

MASTERARBEIT

vorgelegt zur Erlangung des Grades eines Master of Science
an der Fakultät für Biologie und Biotechnologie der Ruhr-Universität Bochum

Untersuchungen zur genotypischen Variabilität der Giraffe
(*Giraffa camelopardalis*) in europäischen Zoos

Investigations of genotypic variability of giraffes
(*Giraffa camelopardalis*) in European zoos

von

ANNE VAN DER LUGT

angefertigt am Lehrstuhl für Evolutionsökologie und Biodiversität der Tiere

Bochum, im Dezember 2015

Erstgutachterin: PD Dr. Kathrin Lampert

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dominik Begerow

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Zusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung	3
1.1 Systematik	3
1.2 Die Klassifizierung der Unterarten	3
1.3 Verbreitungsgebiete der Giraffen.....	5
1.4 Hybridisierungen	6
1.5 Zootierhaltung und Zuchtprogramme.....	7
1.6 Das Zuchtbuch der Giraffe	7
1.7 Beprobung der Giraffen	9
1.8 Auswahl der genetischen Marker	10
1.9 Ziele dieser Arbeit	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Labormaterial	12
2.1.1 Chemikalien	12
2.1.2 Geräte	14
2.1.3 Software.....	14
2.2 Herkunft und Versand des Probenmaterials	15
2.3 Labormethoden.....	17
2.3.1 DNA-Extraktion und Fällung der DNA	17
2.2.3 Auswahl der Mikrosatelliten.....	20
2.3.3 Amplifikation der DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22
2.3.4 Optimierung der PCR-Bedingungen	22
2.3.5 Optimierte PCR-Konditionen	24
2.3.6 Agarosegelelektrophorese.....	25
2.3.7 Genotypisierung der Mikrosatelliten mittels LI-COR Analyzer.....	26
2.4 Statistische Analysen zur Qualität der Mikrosatelliten.....	27
2.4.1 Allelfrequenzen und Variabilität der Mikrosatelliten	27
2.4.2 Überprüfung der Genotypisierung	27

2.4.3	Test auf Hardy-Weinberg-Equilibrium und Linkage Disequilibrium	27
2.5	Statistische Analysen zur Differenzierung der Unterarten und zur Zuordnung der Tiere mit unbekanntem Unterartstatus.....	28
2.5.1	Untersuchungen zur Populationsdifferenzierung	28
2.5.2	Zuordnung der Tiere unbekannter Unterart zu den bekannten Unterarten.....	28
2.6	Sequenzanalyse von Tieren unbekannter Unterart.....	30
2.6.1	Vorbereitung der Proben zum Sequenzieren.....	30
2.6.2	Rekonstruktion der phylogenetischen Stammbäume.....	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Herkunft und Art des Probenmaterials.....	33
3.2	Labormethoden.....	37
3.2.1	Auswahl des biologischen Materials und Etablierung der DNA Extraktion	37
3.2.2	Extraktion des Probenmaterials.....	38
3.2.3	Amplifikation der DNA und Genotypisierung mit dem LI-COR Analyser.....	39
3.3	Untersuchungen zur Qualität der Mikrosatelliten	40
3.3.1	Frequenzen der Allele und Variabilität der Mikrosatelliten	40
3.3.2	Auswertung der Genotypisierung	44
3.3.3	Untersuchung des Hardy-Weinberg-Equilibriums und des Linkage Disequilibriums.....	45
3.4	Untersuchungen zur Differenzierung der sechs Unterarten und zum Status der Tiere unbekannter Unterart	49
3.4.1	Untersuchungen zur Populationsdifferenzierung	49
3.4.2	Genetische Differenzierung der sechs bekannten Unterarten.....	52
3.4.3	Status der Unterart der unbekanntenen Tiere	54
3.5	Gruppierung der unbekanntenen Giraffen im phylogenetischen Stammbaum	60
4	Diskussion.....	64
4.1	Probenrücklauf	64
4.2	Etablierung der geeigneten Extraktionsmethode	64
4.3	Extraktion des Probenmaterials.....	66
4.4	Optimierung des PCR-Protokolls.....	67
4.5	Qualität der Mikrosatellitenloci.....	68
4.5.1	Zuverlässigkeit der Amplifikationen	68
4.5.2	Polymorphie der Mikrosatelliten.....	69
4.5.3	Mögliche Genotypisierungsfehler	70
4.5.4	Beurteilung des Hardy-Weinberg-Equilibriums und des Linkage Disequilibriums.....	71

