. Auch die Stabilitätswerte des Bootstrapping mit 500 Wiederholungen liegen zumeist unter 50 %, so daß man daraus schließen kann, daß bei der topographischen Anordnung in den phylogenetischen Bäumen Unterschiede auftreten können (Kapitel 3.2.11.2.1). Um stabilere Bäume zu bekommen, müßten weitere Marker ausgewertet werden, um die Informationsmenge zu erhöhen.

Abbildung 19 zeigt den nach dem Unweighted Pair Group Method Average (UPGMA) konstruierten phylogenetischen Baum der Zoopopulation des Südlichen Breitmaulnashornes in welchen 68 Tiere miteingegangen sind. Nashorn-Bullen mit mehreren Nachkommen wurden hier mit einem Rechteck kenntlich gemacht und die entsprechenden Muttertiere mit einem M. Die beiden Tierpaare mit der kleinsten Distanz wurden mit 1 und 2 gekennzeichnet. Weiterhin wurden Untergruppen mit A, B, C, D und E bezeichnet. Bei Tierpaar 1 handelt es sich um Tier 014, einen Bullen aus dem Safaripark Hodenhagen und seinen Nachkommen 017. Ihnen am nächsten zugeordnet befindet sich Tier 020, bei dem es sich ebenfalls um einen Nachkommen von Bulle 014 handelt (Bild 7). Mit diesen Nashörnern zusammen befindet sich in Untergruppe A auch das Muttertier 016 und ein weiterer Nachkomme von Nashorn-Kuh 016 und dem Bullen 014, das Nashorn 019. Auch bei den Tieren 018 und 021 handelt es sich um Nachkommen von Bulle 014, allerdings liegt hier die Position der Mutter 015 außerhalb dieser Untergruppe (Bild 7). Nashorn 068 scheint sich zufällig in dieser Untergruppe zu befinden, da hier kein gemeinsamer Ursprungsort oder eine Verwandtschaft bekannt sind. Sein einziger Nachkomme 070 befindet sich weit

außerhalb dieses Clusters (Anhang 9.2). Dieses Beispiel zeigt, daß Eltern und Nachkommen nicht notwendigerweise gemeinsam in ein Cluster zugeordnet werden. Die individuelle genetische Distanz hängt nur indirekt mit der Abstammung zusammen. Da sie sich aus der Anzahl gemeinsamer Allele an den verschiedenen Loci berechnet, hängt sie auch von der Frequenz der einzelnen Allele in der Gesamtpopulation ab.

Gruppe 2 weist einen langen internen Ast auf und relativ kurze Seitenäste. Hier ist der Bulle 049 aus dem Safaripark Whipsnade seinem Sohn 008 zugeordnet (Bild 9). Ihnen am nächsten befindet sich ein weiterer Nachkomme dieses Bullen, 039. In Untergruppe B befinden sich auch noch eine Tochter von Bulle 049, Tier 042, und etwas weiter entfernt Nachkomme 027. Nur Tier 035 ist laut Zuchtbuch kein Nachkomme von Bulle 049, obwohl es sich auch hier um Nachzucht aus Whipsnade handelt.

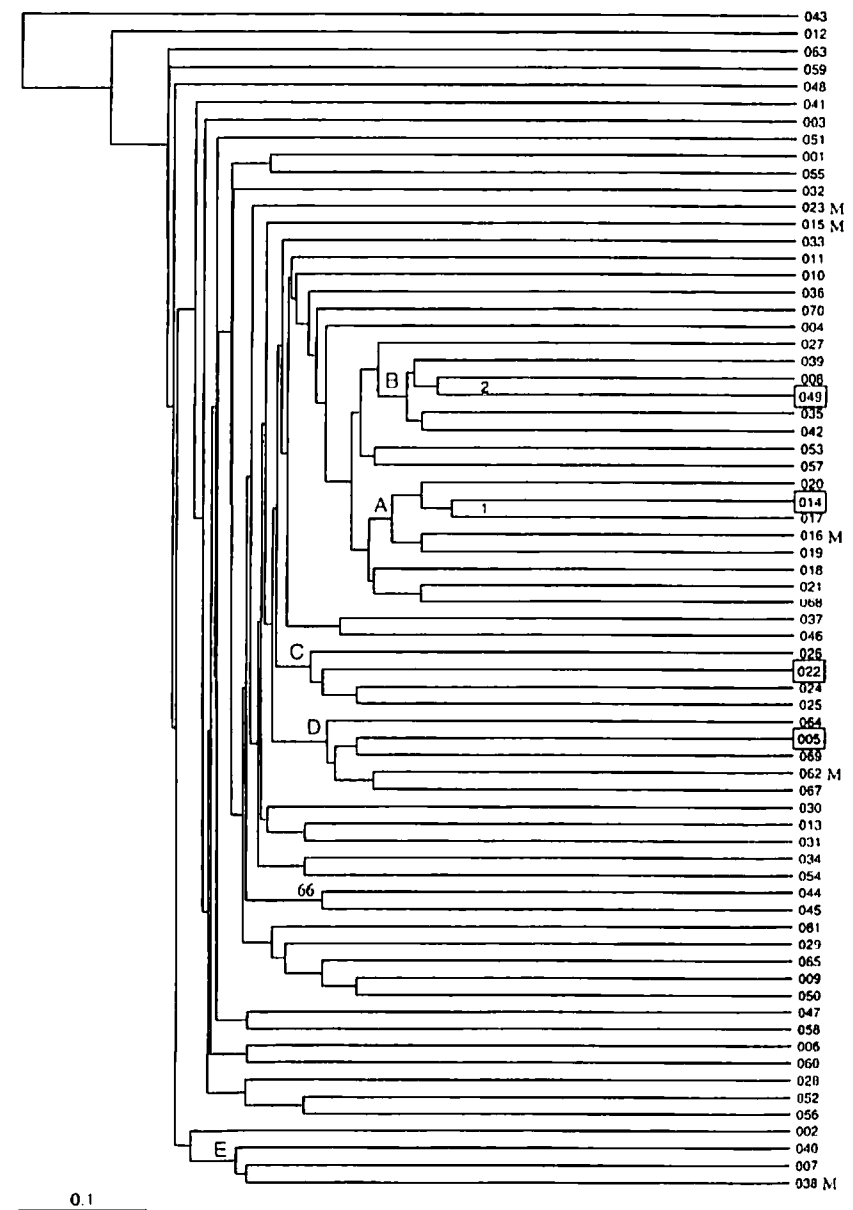
Zwischen den Untergruppen A und B wurden die beiden Nashörner 053 und 057 zugeordnet, die genau wie die Elterntiere aus Cluster A und B ebenfalls aus dem Umfolozi Nationalpark kommen, so daß eine Verwandtschaft möglich wäre (Anhang 9.2). In Untergruppe C kann man den Bullen 022 aus dem Zoo Münster und seine 3 Töchter 024, 025 und 026 finden. Die Position der Mutter 023 befindet sich außerhalb dieses Clusters (Bild 8).

Auch Untergruppe D zeigt eine Familie, hier aus dem Safaripark Beekse Bergen. Die kleinste Distanz ist zwischen den Tieren 062 und 067 zu finden, wobei es sich um Mutter und Tochter handelt. Weitere Nachkommen des Bullen 005 und der Kuh 062 haben ebenfalls ihre Position in dieser Gruppe, Tier 069 und 064 (Bild 6).

In Untergruppe E und außerhalb davon auf der ersten Position im Dendrogramm, befinden sich 3 Geschwister aus dem Zoo von Edinburgh, Tier 007, 038 und 043. Bei Nashorn 040, das ebenfalls in Untergruppe E angeordnet ist, handelt es sich um einen Nachkommen von Kuh 038 (Anhang 9.2).

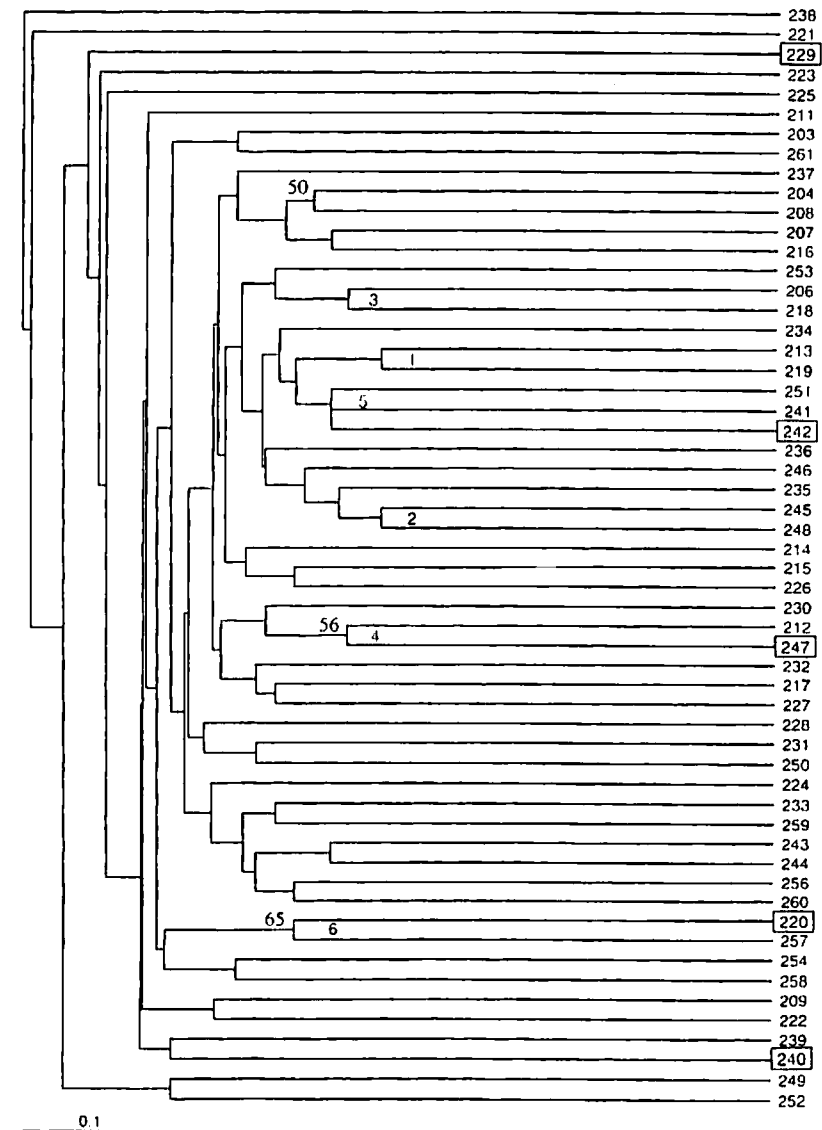
Den einzigen internen Knoten, der mit einem Stabilitätswert von über 50 % einen höheren Bootstrapwert (65,8 %) aufweist, als bei den anderen und der auch einen relativ langen internen Ast hat, kann man in dieser Population nur zwischen den Tieren 044 und 045 beobachten, wobei es sich bei diesen Tieren um Mutter und Sohn handelt (Anhang 9.2).

Bild 19: UPGMA-Dendrogramm der Zoopopulation Südliches Breitmaulnashorn



Anhand des nach UPGMA konstruierten phylogenetischen Baumes in **Abbildung 20** lassen sich neben dem Abstammungsnachweis (Kapitel 4.6) weitere Hinweise zur Populationsstruktur der Wildpopulation von 56 Südlichen Breitmaulnashörnern auf einer Wildtierfarm in Südafrika finden. Die 5 möglichen Vätertiere dieser Wildtierfarm sind mit einem Rechteck gekennzeichnet. Auch hier sind die Bootstrapwerte zumeist unter 50 % und, es fällt auf, daß sie dort größer sind, wo die internen Äste etwas länger sind. Die Bootstrapwerte über 50 % sind an 3 Verzweigungen notiert. Für die Verzweigung zwischen Nashorn 204 und 208 erhält man genau den Wert von 50 %. Hierbei handelt es sich um 2 adulte Weibchen, über deren Abstammung nichts bekannt ist. Es wurden die 6 Untergruppen mit den kleinsten Distanzen nummeriert. Die kleinste genetische Distanz kann man in Untergruppe 1 zwischen Nashorn 213 und 219 beobachten, wobei es sich um 2 subadulte Männchen handelt, die durchaus denselben Vater haben könnten. In Untergruppe 2 handelt es sich um Tier 245 und 248, 2 adulten Weibchen über die keine weiteren Angaben bekannt sind. Eine weitere Untergruppe mit einem relativ kurzen Seitenast und damit einer geringen genetischen Distanz zwischen diesen beiden Nashörnern bildet die Gruppe 3 mit den Tieren 206 und 218, wobei es sich um Mutter und Tochter handelt (Anhang 9.2). Ihnen am nächsten steht 253, wobei es sich um ein ausgewachsenes Weibchen handelt, von dem nicht bekannt ist, ob es mit den beiden anderen verwandt ist. In Untergruppe 4 kann man mit Nashorn 247 einen der 5 Bullen auf der Wildtierfarm Thaba Tholo erkennen, die als Vätertiere in Frage kommen. Der Bulle ist mit einem Kästchen im Dendrogramm gekennzeichnet. Er teilt die Gruppe mit seinem Nachkommen 212, der anhand des Abstammungsnachweises als sein Nachkomme identifiziert werden konnte (Tabelle 7). Hier bekräftigt ein Bootstrappingwert von 56 % diese Zuordnung und damit den Befund aus dem Abstammungsnachweis weiter. Diesen beiden Tieren steht 230, ein subadultes Männchen, in der Position am nächsten, wobei auch dies ein Nachkomme von Bulle 247 sein könnte. Die Mutter von 212, Tier 211 wurde von Gruppe 4 entfernt zugeordnet (Anhang 9.2). In Untergruppe 5 ist ebenfalls eines der 5 möglichen Vätertiere zu finden. Bulle 242 ist hier zusammen mit seinem Nachkommen 241 zugeordnet und mit Tier 251, bei dem es sich um ein subadultes Männchen handelt, das ebenfalls sein Nachkomme sein könnte (Tabelle 7).

Bild 20: UPGMA-Dendrogramm der Wildpopulation Südliches Breitmaulnashorn





Ein weiterer Bulle befindet sich in Untergruppe 6, Tier 220. Er wurde direkt mit einem der durch den Abstammungsnachweis festgestellten Nachkommen, Tier 257 in eine Gruppe zugeordnet (Tabelle 7). Auch hier bekräftigt ein Bootstrappingwert von 65 % diese Zuordnung. Die Mutter von 257, Tier 258 ist in der benachbarten Gruppe zu finden, wo sie zusammen mit einem subadulten Weibchen 254 eine Gruppe teilt, das die Tochter sein könnte (Anhang 9.2).

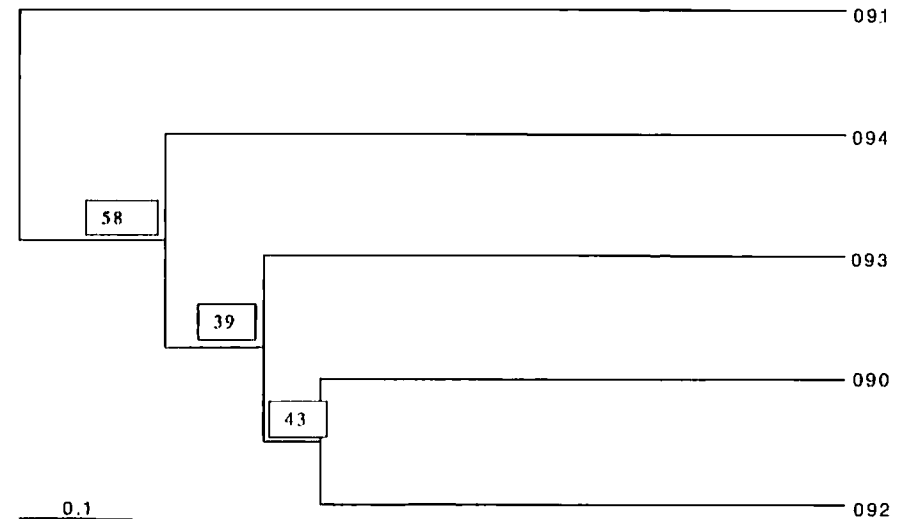
Dies zeigt, daß die Analyse der individuellen Distanzen Anhaltspunkte zur Populationsstruktur geben kann. Da jedoch stochastische und topographische Fehler in der Zuordnung möglich sind, kann eine Aussage über die Populationsstruktur nur in Verbindung mit der Kontrolle der Abstammungen und wildbiologischen Daten, wie z. B. Daten über das Reproduktionsverhalten der Tiere in dieser Population oder deren Streifgebiete gemacht werden.

#### 4.8.2 Genetische Distanzen innerhalb der Population des Nördlichen Breitmaulnashornes

Wie auf **Abbildung 21** zu sehen ist, sind auch hier die Seitenäste des Dendrogrammes, genauso wie bei den Südlichen Weißen Nashörnern, ungewöhnlich lang, mit relativ kurzen internen Ästen. Da nur 37 polymorphe Banden in die Berechnung der Distanzmatrix miteingegangen sind, muß beachtet werden, daß es in der Struktur des phylogenetischen Baumes zu topographischen Fehlern kommen kann. Dies zeigen auch die geringen, durch das Bootstrapping berechneten Stabilitätswerte von 43 % zwischen Nashorn 090 und 092 und einem Wert von 39 % zwischen Tier 093 und 094. Innerhalb dieser Gruppe (Nashorn 090/092/093/094) sind auch andere Zuordnungen möglich.

Man kann erkennen, daß bei den 5 Tieren der Unterart Nördliches Weißes Nashorn die genetischen Distanzen zwischen Nashorn 090 und 092 am kleinsten sind, obwohl es sich hier nicht um direkt miteinander verwandte Tiere handelt. Dem Nashorn 090 sind als nächststehende Tiere 093 und 094 zugeordnet, bei denen es sich um Nachkommen dieses Bullen handelt (Anhang 9.2). Am weitesten entfernt ist Nashorn 091, das mit den anderen Tieren nicht verwandt ist und außerhalb der Gruppe steht, was auch ein Bootstrappingwert von 58 % bestätigen kann.

**Bild 21: UPGMA-Dendrogramm der Population Nördliches Breitmaulnashorn**



#### 4.8.3 Genetische Distanzen innerhalb der Population des Spitzmaulnashornes

Wie man anhand des phylogenetischen Baumes der Spitzmaulnashörner in **Abbildung 22** erkennen kann, wurden die 7 Nashornpaare mit der kleinsten genetischen Distanz, d. h. den kürzesten Seitenästen, von 1 bis 7 numeriert. Es wurden 3 Untergruppen, A, B und C ausgewählt, die genauer diskutiert werden sollen. In dieses Dendrogramm wurden 20 Tiere miteinbezogen und die Distanzmatrix aus 106 Allelen konstruiert. Durch das Bootstrapping über die Loci kann man erkennen, daß dieser Baum recht stabile Verwandtschaftszuordnungen zeigt. Die Bootstrappingwerte über 50 % sind an den jeweiligen Verzweigungen dargestellt.

Untergruppe A beinhaltet eine Mutterlinie aus 3 Nashörnern des Tierparks Berlin (Bild 10). In Gruppe 2 befinden sich Kuh 102 mit ihrer Tochter 105. Das ihnen am nächsten zugeordnete Tier ist 100, sie ist die Mutter von 102 und die Großmutter von 105. Hierbei handelt es sich um eine sehr stabile Gruppe, wie man anhand der Bootstrapwerte von 79 und 55 % erkennen kann.

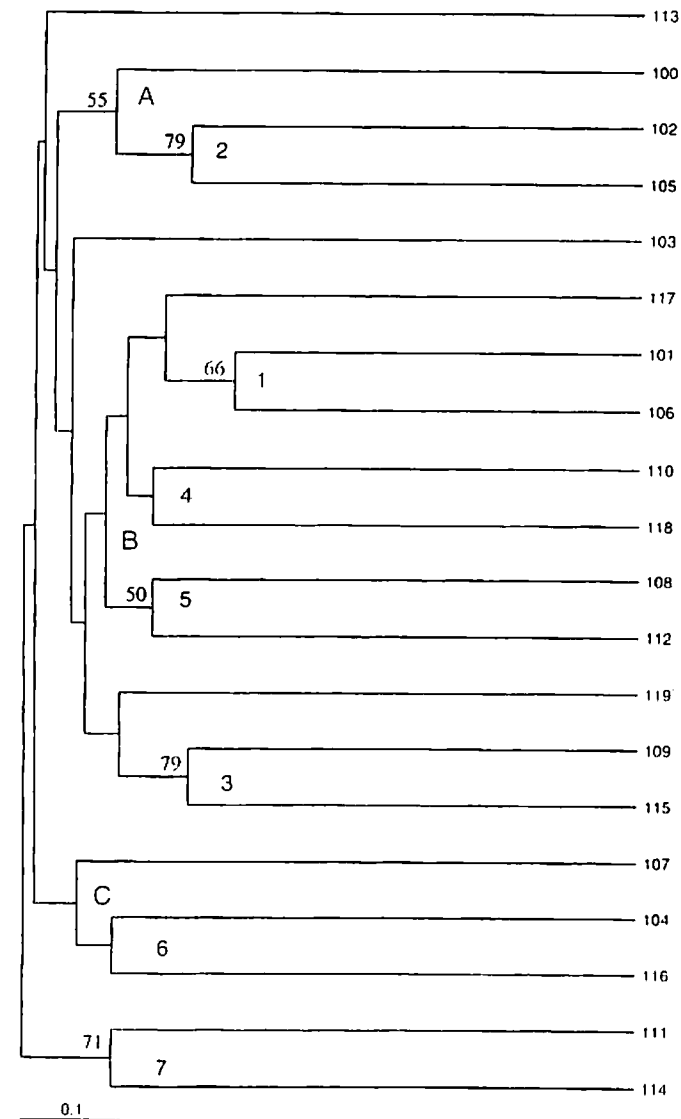
Die größte Untergruppe stellt B dar, das sowohl Tiere aus der Familie des Tierparks Berlin als auch aus dem Tierpark Dvur Kralove beinhaltet. Die kleinste genetische Distanz in der Gesamtpopulation und ein Stabilitätswert von 66 % besteht hier in Gruppe 1 zwischen Tier 101 und 106, wobei es sich um Mutter und Sohn handelt (Bild 10). Das ihnen am nächsten zugeordnete Nashorn 117 ist nicht direkt mit ihnen verwandt und müßte eigentlich dem Bullen 113, der sich auf einer Außenposition befindet, näher stehen, da es sich hier um den Vater handelt (Bild 11). Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß die Mutter in dieser Studie fehlt und über ihre Verwandtschaft nichts bekannt ist. Daß die Zuordnung zu diesen beiden Tieren nicht sehr stabil ist, zeigt sich auch schon an einem Bootstrappingwert von 30 %.

Die Nashörner in den beiden Gruppen 4 und 5 sind alle aus einer Familie aus dem Tierpark Dvur Kralove. In Gruppe 5 ist hier der Bulle 108 und seine Tochter 112 zu finden, die einen Bootstrappingwert von 50 % aufweisen (Bild 12). Das Muttertier 110 und ein weiterer Nachkomme der beiden ist in Gruppe 4 zugeordnet.

Das Vatertier von Nashorn 106, Bulle 104, und ein weiterer Nachkomme, 107, ist in Untergruppe C zu finden (Bild 10). In Gruppe 6 ist der Bulle 104 mit dem nicht mit ihm verwandten Tier 116 zugeordnet. Das Muttertier von Nashorn 116, Tier 112, hat seine Position davon entfernt in Gruppe 5 eingenommen (Bild 12).

An letzter Stelle befindet sich Gruppe 7, das den Bullen 111 und seine Tochter 114 beinhaltet und das sich mit einem Bootstrappingwert von 71 % als recht stabil zeigt (Bild 12).

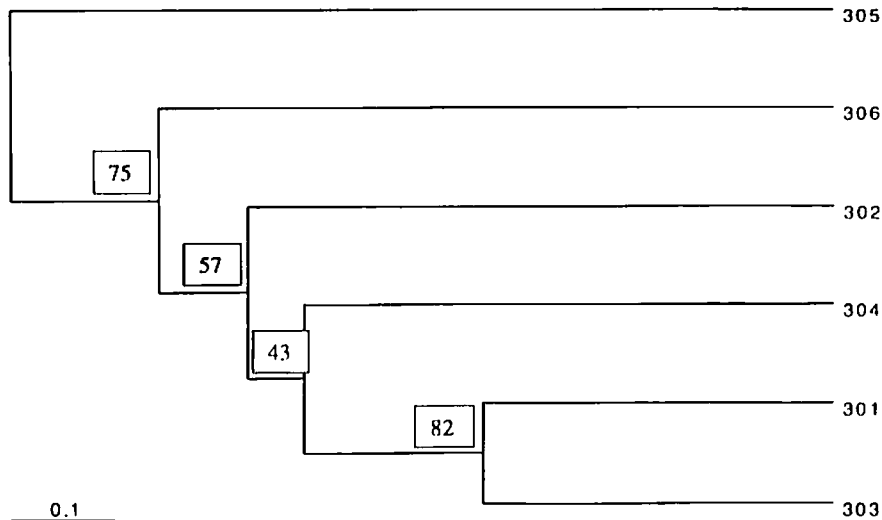
Bild 22: UPGMA-Dendrogramm Spitzmaulnashorn



#### 4.8.4 Genetische Distanzen innerhalb der Population des Indischen Panzernashornes

Der phylogenetische Baum der **Abbildung 23** wurde aus der Distanzmatrix von 6 Indischen Panzernashörnern konstruiert, die sich aus 54 polymorphen Banden berechnet. Das Dendrogramm zeigt die kleinste genetische Distanz zwischen dem Bullen 301 und seinem Nachkommen 303 und hier auch mit 82 % den höchsten Stabilitätswert. Ihnen am nächsten befindet sich Bulle 304, der der Vater von 301 und der Großvater von 303 ist. Ein bißchen weiter entfernt ist Tier 302, welche die Mutter von Nashorn 303 ist. Am weitesten von allen entfernt ist Nashorn 305, wobei es sich um ein Tier handelt, das direkt aus Nepal kommt, so daß die große genetische Distanz zu den anderen den Erwartungen entspricht und durch einen Bootstrappingwert von 75 % weiter bestätigt wird.

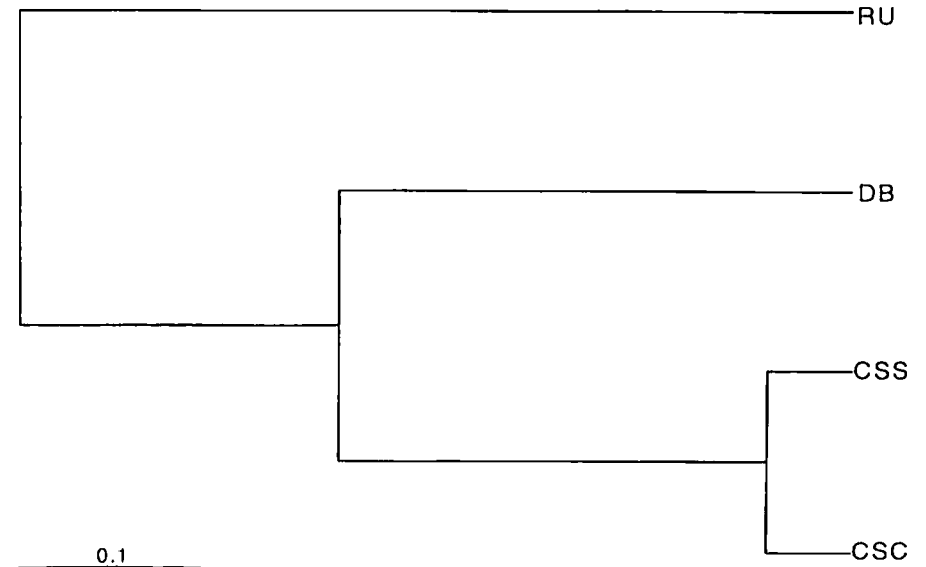
**Bild 23:** UPGMA-Dendrogramm der Population Indische Panzernashorn:



#### 4.9 Genetische Distanzen zwischen den Populationen

Die genetische Distanz zwischen Populationen definiert sich theoretisch aus der Allelfrequenz aller Loci im Genom. Da es jedoch unmöglich ist, alle Genorte im Genom einer Population zu erfassen, wird nur ein Teil der Loci in einer Stichprobe der Tiere einer Population untersucht (Nei, 1987, S. 222). Hier wurden alle Banden von 3 nicht miteinander verwandten Nashörnern aus jeder Population für 12 Primerkombinationen miteinander verglichen und zur Berechnung der Distanzmatrix herangezogen.

**Bild 24:** UPGMA-Dendrogramm zum Vergleich der genetischen Distanzen zwischen den Arten Indische Panzernashorn (RU), Spitzmaulnashorn (DB), Südliches (CSS) und Nördliches Breitmaulnashorn (CSC):



**Abbildung 24** zeigt, daß das aus den Distanzen der verschiedenen Arten und Unterarten konstruierte Dendrogramm den historischen, geographischen und anatomischen Erwartungen entspricht und somit auch die Brauchbarkeit der Marker für phylogenetische Studien als erwiesen angesehen werden kann. Es zeigt sich, daß die beiden Unterarten Nördliches und Südliches Breitmaulnashorn recht nahe miteinander verwandt sind.

Die andere in Afrika lebende Art, das Spitzmaulnashorn, steht dem Breitmaulnashorn erwartungsgemäß näher als das Indische Panzernashorn, das eine sehr große genetische Distanz zu diesen beiden Arten aufweist und das nicht nur geographisch sehr weit von diesen beiden Arten entfernt ist, sondern auch anatomisch sich stärker von den anderen beiden Arten unterscheidet.

## 5. Diskussion

### 5.1 Beurteilung der Methode AFLP für die Anwendung bei Wildtieren

Dies ist die erste Studie, in der AFLP Marker zur Bestimmung der genetischen Variabilität und zur Abstammungssicherung bei Nashörnern verwendet wurden. Da kein weiteres Wissen über das Zielgenom vorausgesetzt wird, ist diese Methode besonders gut für Wildtiere geeignet, bei denen zumeist nur wenig Informationen über die DNA Sequenzen vorliegen. Es kann schnell und mit wenig Aufwand eine große Anzahl von Polymorphismen generiert werden, damit entfallen hohe Kosten für die Entwicklung neuer Marker (Zabeau & Vos, 1993).

Es wurden die Restriktionsenzyme EcoRI und TaqI sowie 64 dazu passende Primerkombinationen für die Versuche verwendet, wie dies für Tiere von Ajmone-Marsan et al. (1997) und Vos & Kuiper (1997) vorgeschlagen wurde. Für alle Nashornarten ergaben sich spezifische Bandenmuster und Polymorphismen. Dies zeigt, daß die in dieser Studie verwendeten Primerkombinationen auch für andere Tierarten verwendet werden können (Bild 17 und 18).

Der Vorteil von AFLP im Vergleich zu anderen sequenzunabhängigen Methoden, wie RFLP (restriction fragment length polymorphism) ist, daß trotz der Verwendung von Restriktionsenzymen weniger Ausgangs-DNA nötig ist, da der Restriktionsansatz in verschiedenen PCR Schritten vervielfältigt wird. Die Methode ist somit automatisierbar und schneller (Dodgson et al., 1997; Karp et al., 1996; Karp et al., 1997; Paul et al., 1997; Mueller & Wolfensbarger, 1999). Eine andere Methode, die auf einer PCR basiert, ist RAPD (randomly amplified polymorphic DNA). Sie hat den Nachteil, daß die Reaktionsbedingung sehr strikt konstant gehalten werden müssen, da sonst die Reproduzierbarkeit kritisch ist (Cervera et al., 1996; Dodgson et al., 1997; Karp et al., 1996; Karp & Edwards, 1997; Jones et al., 1997; Paul et al., 1997; Mueller & Wolfensbarger, 1999). AFLP erwies sich hingegen in dieser Studie als eine sehr gut wiederholbare Methode, was auch mit Versuchen verschiedener europäischer Labors zur Reproduzierbarkeit von AFLP übereinstimmt (Jones et al., 1997). Mit AFLP lassen sich zudem mehr über das ganze Genom verteilte, unabhängige, polymorphe Marker in einer einzigen PCR-Reaktion herstellen als bei RAPD (Karp et al., 1996; Paul et al., 1997). Auch von verschiedenen anderen

Autoren wird AFLP als eine zuverlässige und kostengünstige Technik beschrieben (Hill et al., 1996; Greef et al., 1997; Vos & Kuiper, 1997; Mueller & Wolfensbarger, 1999; Sharbel, 1999). Diese Methode ist also insgesamt für die in dieser Studie gestellte Fragestellung, der Bestimmung von genetischer Variabilität und Verwandtschaft sowohl zwischen als auch innerhalb von Wildtierpopulationen am geeignetsten.

Ein Nachteil für den Gebrauch dieser Methode beim Wildtier ist jedoch, daß als Ausgangsmaterial für die AFLP Reaktionen nur aufgereinigte, genomische DNA verwendet werden kann, damit eine vollständige Aufspaltung durch die Restriktionsenzyme gewährleistet ist. Daraus folgt, daß Blut- oder Gewebeproben benötigt werden, die oft nur schwer zu bekommen sind. Besonders bei Tieren in freier Wildbahn ist eine Probenentnahme somit oft nicht möglich. Es müßte in der Zukunft angestrebt werden, eine leicht durchführbare, nicht invasive Methode für Wildtiere zu entwickeln, in der Probenmaterial wie z. B. Haarfollikeln oder Kotproben (Kohn & Wayne, 1997) zur Extraktion von DNA verwendet werden können.

Als einen weiteren Nachteil stellte sich in dieser Studie heraus, daß die AFLP Banden mit dem verwendeten Meßgerät und der dazu gehörenden Software nur als vorhanden oder fehlend ausgewertet werden konnten, d. h. als dominante, rezessive Marker. Da keine Unterscheidung zwischen homozygoten und heterozygoten Tieren gemacht werden kann, ist der Informationsgehalt geringer als für codominante Marker. Zudem kann nur eine Aussage über die Abstammung gemacht werden, wenn Probenmaterial beider möglicher Elterntiere vorhanden ist. Gerade bei Wildtieren ist dies schwierig, da oft keinerlei Informationen über die Verwandtschaftsgrade vorhanden sind und auch nicht von allen Tieren Probenmaterial erhältlich ist. Dieser geringere Informationsgehalt für die statistische Auswertung kann jedoch teilweise durch die große Anzahl amplifizierter AFLP Marker pro Reaktion und durch eine größere Probenanzahl wieder ausgeglichen werden (Sharbel, 1999). Eine andere Möglichkeit, den Informationsgehalt der AFLP Marker zu erhöhen, wäre es, AFLP Marker mit Hilfe eines anderen Meßsystems und einer speziell dafür ausgelegten Software als codominante Marker auszuwerten, wie dies von anderen Autoren beschrieben wurde (Ajmone-Marsan et al., 1997; Krauss, 1999; Mueller & Wolfensbarger, 1999). Durch eine codominante Auswertung könnten auch Aussagen über die Abstammung bei nur einem vorhandenen Elternteil gemacht werden. Eine quantitative Detektion der Banden ist möglich, da Unterschiede in der DNA

Konzentration am Anfang keine unterschiedlichen Ergebnisse bei der Messung der AFLP Banden am Schluß ergeben, weil der markierte Primer vollständig aufgebraucht wird. So kann bei einer Bandenintensität (Peakhöhe) von 50 % im Vergleich zu Homozygoten eine Aussage über heterozygote Tiere gemacht werden (Sharbel, 1999; Vos & Kuiper, 1997). Mit einer Auswertung der AFLP Banden als codominante Marker, erreicht AFLP einen ähnlichen Informationsgehalt wie die Mikrosatelliten, die bisher in der Haustiergenetik am häufigsten für genetische Nachweise verwendet werden.

Mit der vorliegenden Studie wurde gezeigt, daß AFLP sowohl bei Nashörnern, als auch bei anderen Wildtieren eine geeignete Methode zur Abstammungssicherung und Bestimmung der Variabilität, ist. Wäre beabsichtigt, eine größere Genauigkeit bei der Abstammungssicherung und der Aufklärung der Populationsstruktur mittels genetischer Distanzen zu erzielen, könnten weitere Primerkombinationen ausgewertet werden. Für die hier vorliegende Fragestellung reichten die verwendeten Marker jedoch aus.