4.7	Untersuchungen zur Populationsdifferenzierung	72
4.8	Differenzierung der sechs bekannten Unterarten durch Clusteranalysen	72
4.9	Zuordnung von Tieren unbekannter Unterart durch Clusteranalysen.....	75
4.10	Einsichten der phylogenetischen Stammbäume	76
4.11	Konsequenzen für das Zuchtmanagement	78
4.12	Fazit	79
4.13	Ausblick.....	81
5	Quellenverzeichnis.....	83
5.1	Literaturquellen	83
5.2	Bildquellen	89
6	Anhang.....	90
6.1	Sampling Manual für die Beprobung der Giraffen.....	90
6.2	Stammbäume der 27 Giraffen mit unbekanntem Unterartstatus	95
6.3	Tabellen	109
6.4	Abbildungen	116
6.5	Extraktionsprotokolle	116
	Danksagung	118
	Erklärung	119

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Fellzeichnungen der neun Unterarten von <i>Giraffa camelopardalis</i>	4
Abb. 1.2:	Verbreitungsgebiete der Unterarten der Giraffen in Afrika	5
Abb. 1.3:	Stammbaum eines Tieres unbekannter Unterart	9
Abb. 3.1:	Anzahl verschiedener Allele und Allelkombinationen von sieben Mikrosatelliten	40
Abb. 3.2:	Allelfrequenzen der Allele von sieben Mikrosatelliten	41
Abb. 3.3:	Anzahl verschiedener Allele und Allelkombinationen innerhalb der sechs bekannten Unterarten	42
Abb. 3.4:	Principal Component Analyse für sieben Populationen	50
Abb. 3.5:	Principal Component Analyse für 78 Individuen	51
Abb. 3.6:	Barplot der STRUCTURE-Analyse der sechs bekannten Unterarten für $K = 4$	52
Abb. 3.7:	Barplot der TESS-Analyse der sechs bekannten Unterarten für $K = 12$	53
Abb. 3.8:	Barplot der STRUCTURE-Analyse aller Individuen für $K = 4$	54
Abb. 3.9:	Barplot der TESS-Analyse aller Individuen für $K = 11$	55
Abb. 3.10:	Barplot der STRUCTURE-Analyse aller Individuen mit $K = 4$ sortiert nach der Zugehörigkeit zu den Clustern	56
Abb. 3.11:	Barplot der Tiere unbekannter Unterart sortiert nach der Abstammung und dem Status der Hybridisierung	59
Abb. 3.12:	Phylogenetischer Stammbaum für acht Unterarten von <i>Giraffa camelopardalis</i>	61
Abb. 3.13:	Phylogenetischer Stammbaum für zwei Unterarten von <i>Giraffa camelopardalis</i>	62
Abb. 4.1	Vergleich von Barplots der Analysen mit STRUCTURE und TESS	74
Abb. 6.1:	Ergebnis aus STRUCTURE HARVESTER: Delta K in Abhängigkeit der Clusteranzahl K	116