## 5.2 Variabilität innerhalb der Populationen

Zur Schätzung der genetischen Variabilität innerhalb einer Population ist nach Nei et al. (1975), Nei (1978) und Nei (1987, S.177) neben dem durchschnittlichen Heterozygotiegrad auch die Anzahl polymorpher Loci von Bedeutung. Durch die geringe Probenzahl ist jedoch anzunehmen, daß die Anzahl polymorpher Loci beim Nördlichen Breitmaulnashorn mit nur 5 Tieren und beim Indischen Panzernashorn mit nur 6 Tieren (Tabelle 2 und 6) unterschätzt wird, da Allele mit einer niedrigen Frequenz in der Gesamtpopulation erst bei einer großen Probenanzahl repräsentiert werden (Nei, 1987, S.186). Dennoch könnte die geringere Anzahl polymorpher Loci beim Breitmaulnashorn und beim Indischen Panzernashorn im Vergleich zum Schwarzen Nashorn einen Hinweis darauf geben, daß es durch den Effekt eines genetischen Flaschenhalses zum Verlust von Allelen mit einer niedrigen Frequenz gekommen ist (Tabelle 6).

Für die Südlichen Breitmaulnashörnern ( $n=125$ ) beträgt der Wert, der die Anzahl polymorpher Banden im Verhältnis zur Gesamtzahl der Banden ausdrückt 0.0352.

Somit sind 3.5 % der Banden in dieser Population polymorph (Tabelle 4 und 5). Der durchschnittliche Heterozygotiegrad liegt bei 0.36 (Tabelle 6).

Bei den Nördlichen Breitmaulnashörner bestehen mit einem Anteil von 3.9 % polymorpher Banden trotz der geringen Probenanzahl ( $n=5$ ) größere Unterschiede innerhalb der Population, als bei den Südlichen Breitmaulnashörnern (Tabelle 4 und 5). Auch der durchschnittliche Heterozygotiegrad liegt mit 0.40 höher (Tabelle 6). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die ehemals zahlreichen Nördlichen Breitmaulnashörner erst in der jüngsten Zeit stark dezimiert wurden, während die Südlichen Breitmaulnashörner bereits Anfang des 20. Jahrhunderts den genetischen Flaschenhals überwunden haben und sich ihre Bestandszahlen wieder stark vergrößert haben (Walker, 1994; Foose, 1996; International Rhino Foundation, 1999). Die hohe Anzahl polymorpher Loci beim Nördlichen Breitmaulnashorn repräsentiert somit noch den genetischen Zustand der ehemals großen Population (Hillman-Smith, 1997; Emslie & Adcock, 1997, S. 197). Dieser Befund der hohen genetischen Variabilität beim Nördlichen Breitmaulnashorn, der den heutigen Bestandszahlen zu widersprechen scheint, konnte auch in einer Studie an den selben Tieren von Stratil et al. (1990) anhand von Serumproteinen bestätigt werden. Dagegen konnten Merenlender et al. (1989) in einer Allozymstudie und O'Ryan et al. (1994) mit RFLP für die Breitmaulnashörner insgesamt nur einen sehr geringen Grad an intraspezifischer Variabilität feststellen.

Für die Spitzmaulnashörner ( $n=20$ ) wurde ein durchschnittlicher Heterozygotiegrad von 0.31 bestimmt (Tabelle 6). Dieser niedrige Wert im Vergleich zur höchsten festgestellten Anzahl polymorpher Loci, welche einem Anteil von 4.7 % an der Gesamtzahl der Banden entsprechen (Tabelle 4 und 5), kann durch die ungleichmäßige Verteilung der Allele in dieser Population zustande gekommen sein, da der Heterozygotiegrad von der Allelfrequenz abhängig ist (Kapitel 3.2.11.3). Dies deutet wiederum darauf hin, daß zwar noch eine große Variabilität in dieser Population erhalten ist, sie sich aber auf dem Weg in einen genetischen Flaschenhals befindet. Hier werden seltene Allele weiter reduziert und sie können, in Abhängigkeit von der Größe des Flaschenhalses, sogar verloren gehen (Nei et al., 1975). Diese Vermutung läßt sich durch historische Daten belegen, da besonders die Spitzmaulnashörner in den letzten Jahrzehnten einen gravierenden Einbruch der Bestandszahlen erlitten haben (Ashley et al., 1990). Sie wurden von einem geschätzten

Bestand von 60.000 Tieren 1970 auf einen aktuellen Bestand von ca. 2.600 Tieren reduziert (Foose, 1996). Die in dieser Studie untersuchte Unterart Ostafrikanisches Nashorn (*Diceros bicornis michaeli*) wird weltweit sogar nur noch auf einen Bestand von ca. 660 Tier geschätzt (Tabelle 1; International Rhino Foundation, 1999).

Daß bei Spitzmaulnashörnern noch ein hoher Grad an genetischer Variabilität konserviert wurde, der den historischen Bestandszahlen und nicht mehr den heutigen entspricht, beschreiben auch Swart & Ferguson (1994 und 1997) und Swart et al. (1994) in einer Studie, die auf der elektrophoretischen Analyse von Serumproteinen beruht. Wenn man den Durchschnitt des Heterozygotiegrades nachrechnet, den Swart et al. (1994) in ihrer Studie für die beiden Unterarten *Diceros bicornis minor* und *bicornis* finden, erreichen sie Werte, die zwischen 0.18 und 0.29 liegen. Diese Werte liegen sogar unter dem in dieser Studie für die Unterart *Diceros bicornis michaeli* errechneten durchschnittlichen Heterozygotiegrad von 0.31. Im Gegensatz dazu konnten Merenlender et al. (1989), O'Ryan & Harley (1993) und O'Ryan et al. (1994) für Spitzmaulnashörner nur einen sehr geringen Grad an intraspezifischer Variabilität feststellen.

Die Tatsache, daß für die Südlichen Breitmaulnashörner trotz einer wesentlich größeren Probenzahl von 125 Tieren und den speziell für sie selektierten Primerkombinationen weniger polymorphe Banden gefunden wurden als für die Spitzmaulnashörner (Tabelle 5), könnte nicht nur historisch bedingt sein. Es könnte auch darauf zurückzuführen sein, daß für diese Population nur die besten polymorphen Loci, die bei mehr als 3 Tieren vorkamen, gewertet wurden. Für die anderen Nashorn-Arten und Unterarten mit einer kleineren Probenanzahl, wurden auch polymorphe Loci von Einzeltieren gewertet. Die reale Anzahl polymorpher Loci ist also für das Südliche Breitmaulnashorn etwas höher als jene, die in die Wertung miteingegangen ist und damit einhergehend fiel der Heterozygotiegrad auch etwas niedriger aus. Aber auch ein niedriger Heterozygotiegrad beim Südlichen Breitmaulnashorn würde einen hohen Grad an genetischer Variabilität zeigen, so daß es bisher keine Hinweise auf eine genetische Verarmung gibt. Dies gilt auch für die Nördlichen Breitmaulnashörner.

Für die Indischen Panzernashörner wurde ein durchschnittlicher Heterozygotiegrad von 0.38 berechnet (Tabelle 6). Sie zeigen einen Anteil von 2.5 % polymorpher Loci

an der Gesamtbandenzahl. Es ist somit die niedrigste Anzahl polymorpher Banden, die in den verschiedenen Populationen auftrat.

Ein Grund dafür könnte sein, daß die Primer nicht speziell für das Indische Panzernashorn selektiert wurden, sondern für das Breitmaulnashorn. So könnten eventuell andere Primerkombinationen für das Panzernashorn mehr Polymorphismen ergeben. Diese Ergebnisse stimmen jedoch auch mit einer Studie von Dinerstein & McCracken (1990) überein, die bei Indischen Panzernashörnern anhand von Proteinelektrophoresen ebenfalls einen hohen Heterozygotiegrad, bei relativ geringer Diversität der Allele fanden. Rechnet man den durchschnittlichen Heterozygotiegrad von Dinerstein & McCracken nach, dann kommt man auf einen Durchschnittswert von 0.31. Dieser Wert liegt etwas tiefer, als der in dieser Studie gefundene durchschnittliche Heterozygotiegrad von 0.38. Dieser Befund eines hohen Heterozygotiegrades bei einer Verminderung der variablen Loci, könnte darauf zurückzuführen sein, daß der Bestand der Indischen Panzernashörner bereits am Anfang des 20. Jahrhunderts stark dezimiert worden ist (Laurie, 1997). Somit bestand für diese Population bereits eine genetische Flaschenhals Situation, von der sich die heutigen Bestandszahlen mit nur ca. 2000 Tieren nicht mehr erholt haben (Tabelle 1; International Rhino Foundation, 1999). Nach dem Verlust von Allelen können neue Allele innerhalb der Population nur durch Mutationen entstehen. Da die Mutationsrate jedoch gering ist und die Generationszeit beim Nashorn sehr lange ist, braucht es tausende von Generationen und Jahren, um wieder die ursprüngliche genetische Variabilität zu erhalten (Chakraborty & Nei, 1977). Eine hohe Diversität der Allele repräsentiert generell auch eine große effektive Populationsgröße  $N_e$ , wobei viele dieser Allele eine sehr niedrige Allelfrequenz besitzen, die nur wenig zum gesamten durchschnittlichen Heterozygotiegrad der Population beitragen (Nei et al., 1975; Chakraborty et al., 1980). Diese seltenen Allele gehen mit hoher Wahrscheinlichkeit in einem genetischen Flaschenhals verloren, was sich nachteilig für eine Population auswirken kann, wenn Umweltveränderungen schnelle Anpassung erfordern (Nei et al., 1975; Fuerst & Maruyama, 1986). Die Reduktion von seltenen Allelen kann bewirken, daß die verbleibenden Allele eine gleichmäßigere Verteilung der Allelfrequenzen aufweisen, was wiederum zu einem höheren Heterozygotiegrad führt. Diese Situation zeigt sich für das Indische Panzernashorn. Der geschichtlich belegbare genetische Flaschenhals, durch den die Indischen Panzernashörner gegangen sind, könnte die relativ kleine Anzahl

polymorpher Loci und den hohen Heterozygotiegrad erklären. Hierbei ist zu beachten, daß bei einer Probenzahl von nur 6 Tieren nicht damit zu rechnen ist, daß alle Allele der Population in diesem Probenmaterial vorhanden sind (Nei, 1987, S.186). Aus einem Anteil von 2.5 % polymorpher Banden in der Population und dem hohen Heterozygotiegrad (Tabelle 4 und 6), der aus den verbliebenen Allelen berechnet wurde, folgt, daß bei Indischen Panzernashörnern trotzdem noch ein hoher Grad an Variabilität in der Population erhalten geblieben ist. Im Gegensatz dazu konnten Merenlender et al. (1989) anhand von Allozymen keine Unterschiede bei Indischen Panzernashörnern finden.

Im Durchschnitt ergab sich für alle Populationen zusammen ein Heterozygotiegrad von 0.36. Dieser hohe Wert und die relativ hohe Anzahl polymorpher Loci, können als Hinweis darauf dienen, daß insgesamt in diesen untersuchten Nashornpopulationen noch eine große genetische Variabilität vorhanden ist. Eine Reduktion des Heterozygotiegrades kann Aufschluß über den Grad an Inzucht innerhalb einer Population geben, aber auch hier scheint noch kein negativer Effekt aufgetreten zu sein (Swart et al., 1994). Dieser Befund wird darauf zurückgeführt, daß das Generationsintervall beim afrikanischen Nashorn mit 10 Jahren (Swart et al., 1994; Swart & Ferguson 1997) und beim Indischen Panzernashorn mit 12 Jahren (Dinerstein & McCracken, 1990) sehr lange ist und sich die Situation eines genetischen Flaschenhalses erst innerhalb der letzten Jahrzehnte ereignet hat. Auf diese Weise ist noch eine hohe genetische Variabilität erhalten geblieben. Dieser hohe Grad an genetischer Variabilität steht im Gegensatz dazu, was für andere Tierarten, die schon beinahe ausgestorben waren, wie z. B. den Geparden und Przewalski-Pferden, berichtet wird, bei denen sich bereits Inzuchtprobleme einstellen (Bouman & Bos, 1979; O'Brian, 1985). Dieser Befund würde ebenfalls der Theorie von Wooten & Smith (1985) widersprechen, daß große Tiere genetisch weniger variabel sind als kleine Tiere.

### 5.3 Unterscheidung zwischen Arten und Unterarten

Diese Studie beinhaltet sowohl Südliche Breitmaulnashörner aus verschiedenen Zoologischen Gärten als auch eine Wildpopulation aus Südafrika. Zwischen der Zoo-

und Wildpopulation zeigten sich jedoch keine Unterschiede. Beide wiesen die gleiche Anzahl polymorpher Banden auf, keine Gendrift, die sich durch fixierte Allele oder eine unterschiedliche Allelverteilung bemerkbar macht und beide Populationen erreichten denselben Heterozygotiegrad. Dieser Befund zeigt, daß die räumliche Trennung der beiden Populationen erst in jüngster Zeit stattfand und daß sich durch die erfolgte Migration noch keine Unterschiede ausbilden konnten (Nei, 1987, S.240). Wie sich auch aus dem Zuchtbuch ablesen läßt (Göllhenboth & Ochs, 1995/97/99), sind viele der in Zoologischen Gärten lebenden Nashörner direkt aus Südafrika importiert, so daß ein genetischer Austausch immer noch stattfinden kann. Für diese räumlich getrennten Populationen ist die genetische Distanz generell niedriger als zwischen Arten oder Unterarten (Nei, 1987, S. 241-243).

Die Südlichen und Nördlichen Breitmaulnashörner wiesen ein sehr ähnliches Bandenmuster auf. Sie konnten aber anhand fehlender oder zusätzlicher Banden durch die meisten Primerkombinationen klar differenziert werden. Laut Houck et al. (1994) bestehen zwischen diesen beiden Unterarten auch chromosomale Unterschiede und George et al. (1991) und Harley & O'Ryan (1994) konnten Unterschiede zwischen diesen beiden Unterarten anhand von mitochondrialer DNA und Serumproteinen nachweisen.

Die genetischen Distanzen können ebenfalls Aufschluß darüber geben, ob es sich wirklich um eine Unterart handelt, auch wenn der Gebrauch dieses Begriffes etwas schwierig ist, da Unterarten bisher nicht genau definiert sind und dieser Ausdruck unterschiedlich gebraucht wird (Nei, 1987, S. 243-245). Die genetische Distanz zwischen dem Südlichen und Nördlichen Breitmaulnashorn in dieser Studie beträgt 0.09 (Tabelle 9). Sie ist größer als innerhalb der Arten, wo sie für die Südlichen Breitmaulnashörner 0.036 und für die Nördlichen Breitmaulnashörner 0.040 beträgt, so daß dies für eine Einteilung in Unterarten spricht. Auch die regionale und reproduktive Trennung und morphologische Unterschiede in Körperform und Schädelgestalt bestätigen diese Einteilung (Meister & Owen-Smith, 1997). Die genetischen Unterschiede zwischen den beiden Unterarten lassen sich auch historisch gesehen erklären, da zwischen den Populationen des Südlichen und Nördlichen Breitmaulnashornes schon lange eine räumliche Trennung bestand (Pienaar, 1994) und sie sich seit über einer Million Jahren (Morales & Melnick, 1994;

Emslie & Adcock (1997, S. 196) getrennt entwickelt haben. Dies unterstützt die Theorie der Unterartenbildung, da keine Migration stattfinden konnte.

Beim Schwarzen Nashorn sollten historisch gesehen kleinere genetische Unterschiede zwischen den Unterarten bestehen als beim Breitmaulnashorn, da eine räumliche Trennung erst viel später stattfand (Ashley et al., 1990; Amato et al., 1991). Für die Zukunft wäre es interessant, auch verschiedene Unterarten des Spitzmaulnashornes anhand von AFLP Markern zu testen und hier zu untersuchen, ob es sich wirklich um Unterarten handelt oder nur um Ökotypen (Adcock & Emslie, 1997).

Alle Nashornarten weisen artspezifische AFLP-Bandenmuster auf, so daß sie klar voneinander unterschieden werden können. Für alle 3 Arten und die Unterart Nördliches Breitmaulnashorn konnten polymorphe Banden festgestellt werden. Im Vergleich dazu konnten Ali et al. (1999) in ihrer Studie anhand von MASA Primern (microsatellite associated sequence amplification) zwar ebenfalls speziesspezifische Bandenmuster für das Indische Panzernashorn und das Spitzmaulnashorn finden, jedoch keine Polymorphismen.

Die Ergebnisse aus dem UPGMA Dendrogramm der genetischen Distanzen zwischen den Arten (Bild 24) zeigt große genetische Distanzen zwischen den Arten und eine kleine Distanz zwischen den beiden Unterarten Nördliches und Südliches Breitmaulnashorn. Dies deckt sich historisch gesehen mit Studien zur Evolutionsgeschichte von Merenlender et al. (1989) und Prothero (1991), die schätzen, daß eine Trennung zwischen den beiden afrikanischen Arten vor ca. 4 Millionen Jahren stattfand, die Trennung zwischen den afrikanischen und asiatischen Arten aber bereits vor mindestens 6 Millionen Jahren. Diese großen genetischen Distanzen könnten zusätzlich auch Hinweis auf einen genetischen Flaschenhals geben, da er kurzzeitig eine starke Zunahme der Distanzen zwischen den betroffenen Populationen bewirken kann (Nei, 1987, S. 251). Auch geographisch und anatomisch stehen sich die beiden afrikanischen Arten Spitz- und Breitmaulnashorn mit einer Reduktion der Schneidezähne und 2 Hörnern näher als dem Indischen Panzernashorn (Groves, 1997).

Die Form des UPGMA Dendrogrammes (Bild 24) deckt sich auch mit dem von Morales & Melnick (1994) für diese Arten und Unterarten anhand von



Divergenzwerten der Nukleotidsequenzen erstellten phylogenetischen Baum und mit dem von Merenlender et al. (1989) anhand von Allozymdaten erstellten UPGMA Baum. Die Brauchbarkeit der AFLP Marker für phylogenetische Studien kann somit als gegeben angesehen werden.

#### 5.4 Schlußbetrachtung und Folgerungen für die Strategie der Erhaltungszucht von Nashörnern und anderen Wildtieren

Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen am Beispiel der Nashörner, daß AFLP ein brauchbares Hilfsmittel zum Schutz und zur Arterhaltung von vom Aussterben bedrohten Wildtieren ist. Sie ermöglichen eine Abstammungssicherung und dadurch ein effizienteres Herdenmanagement.

Die Erstellung eines Zuchtmanagements für Nashörner wird nötig, da durch den starken Rückgang der Tierbestände durch Wilderer und durch Habitatverlust die noch verbliebenen Nashornpopulationen sehr klein geworden sind, isoliert vorkommen und eine natürliche Migration nicht mehr stattfinden kann. Durch diese Isolierung sind kleine Populationen sehr anfällig für die Auswirkungen von demographischen oder ökologischen Umweltveränderungen (Ashley et al., 1990; Foose, 1991). Durch Gendrift und Inzucht kann es zu einer Verminderung der Variabilität kommen, was zur Folge hat, daß Allele mit einer niedrigen Frequenz innerhalb der Population verloren gehen und auch rezessive Defektgene phänotypisch in Erscheinung treten können. Dies kann dazu führen, daß die Überlebens- und Reproduktionsrate sinkt und die Population weiter reduziert wird (Falconer, 1984; Bauer et al., 1995). Die Anpassungsfähigkeit einer Population an die Umwelt kann mit der Einschränkung ihrer genetischen Zusammensetzung immer mehr abnehmen.

In dieser Studie konnte anhand von AFLP Markern die genetische Variabilität innerhalb der Populationen bestimmt werden. Es wurde gezeigt, daß sowohl der Heterozygotiegrad als auch die Allelzahl bei den untersuchten Nashörnern noch hoch ist, was dafür spricht, daß bisher auch noch ein hoher Grad an genetischer Variabilität in diesen Populationen bewahrt werden konnte. Nur das Indische

Panzernashorn zeigte scheinbar eine Verminderung der Anzahl polymorpher Loci (Tabelle 4), was aber auf die geringe Probenzahl zurückgeführt werden könnte. Der Heterozygotiegrad kann zudem auch Aufschluß über den Grad an Inzucht innerhalb einer Population geben (Swart et al., 1994). Hier kann man feststellen, daß bisher noch keine negativen Effekte durch Inzucht sichtbar sind. Auch wenn Baur & Studer (1995) von einer vermehrten Jugendsterblichkeit bei Indischen Panzernashörnern mit einem hohen Inzuchtkoeffizienten berichten, konnte für diese Art immer noch ein relativ hoher Heterozygotiegrad gefunden werden, der nicht unter den Werten der anderen Arten liegt (Tabelle 6).

Dieser Befund zeigt, daß es also kurzfristig gesehen für die Nashörner wichtiger ist, vor Wilderern und einer weiteren Reduktion der Populationsgröße bewahrt zu werden. Langfristig gesehen sind aber die genetischen Aspekte unbedingt zu berücksichtigen (Foose, 1991; Emslie & Adcock, 1997, S. 149).

Um die bisher noch vorhandene genetische Variabilität und somit die genetische Adaptationsfähigkeit weiter für die Zukunft erhalten zu können und die Auswirkungen von Inzucht zu reduzieren, ist eine Erhaltungszucht erforderlich, die die effektive Populationsgröße in verschiedenen, gesicherten Gebieten erhöht (Minimum Viable Population Concept), um überlebensfähige Populationen zu erhalten (Conway & Goodman, 1989; Moehlmann, 1996). Dies kann durch ein interaktives Management erreicht werden, indem mehrere kleinere Populationen zu einer großen Population (Metapopulation) zusammengefaßt werden, in der genetischer Austausch durch Translokation von Nashörnern stattfindet. In diese Metapopulation können sowohl Tiere in freier Wildbahn als auch in Menschenobhut miteinbezogen werden (Foose, 1991; Price, 1991; Conway, 1995). So wurde von Böer et al. (1997) von einer erfolgreichen Wiederauswilderung eines im Zoo geborenen Breitmaulnashornes in die freie Wildbahn berichtet.

Für eine Translokation sollte jedoch darauf geachtet werden, daß evolutionsbedingte Einheiten und Unterarten getrennt erhalten werden. Auch hier hat sich AFLP als geeignete Methode erwiesen, um Arten und Unterarten genetisch unterscheiden zu können.

Weiter sollte für eine Umsiedlung der individuelle Grad der Verwandtschaft innerhalb einer Population und die Populationsstruktur als Schutz vor möglicher Inzucht

bekannt sein (Moehlmann, 1996), um möglichst wenig miteinander verwandte Tiere in die andere Population zu bringen.

Die Bestimmung der genetischen Distanzen anhand von AFLP Markern und die daraus erfolgte Konstruktion phylogenetischer Bäume kann in Kombination mit wildbiologischen Daten Anhaltspunkte zur Populationsstruktur geben. Da die in dieser Studie erhaltenen Dendrogramme für die individuellen Distanzen jedoch instabil sind, müßten noch weitere Marker untersucht werden, um einen ausreichend hohen Informationsgehalt zu bekommen. Eine Abstammungssicherung kann mit diesem Verfahren unter bestimmten Voraussetzungen erfolgreich für Nachkommen durchgeführt werden, wenn von den fraglichen Eltern geeignetes Probenmaterial verfügbar ist.

Da AFLP nicht sequenzabhängig ist, kann diese Methode nicht nur beim Nashorn, sondern auch bei anderen Wildtieren Anwendung finden. Daher könnte dieses Verfahren auch bei forensischen und zollrechtlichen Fragestellungen (CITES/ WAA) eingesetzt werden, wie dies bereits im Humangenetischen Bereich getan wird (Latorra & Schanfield, 1996).

## 6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war, eine geeignete Methode zur Bestimmung der genetischen Variabilität bei Wildtieren vom Aussterben bedrohter Arten am Beispiel der Nashörner zu entwickeln, da bei kleinen, isolierten Populationen die Gefahr der Verminderung der Variabilität durch Inzucht besteht. Um das Zuchtmanagement und eine damit verbundene Translokation von Tieren zu unterstützen, sollte für das Breitmaulnashorn ein Nachweis zur genetischen Abstammungssicherung erbracht werden, um mehr Informationen über die Populationsstruktur zu sammeln. Weiter sollte gezeigt werden, ob geographisch getrennte Populationen, Unterarten und Arten genetisch unterschieden werden können.

Zu diesem Zweck wurde die sequenzunabhängige Methode AFLP (amplified fragment length polymorphism), die ursprünglich aus der Pflanzenzucht kommt, für das Nashorn erstmals etabliert. Zur Auftrennung genomischer DNA wurden die Restriktionsenzyme EcoRI und TaqI verwendet, die sich für Säugetiere als am Besten erwiesen haben. Es wurden 64 Primerkombinationen getestet und daraus 12 Primerkombinationen für weitere Untersuchungen selektiert.

Die Studie beinhaltete 2 afrikanische Nashornarten, davon eine in 2 Unterarten, das Südliche (Css, n=125) und das Nördliche Breitmaulnashorn (Csc, n=5) und das Spitzmaulnashorn (Db, n=20), sowie eine asiatische Nashornart, das Indische Panzernashorn (Ru, n=6). Das Südliche Breitmaulnashorn war sowohl als freilebende Population einer Wildtierfarm in Südafrika vertreten (n=56), über deren Verwandtschaftsgrade nichts bekannt ist, als auch als Zoopopulation (n=69) verschiedener europäischer Tierparks, für die ein Zuchtbuch geführt wird und über deren Verwandtschaft größtenteils Informationen vorliegen.

Die automatisierte Elektrophorese wurde auf einem LI-COR DNA Sequencer Model 4000L der Firma MWG Biotech, Ebersberg, durchgeführt und mit dem Programm RFLPscan, das von derselben Firma vertrieben wird, analysiert.

Zur weiteren Auswertung der Daten wurde der Anteil polymorpher Banden in jeder Population ermittelt und die Allelfrequenzen der polymorphen Loci aus den 12 selektierten Primerkombinationen berechnet. Als Maß für die genetische Variabilität innerhalb der Populationen wurde der aus den Allelfrequenzen bestimmte Heterozygotiegrad und die Anzahl polymorpher Loci als Anhaltspunkt genommen.

Die genetischen Distanzen innerhalb und zwischen den Populationen wurden nach Nei & Li (1979) und Hill et al. (1996) berechnet und durch phylogenetische Bäume nach dem Unweighted Pair Group Method Average (UPGMA, Sneath and Sokal, 1973) dargestellt. Die Stabilität der Dendrogramme wurde mittels Bootstrapping über die Loci mit 500 bzw. 1000 Wiederholungen überprüft (Felsenstein, 1985).

Es zeigte sich, daß jede Nashornart ein artspezifisches AFLP-Bandenmuster aufwies und es konnten für alle Arten polymorphe Banden festgestellt werden.

Zwischen der Zoo- und Wildpopulation des Südlichen Breitmaulnashornes konnte nicht unterschieden werden. Auch die beiden Unterarten des Breitmaulnashornes zeigten ein sehr ähnliches Bandenmuster, sie konnten jedoch klar anhand von fehlenden oder zusätzlichen Banden und der genetischen Distanz als Unterarten unterschieden werden. Die Einteilung als Unterarten konnte somit bestätigt werden, was auch mit historischen Daten übereinstimmt, da man annimmt, daß eine räumliche Trennung und damit eine separate Entwicklung der beiden Unterarten bereits vor mehr als 1 Million Jahren stattfand. Auch der höhere Anteil polymorpher Loci und der höhere Heterozygotiegrad beim Nördlichen Breitmaulnashorn im Vergleich zu seinem Südlichen Verwandten, deckt sich mit den geschichtlich bedingten Erwartungen. Für das Nördliche Breitmaulnashorn setzte eine extreme Reduktion der Population erst in den letzten Jahrzehnten ein. Genetisch gesehen werden somit noch die wesentlich größeren Bestandszahlen repräsentiert, in denen auch Allele mit niedriger Frequenz vorhanden sind, während das Südliche Breitmaulnashorn bereits am Anfang des 20. Jahrhunderts durch einen genetischen Flaschenhals gegangen ist, in dem es zu einer Reduktion der Allele kam. Diese Reduktion der Allele spiegelt sich selbst in dem heutigen, wesentlich größeren Bestand wider.

Der Anteil polymorpher Banden, der bei einer untersuchten Unterart des Spitzmaulnashornes gefunden wurde, ist der höchste, der innerhalb der verschiedenen Arten und Unterarten ermittelt wurde. Man kann daraus erkennen, daß noch eine sehr hohe Variabilität in dieser Population erhalten ist. Der relativ niedrige Heterozygotiegrad läßt allerdings darauf schließen, daß hier viele Allele mit einer niedrigen Frequenz vorhanden sind. Da hier die Bestandszahlen in den letzten Jahrzehnten drastisch abgenommen haben, könnten diese Allele in einem aktuellen genetischen Flaschenhals verloren gehen.

Auch für 6 Indische Nashörner lassen sich anhand des Anteils polymorpher Banden Auswirkungen eines genetischen Flaschenhalses feststellen, der vor einigen Jahrzehnten stattfand.

Mit einem für alle Nashornspezies berechneten durchschnittlichen Heterozygotiegrad von 0.36 für alle polymorphen Loci, die anhand dominanter AFLP Marker ermittelt wurden, scheinen alle Populationen dennoch einen recht hohen Grad an genetischer Variabilität bewahrt zu haben. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Abnahme der Bestandszahlen erst vor relativ kurzer Zeit stattfand und somit genetisch gesehen noch eine wesentlich größere Population repräsentiert wird, deren Variabilität aber in Anbetracht der geringen Bestandszahlen abnehmen kann. Durch ein gutes Zuchtmanagement könnte diese Variabilität weitgehend erhalten bleiben, wenn man verschiedene kleine Populationen als eine große Meta-Population zusammenfaßt. Eine hohe genetische Variabilität beim Nashorn steht im Gegensatz dazu, was für andere vom Aussterben bedrohte Tierarten, wie dem Geparden oder den Przewalski-Pferden berichtet wird, die bereits Inzuchtprobleme zeigen.

Für einen Abstammungsnachweis wurde eine kombinierte Ausschlußrate von 90 bis 99 % erreicht. Für 13 Kälber einer Wildtierfarm in Südafrika mit bekannter Mutter, sollte das mögliche Vätertier aus einer Anzahl von 5 in Frage kommenden Bullen ermittelt werden. Dies gelang für 11 der Kälber, bei 2 Tieren konnten 2 Bullen nicht als Vätertier ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß die verwendete Methode AFLP sich trotz des dominanten Charakters der Marker zur Bestimmung der Variabilität innerhalb und zwischen Populationen bei Wildtieren eignet. Es konnte sowohl zwischen Arten als auch zwischen Unterarten und Einzeltieren unterschieden werden und ein Abstammungsnachweis konnte für Tiere durchgeführt werden, bei denen Blut- oder Gewebeproben beider möglicher Elterntiere vorhanden sind. AFLP kann somit helfen, Populationsstrukturen besser auf genetischer Ebene aufzuklären und damit einen Beitrag zur Erhaltungszucht zu leisten.

## 7. Summary

**Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), a model of genetic wildlifemanagement in rhinoceros (*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*, *Rhinoceros unicornis*):**

The aim of this study was the development of a suitable method to detect genetic variability in small isolated populations of wildlife species endangered by inbreeding. The rhinoceros was taken as an example.

To support breeding management and translocation, a genetic dependency test for the southern white rhinoceros was to be established to get more information about the population structure. It was also to be determined if geographically divided populations, subspecies and species can be distinguished on a genetic basis.

This work reports on the use of a new method for rhinoceros; amplified fragment length polymorphism (AFLP). The method was originally invented for plant breeding. The restriction enzymes EcoRI and TaqI were used for the digestion of genomic DNA as suggested for mammals. A set of 64 AFLP primer combinations was analysed and 12 primer combinations were selected for further investigation.

The study comprised two African rhinoceros species, the black rhinoceros (n=20), two subspecies of the white, the southern (n=125) and the northern (n=5), and an Asian species, the great Indian one-horned rhinoceros (n=6). The samples of the southern white rhinoceros consisted of a free ranging population of 56 animals from a game farm in South Africa where no knowledge about the population structure existed, and of a population (n=69) from different European zoological parks, for which an international studbook is kept and dependency or origin is generally known.

PCR-products were detected by using LI-COR DNA Sequencer Model 4000L (MWG Biotech). The obtained raw data were analyzed by software package RFLPscan (Scanalytics, supplied by MWG Biotech). Further analysis of data included estimating of allele frequency from polymorphic loci obtained by 12 selected primer combinations for all populations. Genetic variability was measured from the level of heterozygosity determined by allele frequency, and the number of polymorphic loci observed.

Genetic distance within and between populations was calculated following Nei & Li (1979), and Hill et al. (1996). Phylogenies of relationships were constructed from these distance matrices by Unweighted Pair Group Method Average (UPGMA, Sneath and Sokal, 1973). Stability and reliability of the trees were obtained by bootstrapping over loci with 500 or 1000 re-sampling steps (Felsenstein, 1985)

All species showed a specific AFLP banding pattern, and for all rhinoceros species polymorphic bands could be detected. Zoo and wild population of southern white rhinoceros could not be differentiated. Both white rhinoceros types showed similar DNA fingerprint banding patterns, but they could be clearly differentiated as two different subspecies by single extra bands present or absent. The subdivision of northern and southern white rhinoceros could be also confirmed by the genetic distance. These findings correlate with historic data, since the separation of these two subspecies seem to have occurred more than a million years ago.

Compared with the southern white rhinoceros, a higher rate of polymorphic bands and a higher average heterozygosity was found for the northern white rhinoceros. Looking to history, this result was expected, since extreme reduction in population size occurred only recently for the northern white rhinoceros which seems to retain still the high genetic variability of the former large population size while it's southern relative went through a genetic bottleneck at the beginning of the 20<sup>th</sup> century which is reflected as reduction in alleles with low frequency in today's much larger population.

The highest level of polymorphic bands was found within the *michaeli* subspecies of the black rhinoceros, so high genetic variability seems to be preserved. A relatively low heterozygosity shows a high rate of alleles with low frequencies for this population, which could be lost in the present genetic bottleneck since there has been a drastic reduction in population in the last few years.

For the 6 great Indian one-horned rhinoceros compared to other rhinoceros species the rate of polymorphic bands was slightly reduced. This also could have been caused by a genetic bottleneck in recent times.

In contrast to the cheetah or the Przewalski's horse, which show significant signs of inbreeding after experiencing near extinction, these findings of high heterozygosity in rhinoceros are noteworthy. This may result from the relatively recent population crash, which still retains the diversity of the former large populations. But this can be

lost quickly. However if the different rhinoceros populations are treated as a meta-population, and good breeding management is applied, the different species could still preserve high proportions of genetic variation.

For parentage testing, a combined exclusion rate between 90 and 99% was reached. For 13 calves of a game farm with a known mother, the most probable sire among the 5 possible bulls should be determined. This succeeded completely for 11 calves, but for 2 animals there were 2 bulls which could not be excluded as the possible sires.

The results of this study show that AFLP is a useful method to determine genetic variability within as well as between wildlife populations, even though the AFLP markers are generally dominant. Species and subspecies, as well as individuals could be distinguished. It was possible to perform parentage testing if tissue or blood samples of both probable parents were present. AFLP could help to obtain more information on genetic population structures and could provide with it a useful tool for conservation.

## 8. Literaturverzeichnis

Adcock, K. & Emslie, R.H. (1997): Biologie, Verhalten und Ökologie des Spitzmaul-Nashornes. Die Nashörner, Filander Verlag, Fürth: 114-137

Ajmone-Marsan, P., Valentini, A., Cassandro, M., Vecchiotti-Antaldi, G., Bertoni, G. & Kuiper, M. (1997): AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle. *Animal Genetics* 28: 418-426

Ali, S., Azfer, M. A., Bashamboo, A., Mathur, P. K., Malik, P. K., Mathur, V. B., Raha, K. & Ansari, S. (1999): Characterisation of a species-specific repetitive DNA from a highly endangered wild animal, *Rhinoceros unicornis*, and assessment of genetic polymorphisms by microsatellite associated sequence amplification (MASA). *Gene* 228: 33-42

Amato, G.D., Ashley, M. & Gatesy, J. (1991): Molecular evolution in living species of rhinoceros: implications for conservation. Proceedings of an International Conference on "Rhinoceros Biology and Conservation", 9.-11. May 1991, San Diego: 114-122

Ashley, M.V., Melnick, D.J. & Western, D. (1990): Conservation Genetics of the Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*), I: Evidence from the Mitochondrial DNA of Three Populations. *Conservation Biology* 4 (1): 71-77

Baur, B. & Studer, P. (1995): Inbreeding in captive Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). *Int. Zoo Yhb.* 34: 205-211

Bertschinger, H.J. (1994): Reproduction in Black and White Rhinos: a review. Proceedings of a Symposium on "Rhinos as Game Ranch Animals", 9&10 September 1994, Onderstepoort: 155-160

Böer, M., Brain, C., Cantzler, T. & Hamza, H. (1997): Reintroduction of a captive born White rhinoceros to the Etosha National Park. *Zool. Garten* 67 (3): 99-107

Bouman, J. & Bos, H. (1979): Two symptoms of inbreeding depression in Przewalski's horses living in captivity: Genetics and Hereditary Diseases of the Przewalski's Horse. Foundation for the Preservation and Protection of the Przewalski's Horse, Rotterdam: 111-118

Cervera, M.T., Gusmao, J., Steenackers, M., Van Gysel, A., Van Montagu, M. & Boerjan, W. (1996): Application of AFLP-based molecular markers to breeding of *Populus ssp.*. *Plant Growth Regulation* 20: 47-52

Chakraborty, R. & Nei, M. (1977): Bottleneck effects on average heterozygosity and genetic distance with the stepwise mutation model. *Evolution* 31: 347-356

Chakraborty, R., Fuerst, P.A. & Nei, M. (1980): Statistical studies on protein polymorphism in natural populations. III. Distribution of allele frequencies and the number of alleles per locus. *Genetics* 94: 1039-1063

Chakraborty, R., Meagher, T.R. & Smouse, P.E. (1988): Parentage Analysis With Genetic Markers in Natural Populations. The Expected Proportions of Offspring With Unambiguous Paternity. *Genetics* 118: 527- 536

Cohn, J.P. (1990): Genetics for wildlife conservation. *BioScience* 40 (3): 167-171

Conway, A.J. & Goodman, P.S. (1989): Population Characteristics and Management of Black Rhinoceros *Diceros bicornis minor* and White Rhinoceros *Ceratotherium simum simum* in Ndumu Game Reserve, South Africa. *Biological Conservation* 47: 109-122

Conway, A.J. (1995): Wild and zoo animal interactive management and habitat conservation. *Biodiversity and Conservation* 4: 573-594

Dinerstein, E. & McCracken, G.F. (1990): Endangered Greater One-horned Rhinoceros Carry High Levels of Genetic Variation. *Conservation Biology* Vol. 4: 417-422

Dodgson, J.B., Cheng, H.H. & Okimoto, R. (1997): DNA Marker Technology: A Revolution in Animal Genetics. *Poultry Science* 76:1108-1114

Emslie, R.H. & Adcock, K. (1997): Management und Schutz des Spitzmaulnashornes. *Die Nashörner*, Filander Verlag, Fürth: 138-151

Emslie, R.H. & Adcock, K. (1997): Bestandszahlen des Breitmaulnashornes. *Die Nashörner*, Filander Verlag, Fürth: 196-203

Emslie, R.H. & Adcock, K. (1997): Der Handel mit Nashornprodukten. *Die Nashörner*, Filander Verlag, Fürth: 204-218

Falconer, D. S. (1984): Einführung in die Quantitative Genetik. UTB, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart: 17-19, 29-31, 75, 82, 97-98

Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies. An approach using the bootstrap. *Evolution* 35: 783-791

Felsenstein, J. (1993): PHYLIP – Phylogeny Interference Package, Version 3.5. Department of Genetics, Washington University, Seattle, WA

Foose, T.J. (1991): Global management of rhinos. Proceedings of an International Conference on "Rhinoceros Biology and Conservation", 9.-11. May 1991, San Diego: 32-45

Foose, T.J. (1996): Taxonomy and Conservation Status. AZA Rhinoceros Husbandry Resource Manual. Herausgeber: Fouraker, M. & Wagener, T., Forth Worth Zoological Park: 1-10

Fuerst, P.A. & Maruyama, T. (1986): Considerations on the conservation of alleles and genetic heterozygosity in small managed populations. *Zoo Biology* 5: 171-179

Gansloßer, U. (1998): Populationsgenetische Aspekte des Zoo- und Zuchtmanagements. Kurs Tiergartenbiologie, Filander Verlag, Fürth: 59

George, M., Jr., Chemnick, L.G., Cisova, D., Gabrisova, E., Stratil, A. & Ryder, O.A. (1991): Genetic differentiation for white rhinoceros subspecies: diagnostic differences in mitochondrial DNA and serum proteins. Proceedings of an international conference on "Rhinoceros Biology and Conservation", 9.-11. May 1991, San Diego: 105-113

Gölthenboth, R. & Ochs, A. (1995/97/99): Internationales Zuchtbuch für Afrikanische Nashörner, Band 6/7/8. Zoologischer Garten Berlin

Greef, J.M., Deuter, M., Jung, C. & Schondelmaier, J. (1997): Genetic diversity of European *Miscanthus* species revealed by APLP fingerprinting. *Genetic resources and crop evolution* 44: 185-195

Groves, C.P. (1991): Testing rhinoceros subspecies by multivariate analysis. Proceedings of an International Conference on "Rhinoceros Biology and Conservation", 9.-11. May 1991, San Diego: 92-104

Groves, C.P. (1997): Die Nashörner - Stammesgeschichte und Verwandtschaft. *Die Nashörner*, Filander Verlag, Fürth: 14-32

Harley, E.H. & O'Ryan, C.O. (1991): Molecular genetic studies of Southern African rhinoceros. Proceedings of an International Conference on "Rhinoceros Biology and Conservation", 9.-11. May 1991, San Diego: 56-58

Harley, E.H. & O'Ryan, C.O. (1994): Use of molecular genetics in rhinoceros conservation. Proceedings of a Symposium on "Rhinos as Game Ranch Animals", 9&10 September 1994, Onderstepoort: 101

Houck, M.L., Ryder, O.A, Vahala, J, Kock, R. & Oosterhuis, J.E. (1994): Diploid Chromosome Number and Chromosomal Variation in the White Rhinoceros (*Ceratotherium simum*). *Journal of Heredity* 85: 30-34

Hill, M., Witsenboer, H., Zabeau, M., Vos, P., Kesseli, K. & Michelmore, R. (1996): PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lacluca* spp.. *Theor. Appl. Genet.* 93:1202-1210

Hillman-Smith, K. (1997): Das Nördliche Breitmaul-Nashorn. *Die Nashörner*, Filander Verlag, Fürth: 173-183

International Rhino Foundation (1999): <http://www.rhinos-irf.org>

Jamieson, A. & Taylor, S.C.S. (1997): Comparison of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics* 28: 397-400

Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M. & Kersters, K. (1996): Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142: 1881-1893

- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, M.O., Sala, F., van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevschi, A., Marmioli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A. & Karp, A. (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP, SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular breeding* 3: 381-390
- Karp, A., Seberg, O. & Buiatti, M. (1996): Molecular Techniques in the Assessment of Botanical Diversity. *Annals of Botany* 78: 143-149
- Karp, A. & Edwards, K.J. (1997): DNA markers: a global overview. *DNA Markers: Protocols, Applications, and Overview*, Herausgeber: Caetano-Anollés, G. & Gresshoff, P.F., Wiley-VCH Verlag, New York: 1-13
- Knorr, C., Cheng, H.H. & Dodgson, J.B. (1999): Application of AFLP markers to genome mapping in poultry. *Animal Genetics* 30: 28-35
- Kohn, M.H. & Wayne, R.K. (1997): Facts from feces revised. *TREE* 12 (6): 223-227
- Krauss, S.L. (1999): Complete exclusion of nonsires in an analysis of paternity in a natural plant population using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular Ecology* 8: 217-226
- Lanyon, S.M. (1985): Detecting internal inconsistencies in distance data. *Systematic Zoology* 34: 397-403
- Latorra, D. & Schanfield, M.S. (1996): Analysis of human specificity in AFLP Systems APOB, PAH, and D1S80. *Forensic Science International* 83: 15-25
- Laurie, A. (1982): Behavioural ecology of the greater one-horned rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). *J. Zool., Lond.* 196: 307-341
- Laurie, A. (1997): Das Indische Panzernashorn. Die Nashörner, Filander Verlag, Fürth: 95-113
- Mackill, D.J., Zhang, Z., Redona, E.D. and Colowit, P.M. (1996): Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* 39: 969-977
- Majer, D., Mithen, R., Lewis, B.J., Vos, P. & Richard, P.O. (1996): The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycol. Res.* 100: 1107-1111
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982): Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory: 98-99
- Maughan, P.J., Saghai Maroof, M.A., Buss, G.R. & Huestis, G.M. (1996): Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93: 392-401
- Meister, J. & Owen-Smith, N. (1997): Das Breitmaul-Nashorn. Die Nashörner, Filander Verlag, Fürth: 163-172
- Medjugorac, I. (2000): Fortran, purpose-built analysis programs. Nicht publizierte Arbeit
- Merenlender, A.M., Woodruff, D.S., Ryder, O.A., Kock, R. & Vahala, J. (1989): Allozyme Variation and Differentiation in African and Indian Rhinoceroses. *Journal of Heredity* 80: 377-382
- Mertes, G., Schäfer, T., Schild, T.A., Schmidt, G., Schuster, D., vom Stein, J. (Hrsg.) (1997): Automatische genetische Analytik: 53
- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J.E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W. & Waugh, R. (1997): Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding* 3: 127-136
- Moehiman, P.D., Amato, G. & Runyoro, V. (1996): Genetic and Demographic Threats to the Black Rhinoceros Population in the Ngorongoro Crater. *Conservation Biology* 10: 1107-1114
- Morales, J.C. & Melnick, D.J. (1994): Molecular Systematics of the Living Rhinoceros. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3: 128-134
- Mueller, U.G. & Wolfensbarger, L.L. (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. *TREE* vol.14, no. 10: 389-394
- Nei, M., Maruyama, T. & Chakraborty, R. (1975): The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1-10
- Nei, M. (1978): Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590
- Nei, M. & Li, W.H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 76: 5269-5273
- Nei, M., Stephens, J.C. & Saitou, N. (1985): Methods for Computing the Standard Errors of Branching points in an Evolutionary Tree and Their Application to Molecular Data from Humans and Apes. *Mol. Biol. Evol.* 2 (1): 66-85
- Nei, M. (1987): Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York: 176-192, 208, 222-254, 287-326
- Neuschulz, N. & Meister, J. (1998): Nashörnern auf der Spur. Verein der Zooparkfreunde in Erfurt e.V., Erfurt
- Newton, C.R. & Graham, A. (1994): PCR. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: 19-25, 30-32
- O'Brian, S.J., Roelke, M.E., Marker, L., Newman, A., Winkler, C.A., Meltzer, D., Colly, L., Evermann, J.F., Busch & M., Wildt, D.E. (1985): Genetic Basis for Species Vulnerability in the Cheetah. *Science*, Vol. 227: 1428-1434

O'Ryan, C. & Harley, E.H. (1993): Comparison of Mitochondrial DNA in Black and White Rhinoceroses. *J. Mamm.* 74(2): 343-346

O'Ryan, C., Flamand, J.R.B. & Harley, E.H. (1994): Mitochondrial DNA variation in black rhinoceros (*Diceros bicornis*) - conservation management implications. *Conservation Biology* 8: 495-500

Olsen, M., Den Bieman, M., Kuiper, M.T.R., Pravenec, M., Kren, V., Kurtz, W., Jacob, J., Lankhorst, A. & Van Zutphen, B.F.N. (1996): Use of AFLP Markers for Gene Mapping and QTL Detection in the Rat. *Genomics* 37: 289-294

Page, R.D.M., Tree View (Win 32) 1.52. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod.html>

Faul, S., Wachira, F.N., Powell, W. & Waugh, R. (1997): Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea revealed by AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 255-263

Penny, M. (1988): The Medical Uses of Rhinoceros Products. Rhinos, Facts On File Publications, New York: 70-78, 87

Perkin Elmer, AFLP Plant Mapping Kit, The PCR Marker of Choice for Plant mapping

Pienaar, D.J. (1994): Habitat Preference of the White Rhino in the Kruger National Park. Proceedings of a Symposium on "Rhinos as Game Ranch Animals", 9&10 September 1994, Onderstepoort: 59-64

Pienaar, D.J. (1994): Social organisation and behaviour of the White Rhinoceros. Proceedings of a Symposium on "Rhinos as Game Ranch Animals", 9&10 September 1994, Onderstepoort: 87-92

Pirchner, F. (1979): Populationsgenetik in der Tierzucht. Paul Parey Verlag, Hamburg & Berlin: 282-283

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., & Rafalski, A. (1996): The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (mikrosatelliten) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238

Price, M.R.S. (1991): What will it take to save the rhino? Proceedings of an International Conference on "Rhinoceros Biology and Conservation", 9.-11. May 1991, San Diego: 48-61

Prothero, D.R. (1991): Fifty Million Years of Rhinoceros Evolution. Proceedings of an International Conference on "Rhinoceros Biology and Conservation", 9.-11. May 1991, San Diego: 82-91

Qi, X. & Lindhout, P. (1997): Development of AFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genetic* 254: 330-336

Raath, J.P. (1994): Anaesthesia of the White Rhino. Proceedings of a Symposium on "Rhinos as Game Ranch Animals", 9&10 September 1994, Onderstepoort: 119-127

Reeve, H.K., Westneat, D.F. & Queller, D.C. (1992): Estimating average within-group relatedness from DNA fingerprints. *Molecular Ecology* 1: 223-232

Rosnagel, I. (1999): Untersuchung zur Biodiversität verschiedener Kaltblut- und Primitivpferderassen. Dissertation, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität München

Rothwell, N. V. (1993): Understanding genetics: a molecular approach. Wiley-Liss, Inc., New York: 562-564

Roupe van der Voort, J.N., van Zandvoort, P., van Eck, H.J., Folkertsma, R.T., Hutten, R.C., Draaistra, J., Gommers, F.J., Jacobson, E., Helder, J. & Bakker, J. (1997): Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol. Gen. Genet.* 255: 438-447

Sharbel, T.F. (1999): Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP): A Non Random PCR-Based Technique for Multilocus Sampling. A laboratory guide to DNA. Herausgeber: Epplen, J.T. & Lubjuhn, T., Birkhäuser Verlag: 182-199

Simons, G., van der Lee, T., Diergaarde, P., van Daelen, R., Groenendijk, J., Frijters, A., Büschges, R., Hollricher, K., Töpsch, S., Schulze-Lefert, P., Salamini, F., Zabeau, M. & Vos, P. (1997): AFLP-Based Fine Mapping of the Mlo Gene to a 30-kb DNA Segment of the Barley Genome. *Genomics* 44: 61-70

Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. (1973): Numerical Taxonomy. W.H. Freeman, San Francisco

Stratil, A., Bobak, B., Kalab, P., Cizova, D. & Pokorny, R. (1990): Serum proteins of rhinoceros: inter- and intraspecific variation. *Comparative Biochemical Physiology* 95B(4): 803-810

Studer, P. (1998): International Studbook for the greater one-horned rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). Basel Zoo

Swart, W.K.J. & Ferguson, J.W.H. (1994): How vulnerable is the Black Rhino? A genetic and demographic analysis. Proceedings of a Symposium on "Rhinos as Game Ranch Animals", 9&10 September 1994, Onderstepoort: 55-58

Swart, W.K.J., Ferguson, J.W.H., DuToit, R. & Flamand, J.R.B. (1994): Substantial genetic variation in southern African black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Journal of Heredity* 85: 261-266

Swart, W.K.J. & Ferguson, J.W.H. (1997): Conservation implications of genetic differentiation in southern African populations of black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Conservation Biology* 11: 79-83

Swatschek, I. (1992): Verwandtschaftsanalyse mittels DNA-Fingerprinting. *BIO forum* 5: 147-151



Toit du, J.G. (1994): White and Black Rhinoceros as game ranch animals. Proceedings of a Symposium on "Rhinos as Game Ranch Animals", 9&10 September 1994, Onderstepoort: 111-116

Travis, S.E., Maschinski, J. & Keim, P. (1996): An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. *Molecular Ecology* 5: 735-745

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Rejans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids. Res.* 23: 4407-4414

Vos, P. & Kuiper, M. (1997): AFLP analysis. *DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews*, Herausgeber: Caetano-Anollés, G. & Gresshoff, P.F., Wiley-VCH Verlag, New York: 115-131

Walker, C.H. (1994): Rhinos in Africa - The Present Situation. Proceedings of a Symposium on "Rhinos as Game Ranch Animals", 9&10 September 1994, Onderstepoort: 1-3

Walzer, C. (1998): Dermal anesthesia in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) using a eutectic mixture of Lidocaine and Prilocaine. *J. Zoo Wildl. Med.* 29 (3): 300-302

Walzer, C. (1997/1998): persönliche Mitteilungen

Wiesner, H. & Mattei, G. (1998): *Im Garten der Tiere*. Wilhelm Heyne Verlag, München: 87, 89, 101

Wooten, M.C. & Smith, M.H. (1985): Large Mammals are genetically less variabel ? *Evolution* 39 (1): 210-212

Zabeau, M. & Vos, P. (1993): Selective Restriction Fragment Amplification: A general method for DNA fingerprinting. European Patent Application EP 0534858

## 9. Anhang

### 9.1 Bezugsquellen für Chemikalien, Enzyme und Material

#### Geräte und Laborhilfsmittel:

- DNA-Sequencer LI-COR 4000L (MWG Biotech, Ebersberg)
- Laborzentrifuge Zentrifuge Universal 16R (Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen)
- Oligonukleotidsynthese Gene Assembler Plus (Pharmacia LKB, Freiburg)
- Photometer Ultrospec III (Pharmacia LKB, Freiburg)
- Pipetten Pipetman (Gilson, Villier-le-Bel, Frankreich)
- Pipettenspitzen (Biozym, Oldendorf)
- Tischzentrifuge (Hettich, Tuttlingen)
- Thermocycler Hybaid OmniGene (MWG-Biotech, Ebersberg)
- Thermoschüttler Thermomixer 5436 (Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen)
- Vortex (Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen)

#### Puffer, Lösungen und Reagenzien:

- AFLP-Verdünner 10mM Tris  
0,1mM EDTA, pH 8.0
- APS Ammonium Persulfat (Sigma, Deisenhofen)
- Aqua bidest (Sigma, Deisenhofen)
- ATP Adenosin-5'-triphosphat (Boehringer, Mannheim)
- Borsäure (Roth, Karlsruhe)
- BSA Bovines Serumalbumin, 100x, 10 mg/ml  
(New England Bio Labs, Schwalbach/Taunus)

- Chloroform (Sigma, Deisenhofen)
- DMSO Dymethylsulfoxyd (Sigma, Deisenhofen)
- DNA-Polymerase Dynazyme, 2 U/μl/250μl (Finnzymes, Espoo, Finland)
- dNTP (Peqlab, Erlangen)
- dNTP mix, 10mM/500μl Deoxynucleosidetriphosphat in H<sub>2</sub>O gelöst, pH 7  
dATP, 2'-Deoxyadenosin 5'-Triphosphate,  
C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>P<sub>3</sub>Na<sub>4</sub>;  
dGTP, 2'-Deoxyguanosin 5'-Triphosphat,  
C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub>P<sub>3</sub>Na<sub>4</sub>;  
dCTP, 2'-Deoxycytidin 5'-Triphosphat,  
C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>13</sub>P<sub>3</sub>Na<sub>4</sub>;  
dTTP, 2'-Deoxythymidin 5'-Triphosphat,  
C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>14</sub>P<sub>3</sub>Na<sub>4</sub>;  
(Finnzymes, Espoo, Finland)
- EcoRI 20x (New England Bio Labs, Schwalbach/ Taunus)
- EDTA (Roth, Karlsruhe)
- Ethanol (Roth, Karlsruhe)
- Formamid (deion.) (Sigma, Deisenhofen)
- Lysispuffer 50 mM Tris-HCl, pH 8.0  
100 mM NaCl  
100 ml EDTA, pH 8.0  
SDS 1 %
- Mineralöl (Sigma, Deisenhofen)
- M13MP18-DNA (MBI Fermentas GmbH, Deutschland)
- Natriumazetat (Roth, Karlsruhe)
- Phenol (Roth, Karlsruhe)
- Phenol/Chloroform (Roth, Karlsruhe)

- Proteinase K (Sigma, Deisenhofen)
- Reaktionspuffer (Sigma, Deisenhofen)
- SDS (Sigma, Deisenhofen)
- RL-Puffer Restriktion - Ligation Puffer  
10 mM Tris.HAc  
10 mM MgAc  
50 mM KAc  
5 mM DTT  
pH 7.5
- Sequa Gel XR (National Diagnostics, Hesse Hull, England)
- Complete Buffer Reagent (National Diagnostics, Hesse Hull, England)  
Sequa Gel
- Taq Polymerase (Sigma, Deisenhofen)
- Taq I 10x (New England Bio Labs, Schwalbach/ Taunus)
- TE-Puffer (41cm Gel) 107.8 g Tris  
55.0 g Borsäure  
7.4 g EDTA  
→ auf 1 Liter H<sub>2</sub>O bidest.
- Tris-Base (Roth, Karlsruhe)
- T4 DNA Ligase 400.000 U/ml  
(New England Bio Labs, Schwalbach/ Taunus)
- 10x Puffer 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt (Finnzymes, Espoo, Finland)
- 1x Puffer 10 mM Tris-HCl (pH 8.8 bei 25°C)  
1.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM KCl  
0.1 % Triton X-100  
(Finnzymes, Espoo, Finland)

Verbrauchsmaterialien:

- Biopsie-Hautstanze 8 mm, steril (Stiefel, bezogen über Tierärztebedarf Lehnecke, Schortens)
- Blutentnahmeröhrchen Vacuette mit EDTA (Greiner, bezogen über Schultheiss, München)
- EMLA Pflaster (Astra, Wedel)
- Kerbzange für Schweine (bezogen über Tierärztebedarf Lehnecke, Schortens)
- Kunststoffreaktionsgefäße (Biozym, Oldendorf)
- Makrotubes mit Schraubverschluss (Nalge Nunc Int. Corp., Naperville, USA)

Oligonukleotide:Nichfarbmarkierte Oligonukleotide:

Alle in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide ohne Farbmarkierungen wurden im Institut für Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre der Tierärztlichen Fakultät München mit dem Gerät Gene Assembler Plus der Firma Pharmacia LKB, Freiburg, hergestellt.

Farbmarkierte Oligonukleotide:

Die IRD-800 (Infra Red Dye) markierten Oligonukleotide für den Standard (POS G212, -49 Reverse) und der Primer Eco R1 wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg, hergestellt.

9.2 Übersicht über das ProbenmaterialsAufstellung der Breitmaulnashornpopulation (*Cerathotherium simum simum*) - Thaba Tholo Gamefarm/ Südafrika:Kühe ohne Jungtiere (oder nicht gefangen) und subadulte Weibchen:

Nummer	Name	Alter
203	subadult. Weibchen	sad
204	adultes Weibchen	ad
207	subadult. Weibchen	sad
217	subadult. Weibchen	sad
223	subadult. Weibchen	sad
224	subadult. Weibchen	sad
225	subadult. Weibchen	sad
232	subadult. Weibchen	sad
234	subadult. Weibchen	sad
237	subadult. Weibchen	sad
238	subadult. Weibchen	sad
239	subadult. Weibchen	sad
243	subadult. Weibchen	sad
254	subadult. Weibchen	sad
256	adultes Weibchen	ad
261	adultes Weibchen	ad

Bullen:

Nummer	Name	Alter
220	Bulle	ad
229	Bulle	ad
240	Bulle	ad
242	Bulle	ad
247	Bulle	ad

Subadulte Männchen:

213	226	244
216	230	250
219	231	251

**Adulte Weibchen mit Jungtieren:**

Nummer	Name	Alter	Geschlecht
206	Mutter von 218	adult	f
218	Jungtier 206	subadult	m
208	Mutter von 209	ad	f
209	Jungtier 208	sad	f
211	Mutter von 212	ad	f
212	Jungtier 211	juvenil	m
214	Jungtier 215	juv	m
215	Mutter von 214	ad	f
221	Mutter von 222	ad	f
222	Jungtier 221	juv	m
227	Mutter von 228	ad	f
228	Jungtier 227	juv	m
233	Mutter von 241	ad	f
241	Jungtier 233	juv	f
235	Mutter von 236	ad	f
236	Jungtier 235	juv	m
245	Mutter von 246	ad	f
246	Jungtier 245	juv	m
248	Mutter von 249	ad	f
249	Jungtier 248	juv	m
252	Jungtier 253	juv	m
253	Mutter von 252	ad	f
257	Jungtier 258	juv	m
258	Mutter von 257	ad	f
259	Jungtier 260	juv	f
260	Mutter von 259	ad	f

Aufstellung des Probenmaterials aus Europäischen Zoologischen Gärten:

Labornummer, Hausname, Abkürzung für Standort/Zoo, Geschlecht (m = male/männlich; f = female/weiblich), Zuchtbuchnummer, Vater/ Muttertier, Züchter/ Ursprungsort, Anzahl der Nachkomme, Zuchtbuchnummer/Hausname/Standort der Nachkommen

Quelle:

- Internationales Zuchtbuch für Afrikanische Nashörner (Gölthelboh & Ochs, 1995/ 97/ 99)
- Internationales Zuchtbuch für Indische Panzernashörner (Studer, 1998)

Indisches Panzernashorn ( <i>Rhinoceros unicornis</i> )									
Lab.-nr.	Name	Location	Sex	Studbook	Sire	Dam	Breeder/Origin	Offspring	Studbook/ Name/ Location
301	Ropen	DVur	m	0145	0060	0051	Whipsnade		0245/Nova/DV
302	Numa	DV	f	0093	0041	0034	Stuttgart		0245/Nova/DV
303	Nova	DV	f	0245	0145	0093	DV		
304	Kumar	Whipsnade	m	0060	0018	0031	Berlin		0145/Ropen/DV
305	Behan	Whipsnade	f	0257	wild	wild	Nepal		
306	kein Name	München	f	22.7.99	0152	0148	München		

Südliches Breitmaulnashorn (Cerathotherium simum simum)						
Lab.-nr./Name	Location	Sex	Studbook/Sire	Dam	Breeder/Origin	Offspring Studbook/ Name/ Location
	Austria:					
001 Dany	Saizburg	m	0360 wild	wild	Hühluwe G Res	00
002 Baby	Saizburg	f	0361 wild	wild	Hühluwe G Res	00
003 Kathi	Saizburg	f	0362 wild	wild	Hühluwe G Res	00
004 Benno	Saizburg	m	0676 0618	0620	Knoxville	00
	Denmark:					
005 Oscar	Givskud	m	0221 wild	wild	Umflozi / Beekse Bergen	16 0835/Karlijn/BBE 0938/Anse/BBE
						0964/Yvonne/BBE
						11009/Mirjam/BBE
						1048/Snoske/Amhem
						1064/Huubke/BBE
						0767/Noelle/Palmyre
						0316/Floris/Osnabrück
						0767/Chns/7
						0906/Frans/Claras-Rumania
						1008/Willem/Fuengirola
	France:					
006 Gus	Pans	m	0091 wild	wild	Natal	01 1025/Gilou/Liseux
007 Gaby	Pans	f	0651 0139	0097	Edinburgh	01 11025/Gilou/Liseux
008 Tag	La Palmyre	m	07701 0089	0102	Whipsnade	00
009 Noelle	La Palmyre	f	0767 0221	0225	Beekse Bergen	00
010 Samson	Thory	m	0136 wild	wild	Umflozi	00
011 Dalila	Thory	f	0138 wild	wild	Umflozi	00
	Germany:					
012 Hambamans	Berlin/West	m	0001 wild	wild	Umflozi	00
013 Kema	Erfurt	f	0649 0052	0150	San Diego	00
014 Charly	Hodenhagen	m	0491 wild	wild	Umflozi	17?/Lukas/Madrid
						0969/Kai/Etosh
						0987/Donkey/Fuengirola
						0988/Una/Fuengirola
						0797/Inge/Serranova

Lab.-nr./Name	Location	Sex	Studbook/Sire	Dam	Breeder/Origin	Offspring Studbook/ Name/ Location
						0905/Fabri/Serranova
						0951/Martin/Hodenhagen
						1004/Sator/Hodenhagen
						1043/Jessika2/Hodenhagen
						1125/Norma/Hodenhagen
						1157/Maria/Hodenhagen
						1120/Claudia/Hodenhagen
						1221/Heinz/Hodenhagen
015 Dons	Hodenhagen	f	0494 wild	wild	Umflozi	09 0905/Fabri/Serranova
						0969/Kai/Etosh
						1004/Sator/Hodenhagen
						1157/Maria/Hodenhagen
016 Molly	Hodenhagen	f	0496 wild	wild	Umflozi	09 0987/Donkey/Fuengirola
						0979/Inge/Serranova
						10951/Martin/Hodenhagen
						1043/Jessika2/Hodenhagen
						1125/Norma/Hodenhagen
						1221/Heinz/Hodenhagen
017 Marin	Hodenhagen	m	0951 0491	0496	Hodenhagen	00
018 Sato	Hodenhagen	m	1004 0491	0494	Hodenhagen	00
019 Jessika2/Fissi	Hodenhagen	f	1043 0491	0496	Hodenhagen	00
020 Norma	Hodenhagen	f	1125 0491	0496	Hodenhagen	00
021 Maria	Hodenhagen	f	1157 0491	0494	Hodenhagen	00
022 Joseph	Münster	m	0340 wild	wild	Umflozi	04 0812/Emily/Münster
						0854/Vicky/Münster
023 Natalia	Münster	f	0403 wild	wild	Natal	03 0404/Knoepel/Fuengirola
						0812/Emily/Münster
						0854/Vicky/Münster
024 Emily	Münster	f	0812 0340	0403	Münster	01 0967/Emmi/Münster
025 Vicky	Münster	f	0854 0340	0403	Münster	00
026 Emmi	Münster	f	0967 0340	0812	Münster	00
027 Harry	Münster	m	0974 0089	0329	Whipsnade	00

Lab.-nr	Name	Location	Sex	Studbook Sire	Dam	Breeder/Origin	Offspring	Studbook/ Name/ Location
028	Bianca	Osnabrück	f	0222 wild	wild	Umflozi	00	
029	Flois	Osnabrück	m	0316 0221	0225	Beekse Bergen	00	
<b>Great Britain:</b>								
030		West Midland	f	1174 wild	wild	Huhtuwe G Res		
031		West Midland	f	1175 wild	wild	Huhtuwe G Res		
032		West Midland	f	1061 wild	wild	Natal		
033	Caroline	Whipsnade	f	0105 wild	wild	Umflozi	04	0654/Clara/Whipsnade
034	Trio	Whipsnade	f	0329 0070	0104	Whipsnade	07	0868/Kiri/Marwell
035	Nowana	Whipsnade	f	0489 0070	0102	Whipsnade	00	
036	Clara	Whipsnade	f	0654 0089	0105	Whipsnade	00	
037	Niswa	Whipsnade	m	1011 wild	wild	Umflozi	02	1171/Namakula/Whipsnade
038	Mikumi	Whipsnade	f	0862 0139	0097	Edinburgh	01	1171/Namakula/Whipsnade
039	Makoubu	Whipsnade	f	1047 0089	0329	Whipsnade	00	
040	Namakula	Whipsnade	f	1171 1011	0862	Whipsnade	00	
041	Niswa?	Whipsnade	m	7/8.4.1997	1011	0329	00	
042	Kin	Marwell	f	0868 0089	0329	Whipsnade	00	
043	Sula	Marwell	f	0856 0139	0097	Edinburgh	00	
044	Hannu	Marwell	m	0828 0355	0352	Knowsley	00	
045	Maggot	Prescot Knowsley		0352 wild	wild	Zululand	03	0329/Hannu/Marwell
046	Winston	Longleat	m	0255 wild	wild	Umflozi	00	
047	Thelma	Longleat	f	0260 wild	wild	Umflozi	00	
048	Babs	Longleat	f	0261 wild	wild	Umflozi	00	
049	Ginginhlowu	Longleat	m	0089 wild	wild	Umflozi/Whipsnade	23	0504/Gracie/Paignton
								0654/Clara/Whipsnade

Lab.-nr	Name	Location	Sex	Studbook Sire	Dam	Breeder/Origin	Offspring	Studbook/ Name/ Location
								107707/Tag/La Palmyre
								0800/M. gambo/Sofia
								0868/Kiri/Marwell
								0907/Gingabelle/Emmen
								0918/Charlie/Port St. Pere
								0974/Harry/Münster
								1010/Chris/Lisieux
								1047/Makoubu/Whipsnade
<b>Netherlands:</b>								
050	Smoske	Arnhem	m	1048 0221	0225	Beekse Bergen	00	
051	Freya	Arnhem	f	0230 wild	wild	Umflozi	01	
052	Gea	Arnhem	f	0174 wild	wild	Umflozi	04	0643/Petra/Arnhem
053	Roelie	Arnhem	f	0175 wild	wild	Umflozi	00	
054	Ineke	Arnhem	f	0171 wild	wild	Umflozi	00	
055	Henk	Arnhem	m	0229 wild	wild	Umflozi	00	
056	Petra	Arnhem	f	0643 0167	014	Arnhem	00	
057	Bort	Emmen	m	0343 wild	wild	Umflozi	02	1156/Kapamsar/Vernbee
058	Jenny	Emmen	f	0344 wild	wild	Umflozi	00	7/Banyari/Emmen
059	Gingabelle	Emmen	f	0907 0089	0102	Whipsnade	02	1156/Kapamsar/Vernbee
								1183/Banyari/Emmen
060	Banyari	Emmen	m	1183 0343	0907	Emmen	00	
061	Nelly	Beekse Bergen	f	0225 wild	wild	Umflozi	09	0938/Ansjer/Beekse Bergen
								0316/Flois/Osnabrück
								0787/Noelle/La Palmyre
								1008/Willem/F uengirola
								1048/Smoske/Arnhem
								1203/Oounia/Beekse Bergen
062	Pacha	Beekse Bergen	f	0224 wild	wild	Umflozi	08	0796/Chris/Lille
								0835/Kadijn/Beekse Bergen
								0964/Y vonner/Beekse Bergen
								1009/Mirjam/Beekse Bergen

Lab.-nr.	Name	Location	Sex	Studbook	Sire	Dam	Breeder/Origin	Offspring	Studbook/ Name/ Location
063	Mira	Beekse Bergen	f		0223 wild	wild	Umfolozi	00	11064/Huubke/Beekse Bergen
064	Katijn	Beekse Bergen	f	0835	0221	0224	Beekse Bergen	00	
065	Ansje	Beekse Bergen	f	0938	0221	0225	Beekse Bergen	00	
066	(Yvonne)	Beekse Bergen	f	0964	0221	0224	Beekse Bergen	00	keine DNA !!!
067	Miriam	Beekse Bergen	f	1009	0221	0224	Beekse Bergen	00	
068	Balthazar	Beekse Bergen	m	0076	0057	0059	Pretoria	00	
069	Huubke	Beekse Bergen	m	1064	0221	0224	Beekse Bergen	00	
070	Dounia	Beekse Bergen	f	1203	0076	0225	Beekse Bergen	00	
<b>Nördliches Breitmaulnashorn (Cerathotherium simum cottoni)</b>									
090	Sudan	Dvur Kralove	m	0372	wild	wild	Shambe Sudan	02	0785/Nabire
091	Nesari	Dvur Kralove	f	0377	wild	wild	Shambe Sudan	00	0943/Najin
092	Suni	Dvur Kralove	m	0630	0373	0351	Dvur Kralove	00	
093	Nabire	Dvur Kralove	f	0789	0372	0351	Dvur Kralove	00	
094	Najin	Dvur Kralove	f	0943	0372	0351	Dvur Kralove	00	

<b>Spitzmaulnashorn (Diceros bicornis michaeli)</b>									
Lab.-nr.	Name	Location	Sex	Studbook	Sire	Dam	Breeder/Origin	Offspring	Studbook/ Name/ Location
100	Kilaguni	Berlin-West BW	f	0220	wild	wild	Kenya	4	0366/Ine/Berlin-West 0532/Fisa/Köln
101	Mzima	BW	f	0240	wild	wild	Kenya	6	0610/Indugu/Berlin-West
102	Ine	BW	f	0366	0219	0220	BW	1	0546/Kumi/Berlin-West
103	Sila	BW	f	0428	0166	0298	BW	0	
104	Kibo	BW	m	0009	wild	wild	Tsevo Nat. Park	4	0610/Indugu/Berlin-West 0573/Sukari/Berlin-West
105	Kumi	BW	f	0546	0347	0366	BW	0	
106	Indugu	BW	m	0610	0009	0240	BW	0	
107	Sukari	BW	f	0673	0009	0220	BW	0	
108	Jimmi	Dvur Kralove DV	f	0175	wild	wild	Kenya	6	0283/Jim/DV 0387/Jess/DV
109	Sali	DV	f	0282	0170	0217	DV	5	0689/Jane Lee/DV
110	Isis	DV	m	0268	0247	0180	Cincinnati	8	0540/Sauron/DV 0387/Jess/DV
111	Jim	DV	m	0283	0172	0175	DV	4	0689/Jane Lee/DV 0431/Emi/DV
112	Jessi	DV	f	0387	0268	0175	DV	3	0456/Jager/DV 0541/Jiddah/DV
113	Cody	DV	m	0260	0099	0101	Mosman Taronga	3	0540/Sauron/DV 0619/Elba/DV
114	Jaga	DV	f	0456	0283	0178	DV	0	
115	Sauron	DV	m	0540	0260	0282	DV	0	
116	Jiddah	DV	f	0541	0277	0387	DV	0	
117	Elba	DV	f	0619	0260	0431	DV	0	
118	Jane Lee	DV	f	0689	0268	0175	DV	0	
119	Esther	Chester Chester	f	0312	0018	0017	London	3	0451/Emmar/Whipsnade

### 9.3 Darstellung der Rohdaten

Anzahl der Loci (n), Population, Loci nach Primerkombination und Basenpaargröße benannt, Anzahl der Individuen in dieser Population (N), Frequenz der rezessiven Allele (q), Frequenz der dominanten Allele (p), Heterozygotiegrad (HET), Ausschlußwahrscheinlichkeit (AUS) und kombinierte Ausschlußwahrscheinlichkeit (kA), Durchschnittswerte aller Werte:

Südliches Breitmaulnashorn (CSS)-Zoopopulation: 69 Tiere

n	Pop	Locus	N	q	p	HET	AUS	kA
1	CSS	n02bp132	69	.7020	.2980	.4184	.0724	.0724
2	CSS	n02bp148	69	.3185	.6815	.4341	.0070	.0789
3	CSS	n02bp206	69	.6594	.3406	.4492	.0644	.1382
4	CSS	n02bp208	69	.3612	.6388	.4614	.0109	.1475
5	CSS	n02bp226	69	.9089	.0911	.1656	.0622	.2005
6	CSS	n02bp246	69	.2692	.7308	.3935	.0038	.2036
7	CSS	n02bp306	69	.4663	.5337	.4977	.0252	.2237
8	CSS	n02bp362	69	.8076	.1924	.3108	.0818	.2872
9	CSS	n02bp460	69	.2085	.7915	.3301	.0015	.2883
10	CSS	n02bp56	69	.4964	.5036	.5000	.0306	.3101
11	CSS	n02bp94	69	.7122	.2878	.4099	.0740	.3612
12	CSS	n03bp110	69	.7985	.2015	.3217	.0819	.4135
13	CSS	n03bp134	69	.9247	.0753	.1393	.0551	.4458
14	CSS	n03bp157	69	.4663	.5337	.4977	.0252	.4598
15	CSS	n03bp220	69	.5774	.4226	.4880	.0470	.4851
16	CSS	n03bp390	69	.8076	.1924	.3108	.0818	.5273
17	CSS	n03bp420	69	.7985	.2015	.3217	.0819	.5660
18	CSS	n03bp68	69	.4815	.5185	.4993	.0279	.5781
19	CSS	n04bp104	69	.4663	.5337	.4977	.0252	.5887
20	CSS	n04bp112	69	.3807	.6193	.4715	.0130	.5941
21	CSS	n04bp210	69	.4170	.5830	.4862	.0176	.6012
22	CSS	n04bp346	69	.9247	.0753	.1393	.0551	.6232



23	CSS	n04bp604	69	.5898	.4102	.4839	.0496	.6419
24	CSS	n10bp104	69	.1703	.8297	.2825	.0007	.6421
25	CSS	n10bp231	69	.6703	.3297	.4420	.0666	.6660
26	CSS	n10bp264	69	.6370	.3630	.4624	.0598	.6859
27	CSS	n10bp266	69	.4170	.5830	.4862	.0176	.6915
28	CSS	n10bp285	69	.5384	.4616	.4971	.0388	.7034
29	CSS	n10bp292	69	.4170	.5830	.4862	.0176	.7087
30	CSS	n25bp104	69	.9854	.0146	.0288	.0138	.7127
31	CSS	n25bp130	69	.3405	.6595	.4491	.0089	.7152
32	CSS	n25bp192	69	.7518	.2482	.3732	.0793	.7378
33	CSS	n25bp374	69	.4170	.5830	.4862	.0176	.7424
34	CSS	n26bp136	69	.8427	.1573	.2651	.0793	.7629
35	CSS	n26bp171	69	.4504	.5496	.4951	.0226	.7682
36	CSS	n26bp298	69	.9325	.0675	.1259	.0510	.7800
37	CSS	n26bp300	69	.8847	.1153	.2041	.0706	.7956
38	CSS	n26bp61	69	.4170	.5830	.4862	.0176	.7992
39	CSS	n26bp71	69	.9706	.0294	.0571	.0261	.8044
40	CSS	n26bp84	69	.6255	.3745	.4685	.0573	.8156
41	CSS	n27bp274	69	.7421	.2579	.3828	.0782	.8301
42	CSS	n27bp290	69	.5647	.4353	.4916	.0443	.8376
43	CSS	n27bp298	69	.9631	.0369	.0711	.0318	.8427
44	CSS	n27bp324	69	.3405	.6595	.4491	.0089	.8441
45	CSS	n27bp368	69	.6810	.3190	.4345	.0686	.8548
46	CSS	n28bp220	69	.1204	.8796	.2118	.0002	.8549
47	CSS	n28bp222	69	.3405	.6595	.4491	.0089	.8561
48	CSS	n28bp224	69	.8928	.1072	.1914	.0681	.8659
49	CSS	n28bp297	69	.3612	.6388	.4614	.0109	.8674
50	CSS	n28bp338	69	.2692	.7308	.3935	.0038	.8679
51	CSS	n28bp491	69	.3612	.6388	.4614	.0109	.8693
52	CSS	n28bp493	69	.6703	.3297	.4420	.0666	.8780
53	CSS	n28bp69	69	.9706	.0294	.0571	.0261	.8812
54	CSS	n41bp224	69	.7020	.2980	.4184	.0724	.8898
55	CSS	n41bp226	69	.3185	.6815	.4341	.0070	.8906
56	CSS	n41bp257	69	.2408	.7592	.3656	.0026	.8909

57	CSS	n41bp258	69	.7518	.2482	.3732	.0793	.8995
58	CSS	n41bp370	69	.3807	.6193	.4715	.0130	.9008
59	CSS	n41bp372	69	.6810	.3190	.4345	.0686	.9076
60	CSS	n41bp449	69	.2949	.7051	.4159	.0053	.9081
61	CSS	n41bp508	69	.7708	.2292	.3533	.0809	.9156
62	CSS	n41bp57	69	.6810	.3190	.4345	.0686	.9214
63	CSS	n41bp71	69	.8513	.1487	.2532	.0781	.9275
64	CSS	n52bp446	69	.6370	.3630	.4624	.0598	.9318
65	CSS	n52bp75	69	.9631	.0369	.0711	.0318	.9340
66	CSS	n57bp249	69	.1703	.8297	.2825	.0007	.9340
67	CSS	n57bp275	69	.5517	.4483	.4947	.0415	.9368
68	CSS	n57bp458	69	.5247	.4753	.4988	.0360	.9391
69	CSS	n57bp90	69	.9706	.0294	.0571	.0261	.9406
70	CSS	n59bp118	69	.9168	.0832	.1525	.0588	.9441
71	CSS	n59bp190	69	.9854	.0146	.0288	.0138	.9449
72	CSS	n59bp269	69	.8764	.1236	.2166	.0729	.9489
73	CSS	n59bp413	69	.5898	.4102	.4839	.0496	.9515
74	CSS	n59bp415	69	.3405	.6595	.4491	.0089	.9519
75	CSS	n59bp99	69	.8597	.1403	.2412	.0766	.9556
75	CSS	75.	69.	.6046	.3954	.3602	.0403	.9556

Südliches Breitmaulnashorn (CSW)-Wildpopulation: 56 Tiere

n	Pop	Locus	N	q	p	HET	AUS	kA
1	CSW	n02bp132	56	.6124	.3876	.4747	.0545	.0545
2	CSW	n02bp148	56	.3273	.6727	.4404	.0077	.0618
3	CSW	n02bp181	56	.9354	.0646	.1208	.0494	.1082
4	CSW	n02bp206	56	.7071	.2929	.4142	.0732	.1735
5	CSW	n02bp208	56	.3780	.6220	.4702	.0127	.1840
6	CSW	n02bp226	56	.8964	.1036	.1857	.0669	.2386
7	CSW	n02bp246	56	.1336	.8664	.2315	.0003	.2388
8	CSW	n02bp306	56	.6944	.3056	.4244	.0710	.2929
9	CSW	n02bp362	56	.7319	.2681	.3924	.0769	.3473

10 CSW	n02bp56	56.2673	.7327	.3917	.0037	.3497
11 CSW	n02bp94	56.7559	.2441	.3690	.0797	.4015
12 CSW	n03bp110	56.5825	.4175	.4864	.0481	.4303
13 CSW	n03bp134	56.9354	.0646	.1208	.0494	.4585
14 CSW	n03bp157	56.3536	.6464	.4571	.0101	.4639
15 CSW	n03bp220	56.5175	.4825	.4994	.0346	.4825
16 CSW	n03bp390	56.9063	.0937	.1698	.0632	.5152
17 CSW	n03bp420	56.8018	.1982	.3179	.0819	.5549
18 CSW	n03bp68	56.6268	.3732	.4679	.0576	.5806
19 CSW	n04bp104	56.3536	.6464	.4571	.0101	.5848
20 CSW	n04bp112	56.4226	.5774	.4880	.0184	.5924
21 CSW	n04bp210	56.1890	.8110	.3065	.0010	.5929
22 CSW	n04bp346	56.8557	.1443	.2470	.0774	.6244
23 CSW	n04bp604	56.6268	.3732	.4679	.0576	.6460
24 CSW	n10bp104	56.3536	.6464	.4571	.0101	.6496
25 CSW	n10bp231	56.8557	.1443	.2470	.0774	.6767
26 CSW	n10bp264	56.5175	.4825	.4994	.0346	.6879
27 CSW	n10bp266	56.4009	.5991	.4804	.0155	.6927
28 CSW	n10bp285	56.5510	.4490	.4948	.0414	.7054
29 CSW	n10bp292	56.4818	.5182	.4993	.0279	.7137
30 CSW	n25bp112	56.9820	.0180	.0354	.0168	.7184
31 CSW	n25bp130	56.4432	.5568	.4935	.0215	.7245
32 CSW	n25bp192	56.9910	.0090	.0178	.0087	.7269
33 CSW	n25bp374	56.6409	.3591	.4603	.0606	.7434
34 CSW	n26bp136	56.6682	.3318	.4434	.0661	.7604
35 CSW	n26bp171	56.3536	.6464	.4571	.0101	.7628
36 CSW	n26bp298	56.8557	.1443	.2470	.0774	.7812
37 CSW	n26bp300	56.8238	.1762	.2904	.0812	.7989
38 CSW	n26bp61	56.1890	.8110	.3065	.0010	.7991
39 CSW	n26bp71	56.7906	.2094	.3311	.0818	.8156
40 CSW	n26bp84	56.8018	.1982	.3179	.0819	.8307
41 CSW	n27bp274	56.6814	.3186	.4342	.0687	.8423
42 CSW	n27bp290	56.6814	.3186	.4342	.0687	.8531
43 CSW	n27bp324	56.2315	.7685	.3558	.0022	.8535

44 CSW	n27bp368	56.5175	.4825	.4994	.0346	.8585
45 CSW	n28bp222	56.2315	.7685	.3558	.0022	.8588
46 CSW	n28bp224	56.9449	.0551	.1041	.0439	.8650
47 CSW	n28bp297	56.3536	.6464	.4571	.0101	.8664
48 CSW	n28bp338	56.4009	.5991	.4804	.0155	.8685
49 CSW	n28bp491	56.1336	.8664	.2315	.0003	.8685
50 CSW	n28bp493	56.7559	.2441	.3690	.0797	.8790
51 CSW	n35bp123	31.9504	.0496	.0943	.0405	.8839
52 CSW	n35bp231	31.6720	.3280	.4408	.0669	.8917
53 CSW	n41bp224	56.6409	.3591	.4603	.0606	.8982
54 CSW	n41bp226	56.4629	.5371	.4972	.0247	.9007
55 CSW	n41bp257	56.1890	.8110	.3065	.0010	.9008
56 CSW	n41bp258	56.7559	.2441	.3690	.0797	.9087
57 CSW	n41bp370	56.4432	.5568	.4935	.0215	.9107
58 CSW	n41bp372	56.4818	.5182	.4993	.0279	.9132
59 CSW	n41bp449	56.2988	.7012	.4190	.0056	.9137
60 CSW	n41bp508	56.8238	.1762	.2904	.0812	.9207
61 CSW	n41bp57	56.5345	.4655	.4976	.0380	.9237
62 CSW	n41bp71	56.8864	.1136	.2014	.0701	.9290
63 CSW	n52bp446	56.6814	.3186	.4342	.0687	.9339
64 CSW	n52bp75	56.9063	.0937	.1698	.0632	.9381
65 CSW	n57bp249	56.1336	.8664	.2315	.0003	.9381
66 CSW	n57bp275	56.3536	.6464	.4571	.0101	.9387
67 CSW	n57bp458	56.6124	.3876	.4747	.0545	.9421
68 CSW	n57bp90	56.8557	.1443	.2470	.0774	.9466
69 CSW	n59bp118	56.8660	.1340	.2321	.0754	.9506
70 CSW	n59bp190	56.9636	.0364	.0701	.0314	.9521
71 CSW	n59bp269	56.8345	.1655	.2762	.0803	.9560
72 CSW	n59bp413	56.6944	.3056	.4244	.0710	.9591
73 CSW	n59bp415	56.4226	.5774	.4880	.0184	.9599
74 CSW	n59bp99	56.5510	.4490	.4948	.0414	.9615
74 CSW	74.	56.5981	.4019	.3618	.0426	.9615

Nördliches Breitmaulnashorn (CSC): 5 Tiere

n	Pop	Locus	N	q	p	HET	AUS	kA
1	CSC	n02bp132	5.8944	.1056	.1889	.0676	.0676	
2	CSC	n02bp148	5.4472	.5528	.4944	.0221	.0882	
3	CSC	n02bp362	5.7746	.2254	.3492	.0811	.1622	
4	CSC	n02bp635	5.4472	.5528	.4944	.0221	.1807	
5	CSC	n02bp94	5.7746	.2254	.3492	.0811	.2472	
6	CSC	n03bp68	5.6325	.3675	.4649	.0588	.2915	
7	CSC	n04bp202	5.4472	.5528	.4944	.0221	.3071	
8	CSC	n04bp210	5.6325	.3675	.4649	.0588	.3479	
9	CSC	n04bp245	5.8944	.1056	.1889	.0676	.3919	
10	CSC	n10bp231	5.6325	.3675	.4649	.0588	.4277	
11	CSC	n10bp264	5.7746	.2254	.3492	.0811	.4741	
12	CSC	n25bp112	5.7746	.2254	.3492	.0811	.5168	
13	CSC	n25bp130	5.6325	.3675	.4649	.0588	.5452	
14	CSC	n25bp164	5.7746	.2254	.3492	.0811	.5821	
15	CSC	n25bp192	5.8944	.1056	.1889	.0676	.6104	
16	CSC	n25bp262	5.4472	.5528	.4944	.0221	.6190	
17	CSC	n25bp340	5.4472	.5528	.4944	.0221	.6274	
18	CSC	n25bp374	5.4472	.5528	.4944	.0221	.6356	
19	CSC	n25bp418	5.6325	.3675	.4649	.0588	.6571	
20	CSC	n26bp108	5.7746	.2254	.3492	.0811	.6849	
21	CSC	n26bp300	5.8944	.1056	.1889	.0676	.7062	
22	CSC	n26bp84	5.6325	.3675	.4649	.0588	.7235	
23	CSC	n27bp176	5.7746	.2254	.3492	.0811	.7459	
24	CSC	n27bp368	5.4472	.5528	.4944	.0221	.7515	
25	CSC	n27bp464	5.4472	.5528	.4944	.0221	.7570	
26	CSC	n28bp236	5.7746	.2254	.3492	.0811	.7767	
27	CSC	n41bp273	5.7746	.2254	.3492	.0811	.7948	
28	CSC	n41bp330	5.4472	.5528	.4944	.0221	.7994	
29	CSC	n41bp408	5.4472	.5528	.4944	.0221	.8038	
30	CSC	n41bp71	5.4472	.5528	.4944	.0221	.8082	
31	CSC	n52bp281	5.6325	.3675	.4649	.0588	.8194	

32	CSC	n57bp162	5.4472	.5528	.4944	.0221	.8234	
33	CSC	n57bp249	5.8944	.1056	.1889	.0676	.8354	
34	CSC	n57bp391	5.6325	.3675	.4649	.0588	.8450	
35	CSC	n57bp395	5.6325	.3675	.4649	.0588	.8542	
36	CSC	n59bp124	5.7746	.2254	.3492	.0811	.8660	
37	CSC	n59bp170	5.6325	.3675	.4649	.0588	.8739	
38	CSC	n59bp371	5.6325	.3675	.4649	.0588	.8813	
39	CSC	n59bp413	5.6325	.3675	.4649	.0588	.8883	
40	CSC	n59bp415	5.6325	.3675	.4649	.0588	.8948	
40	CSC	40.	5.	.6452	.3548	.4103	.0545	.8948

Schwarzes Nashorn (DB): 20 Tiere

n	Pop	Locus	N	q	p	HET	AUS	kA
1	DB	n02bp155	20.4472	.5528	.4944	.0221	.0221	
2	DB	n02bp170	20.8660	.1340	.2321	.0754	.0958	
3	DB	n02bp274	20.8944	.1056	.1889	.0676	.1569	
4	DB	n02bp363	20.8367	.1633	.2733	.0800	.2244	
5	DB	n02bp427	20.9220	.0780	.1439	.0564	.2681	
6	DB	n02bp454	20.8660	.1340	.2321	.0754	.3233	
7	DB	n02bp554	20.6708	.3292	.4416	.0667	.3684	
8	DB	n02bp95	20.2236	.7764	.3472	.0019	.3696	
9	DB	n03bp179	20.6325	.3675	.4649	.0588	.4067	
10	DB	n03bp195	20.3162	.6838	.4325	.0068	.4107	
11	DB	n03bp265	20.9487	.0513	.0974	.0416	.4352	
12	DB	n03bp270	20.9220	.0780	.1439	.0564	.4671	
13	DB	n03bp304	20.8660	.1340	.2321	.0754	.5072	
14	DB	n03bp333	20.7416	.2584	.3832	.0782	.5458	
15	DB	n03bp335	20.3873	.6127	.4746	.0138	.5520	
16	DB	n03bp433	20.8660	.1340	.2321	.0754	.5858	
17	DB	n03bp444	20.9220	.0780	.1439	.0564	.6091	
18	DB	n03bp456	20.3873	.6127	.4746	.0138	.6145	
19	DB	n03bp502	20.7071	.2929	.4142	.0732	.6427	

20 DB	n03bp531	20 .8944	.1056	.1889	.0676	.6669
21 DB	n03bp552	20 .9487	.0513	.0974	.0416	.6807
22 DB	n03bp69	20 .9220	.0780	.1439	.0564	.6987
23 DB	n04bp191	20 .3162	.6838	.4325	.0068	.7008
24 DB	n04bp242	20 .9487	.0513	.0974	.0416	.7132
25 DB	n04bp245	20 .8944	.1056	.1889	.0676	.7326
26 DB	n04bp246	20 .2236	.7764	.3472	.0019	.7331
27 DB	n04bp352	20 .4472	.5528	.4944	.0221	.7390
28 DB	n04bp387	20 .9220	.0780	.1439	.0564	.7537
29 DB	n04bp48	20 .6708	.3292	.4416	.0667	.7702
30 DB	n04bp547	20 .9487	.0513	.0974	.0416	.7797
31 DB	n10bp128	20 .3162	.6838	.4325	.0068	.7812
32 DB	n10bp156	20 .8062	.1938	.3125	.0819	.7991
33 DB	n10bp158	20 .3162	.6838	.4325	.0068	.8005
34 DB	n10bp169	20 .8944	.1056	.1889	.0676	.8140
35 DB	n10bp222	20 .8367	.1633	.2733	.0800	.8289
36 DB	n10bp224	20 .2236	.7764	.3472	.0019	.8292
37 DB	n10bp230	20 .2236	.7764	.3472	.0019	.8295
38 DB	n10bp269	20 .4472	.5528	.4944	.0221	.8333
39 DB	n10bp325	20 .8062	.1938	.3125	.0819	.8470
40 DB	n10bp417	20 .6708	.3292	.4416	.0667	.8572
41 DB	n10bp437	20 .8367	.1633	.2733	.0800	.8686
42 DB	n25bp110	20 .9487	.0513	.0974	.0416	.8740
43 DB	n25bp121	20 .7746	.2254	.3492	.0811	.8843
44 DB	n25bp154	20 .6708	.3292	.4416	.0667	.8920
45 DB	n25bp257	20 .9487	.0513	.0974	.0416	.8965
46 DB	n25bp258	20 .7746	.2254	.3492	.0811	.9049
47 DB	n25bp291	20 .9220	.0780	.1439	.0564	.9102
48 DB	n25bp304	20 .8660	.1340	.2321	.0754	.9170
49 DB	n25bp57	20 .7746	.2254	.3492	.0811	.9237
50 DB	n25bp75	20 .8367	.1633	.2733	.0800	.9298
51 DB	n26bp109	20 .3162	.6838	.4325	.0068	.9303
52 DB	n26bp133	20 .5000	.5000	.5000	.0313	.9325
53 DB	n26bp158	20 .2236	.7764	.3472	.0019	.9326

54 DB	n26bp197	20 .2236	.7764	.3472	.0019	.9328
55 DB	n26bp282	20 .9220	.0780	.1439	.0564	.9366
56 DB	n26bp287	20 .6708	.3292	.4416	.0667	.9408
57 DB	n26bp423	20 .8660	.1340	.2321	.0754	.9452
58 DB	n26bp430	20 .8062	.1938	.3125	.0819	.9497
59 DB	n26bp446	20 .8367	.1633	.2733	.0800	.9538
60 DB	n26bp48	20 .8367	.1633	.2733	.0800	.9575
61 DB	n26bp51	20 .3162	.6838	.4325	.0068	.9577
62 DB	n27bp158	20 .8944	.1056	.1889	.0676	.9606
63 DB	n27bp160	20 .8062	.1938	.3125	.0819	.9638
64 DB	n27bp415	20 .9747	.0253	.0494	.0229	.9647
65 DB	n28bp117	20 .5916	.4084	.4832	.0500	.9664
66 DB	n28bp135	20 .9220	.0780	.1439	.0564	.9683
67 DB	n28bp162	20 .3162	.6838	.4325	.0068	.9685
68 DB	n28bp198	20 .3873	.6127	.4746	.0138	.9690
69 DB	n28bp246	20 .6325	.3675	.4649	.0588	.9708
70 DB	n28bp279	20 .9220	.0780	.1439	.0564	.9724
71 DB	n28bp445	20 .6325	.3675	.4649	.0588	.9741
72 DB	n28bp491	20 .2236	.7764	.3472	.0019	.9741
73 DB	n28bp89	20 .9747	.0253	.0494	.0229	.9747
74 DB	n41bp124	20 .9487	.0513	.0974	.0416	.9758
75 DB	n41bp134	20 .9220	.0780	.1439	.0564	.9771
76 DB	n41bp253	20 .9747	.0253	.0494	.0229	.9776
77 DB	n41bp296	20 .9220	.0780	.1439	.0564	.9789
78 DB	n41bp303	20 .5000	.5000	.5000	.0313	.9796
79 DB	n41bp456	20 .4472	.5528	.4944	.0221	.9800
80 DB	n41bp458	20 .6325	.3675	.4649	.0588	.9812
81 DB	n41bp501	20 .7416	.2584	.3832	.0782	.9827
82 DB	n52bp115	20 .9220	.0780	.1439	.0564	.9836
83 DB	n52bp187	20 .3873	.6127	.4746	.0138	.9839
84 DB	n52bp190	20 .2236	.7764	.3472	.0019	.9839
85 DB	n52bp200	20 .7071	.2929	.4142	.0732	.9851
86 DB	n52bp206	20 .4472	.5528	.4944	.0221	.9854
87 DB	n52bp306	20 .3162	.6838	.4325	.0068	.9855

88 DB	n52bp481	20 .6325	.3675	.4649	.0588	.9864		
89 DB	n52bp77	20 .9487	.0513	.0974	.0416	.9869		
90 DB	n57bp126	20 .2236	.7764	.3472	.0019	.9869		
91 DB	n57bp176	20 .9220	.0780	.1439	.0564	.9877		
92 DB	n57bp248	20 .9487	.0513	.0974	.0416	.9882		
93 DB	n57bp285	20 .8062	.1938	.3125	.0819	.9892		
94 DB	n57bp57	20 .8367	.1633	.2733	.0800	.9900		
95 DB	n59bp149	20 .3162	.6838	.4325	.0068	.9901		
96 DB	n59bp157	20 .8660	.1340	.2321	.0754	.9908		
97 DB	n59bp210	20 .8660	.1340	.2321	.0754	.9915		
98 DB	n59bp256	20 .5000	.5000	.5000	.0313	.9918		
99 DB	n59bp258	20 .4472	.5528	.4944	.0221	.9920		
100 DB	n59bp286	20 .9747	.0253	.0494	.0229	.9922		
101 DB	n59bp439	20 .5916	.4084	.4832	.0500	.9926		
102 DB	n59bp443	20 .3162	.6838	.4325	.0068	.9926		
103 DB	n59bp445	20 .6708	.3292	.4416	.0667	.9931		
104 DB	n59bp85	20 .8944	.1056	.1889	.0676	.9936		
105 DB	n59bp89	20 .5000	.5000	.5000	.0313	.9938		
106 DB	n59bp95	20 .3162	.6838	.4325	.0068	.9938		
106 DB	106.	20 .6785	.3215	.3089	.0464	.9938		

Indisches Panzernashorn (RU): 6 Tiere

n	Pop	Locus	N	q	p	HET	AUS	kA
1 RU	n02bp229		6 .4082	.5918	.4832	.0164	.0164	
2 RU	n02bp314		6 .5774	.4226	.4880	.0470	.0626	
3 RU	n02bp319		6 .4082	.5918	.4832	.0164	.0780	
4 RU	n02bp321		6 .4082	.5918	.4832	.0164	.0932	
5 RU	n02bp361		6 .8165	.1835	.2997	.0816	.1671	
6 RU	n02bp383		6 .8165	.1835	.2997	.0816	.2351	
7 RU	n02bp449		6 .9129	.0871	.1591	.0605	.2814	
8 RU	n02bp453		6 .7071	.2929	.4142	.0732	.3340	
9 RU	n02bp519		6 .7071	.2929	.4142	.0732	.3827	

10 RU	n02bp64	6 .7071	.2929	.4142	.0732	.4279		
11 RU	n03bp214	6 .8165	.1835	.2997	.0816	.4746		
12 RU	n03bp242	6 .7071	.2929	.4142	.0732	.5131		
13 RU	n03bp334	6 .4082	.5918	.4832	.0164	.5211		
14 RU	n03bp346	6 .4082	.5918	.4832	.0164	.5289		
15 RU	n03bp436	6 .7071	.2929	.4142	.0732	.5634		
16 RU	n03bp64	6 .7071	.2929	.4142	.0732	.5954		
17 RU	n03bp99	6 .7071	.2929	.4142	.0732	.6250		
18 RU	n04bp138	6 .8165	.1835	.2997	.0816	.6556		
19 RU	n10bp313	6 .4082	.5918	.4832	.0164	.6613		
20 RU	n10bp406	6 .4082	.5918	.4832	.0164	.6668		
21 RU	n25bp124	6 .5774	.4226	.4880	.0470	.6825		
22 RU	n25bp454	6 .5774	.4226	.4880	.0470	.6974		
23 RU	n26bp153	6 .9129	.0871	.1591	.0605	.7157		
24 RU	n26bp205	6 .4082	.5918	.4832	.0164	.7204		
25 RU	n26bp285	6 .9129	.0871	.1591	.0605	.7373		
26 RU	n27bp125	6 .7071	.2929	.4142	.0732	.7565		
27 RU	n27bp228	6 .5774	.4226	.4880	.0470	.7680		
28 RU	n27bp229	6 .5774	.4226	.4880	.0470	.7789		
29 RU	n27bp340	6 .8165	.1835	.2997	.0816	.7969		
30 RU	n27bp365	6 .8165	.1835	.2997	.0816	.8135		
31 RU	n27bp387	6 .4082	.5918	.4832	.0164	.8165		
32 RU	n27bp452	6 .9129	.0871	.1591	.0605	.8276		
33 RU	n27bp552	6 .5774	.4226	.4880	.0470	.8357		
34 RU	n27bp554	6 .8165	.1835	.2997	.0816	.8491		
35 RU	n27bp95	6 .8165	.1835	.2997	.0816	.8614		
36 RU	n28bp149	6 .4082	.5918	.4832	.0164	.8637		
37 RU	n28bp328	6 .7071	.2929	.4142	.0732	.8737		
38 RU	n28bp490	6 .4082	.5918	.4832	.0164	.8758		
39 RU	n28bp62	6 .8165	.1835	.2997	.0816	.8859		
40 RU	n28bp64	6 .9129	.0871	.1591	.0605	.8928		
41 RU	n41bp333	6 .9129	.0871	.1591	.0605	.8993		
42 RU	n41bp488	6 .5774	.4226	.4880	.0470	.9040		
43 RU	n41bp511	6 .9129	.0871	.1591	.0605	.9098		

44 RU	n52bp331	6 .5774	.4226	.4880	.0470	.9141
45 RU	n52bp399	6 .7071	.2929	.4142	.0732	.9204
46 RU	n52bp60	6 .9129	.0871	.1591	.0605	.9252
47 RU	n57bp107	6 .8165	.1835	.2997	.0816	.9313
48 RU	n57bp171	6 .5774	.4226	.4880	.0470	.9345
49 RU	n57bp191	6 .4082	.5918	.4832	.0164	.9356
50 RU	n57bp193	6 .7071	.2929	.4142	.0732	.9403
51 RU	n57bp308	6 .5774	.4226	.4880	.0470	.9431
52 RU	n57bp518	6 .7071	.2929	.4142	.0732	.9473
53 RU	n57bp78	6 .4082	.5918	.4832	.0164	.9481
54 RU	n59bp82	6 .5774	.4226	.4880	.0470	.9506
54 RU	54.	6 .6595	.3405	.3868	.0539	.9506

#### 9.4 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
APS	Ammonium Persulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	basepairs (Basenpaare)
CSC	<i>Ceratotherium simum cottoni</i> (Nördliches Breitmaulnashorn)
CSS	<i>Ceratotherium simum simum</i> (Südliches Breitmaulnashorn)
CSW	<i>Ceratotherium simum simum</i> (Südliches Breitmaulnashorn) Wildpopulation
DB	<i>Diceros bicornis</i> (Spitzmaulnashorn)
DMSO	Dymethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	DNA-Mononucleotide
EEP	Europäisches Erhaltungszuchtprogramm
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RU	Rinoceros unicornis (Indisches Panzernashorn)
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Average

#### Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Förster für die Übernahme dieses Themas, die freundliche Unterstützung bei der Durchführung und die prompte Korrektur der Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt besonders Herrn Dr. I. Medjugorac für die Beratung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Besonderen Dank schulde ich Herrn PD Dr. Dr. habil. Gansloßer für die zoologische Beratung, sowie für die Vermittlung von wichtigen Kontakten. Auch seiner Doktorandin Petra Kretschmar danke ich ganz herzlich für die Beschaffung und Überlassung der Proben von Thaba Tholo Game Farm.

Bei Herrn Dr. Christian Walzer vom Salzburger Tiergarten Hellbrunn bedanke ich mich für die Idee zu dieser Arbeit und für die wertvolle Beratung und Hilfe bei der Durchführung der Probenentnahme, sowie für die Beschaffung von Proben und die Einführung in die Zoowelt.

Für die Entnahme und Überlassung von Proben bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Kollegen und Mitarbeitern aus den verschiedenen Europäischen Zoologischen Gärten, ohne deren Hilfe die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Hier möchte ich ganz besonders Dr. Edmund Flach vom Whipsnade Safaripark, Paul Vercammen und J. Kaandorp vom Safaripark Beekse Bergen und Dr. Gölthenboth vom Tierpark Berlin für die kooperative Unterstützung und gute Zusammenarbeit bei der Probenentnahme danken, sowie Dr. Schaller vom Zoo Münster, Dr. Böer vom Safaripark Hodenhagen, Dr. Klomburg vom Zoo Osnabrück, Dr. Tom de Jongh vom Burger's Zoo Arnhem, Dr. Klarenbeek vom Zoo Emmen, Keith Harris und Duncan Williams vom Longleat Safaripark, Peter Bircher vom Marwell Zoo, Bob Lawrence vom West Midland Safaripark, Dr. Váhala vom Tierpark Dvur Králové, Dr. Österballe vom Givskud Zoo, Prof. Wiesner und Dr. Malzahn vom Tierpark München, den Kollegen vom Zoo Paris, La Palmyre, Thoiry und Erfurt.....

Für das kostenlose zur Verfügung stellen der EMLA® Pflaster zur Probenentnahme danke ich Dr. Behse von der Firma Astra GmbH.

Für die Beratung bei Problemen mit der Methode AFLP möchte ich mich bei Dr. Tim Sharbel vom Max-Planck Institut bedanken.

Für die tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit danke ich besonders Renate Damian. Auch sonst bedanke ich mich bei allen Labormitarbeitern und Mitdoktoranden des Instituts für Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre der LMU München, hier v.a. Juliane Kemter, sowie Detlef Pietrowski, Martin Dinkel, Claudia Veit, Irmgard Rossnagel und Christa Nanu für ihre Hilfe und ihren Rat, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Für Computerfragen standen Herr Stangelmaier und Herr Meisel immer zur Verfügung, wofür ich ihnen sehr dankbar bin.

Schliesslich möchte ich mich ganz besonders für die Unterstützung meiner Familie bedanken, ohne deren finanzielle und moralische Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Weiter möchte ich Christoph, Martina, Rainer, Holger und allen meinen Freunden danken, die mir mit Rat, Tat und Aufmunterung während dieser ganzen Zeit zur Seite gestanden haben.

Danke Charlotte und Tom für die Unterstützung beim Korrekturlesen.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit bedanke ich mich bei der Zebra Foundation, sowie bei Herrn Prof. Liebich für die Gewährung von Geldern aus der Dr. Carl Heinz Kurtze und Agnes Amenth Stiftung.