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Herkunft des Probenmaterials und Anzahl der Proben pro Institution	16
Tab. 2.2	Übersicht der Mikrosatelliten	21
Tab. 2.3	PCR-Protokolle zur Amplifikation der Mikrosatelliten	25
Tab. 2.4	Eigenschaften der Primer für die Sequenzanalyse	30
Tab. 2.5	PCR-Protokoll zur Amplifikation des D-loop	31
Tab. 3.1	Übersicht der Proben	34
Tab. 3.2	Größen der Allele aller Loci innerhalb der bekannten sechs Unterarten	43
Tab. 3.3	Übersicht der Genotypisierungsfehler	44
Tab. 3.4	Test auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium	45
Tab. 3.5	Test auf Linkage Disequilibrium	47
Tab. 3.6	Test auf Populationsdifferenzierung anhand von F_{ST} -Werten	49
Tab. 6.1	Genotypen für alle Proben und alle Loci	109
Tab. 6.2	Anzahl, Größe und Frequenz der Allele aller Loci	111
Tab. 6.3	Allelvariationen für alle Loci	113
Tab. 6.4	Allelvariationen innerhalb der sechs bekannten Unterarten	114
Tab. 6.5	Signifikanzwerte der Populationsdifferenzierung	115
Tab. 6.6	Referenzen aus der NCBI-Datenbank	115

Zusammenfassung

Giraffen repräsentieren eine einzige Art, welche in neun Unterarten unterteilt wird: *G. c. angolensis*, *G. c. antiquorum*, *G. c. camelopardalis*, *G. c. giraffa*, *G. c. peralta*, *G. c. reticulata*, *G. c. rothschildi*, *G. c. tippelskirchi* und *G. c. thornicrofti*. Alle Unterarten können anhand ihres charakteristischen Fellmusters unterschieden werden und sind in verschiedenen geographischen Regionen verbreitet. Obwohl Hybridisierungen in ihrem natürlichen Habitat selten sind, kommen sie in der Zootierhaltung häufig vor.

Die Haltung von Giraffen in europäischen Zoos wird durch das European Endangered Species Programme (EEP) koordiniert. Die Ziele dieses Zuchtprogrammes sind die Konservierung der Unterarten sowie die Vermeidung von Inzucht und Hybridisierungen. Zu diesem Zweck wird die Abstammung aller Tiere in einem Zuchtbuch erfasst. Aufgrund unvollständiger Daten ist der Unterartstatus einiger Tiere derzeit unbekannt. Demnach können diese Tiere nicht zur Zucht zugelassen werden, weil Hybridisierungen nicht ausgeschlossen werden können. Um Einblicke in den Unterartstatus dieser Tiere zu gewinnen, wurden sie in der vorliegenden Studie genetisch charakterisiert.

Insgesamt stellten 26 zoologische Institutionen aus 14 europäischen Ländern Proben zur Verfügung. Es wurden 78 Giraffen untersucht, wobei die Unterart von 27 Tieren unbekannt war. Die übrigen 51 Individuen repräsentierten alle sechs in europäischen Zoos gehaltenen Unterarten *G. c. angolensis*, *G. c. antiquorum*, *G. c. giraffa*, *G. c. reticulata*, *G. c. rothschildi* und *G. c. tippelskirchi*.

Zur Zuordnung der Tiere unbekannter Unterart wurden sieben polymorphe Mikrosatelliten untersucht. Anhand von bayesschen Clusteranalysen konnten acht Tiere der Unterart *G. c. rothschildi* sowie drei Tiere der Unterart *G. c. reticulata* zugeordnet werden. Bei den übrigen 16 Tieren handelte es sich um Hybride. Durch eine Sequenzanalyse mit dem mitochondrialen Marker D-loop konnte ein phylogenetischer Stammbaum erstellt werden. Dieser ergab für drei Tiere eine eindeutige Zuordnung zu *G. c. rothschildi*.

Anhand der in dieser Studie gewonnenen Resultate können fehlende Daten im Zuchtbuch der Giraffen ergänzt werden. Elf der bislang unbekannteren Tiere können in das internationale Zuchtprogramm eingegliedert werden, wohingegen die 16 Hybride weiterhin von der Zucht ausgeschlossen werden sollten.

Abstract

Giraffes represent a single species classified into nine subspecies: *G. c. angolensis*, *G. c. antiquorum*, *G. c. camelopardalis*, *G. c. giraffa*, *G. c. peralta*, *G. c. reticulata*, *G. c. rothschildi*, *G. c. tippelskirchi* and *G. c. thornicrofti*. Subspecies can be distinguished by their characteristic pelage pattern and are distributed in different geographical regions. Though hybridization is rare in their natural habitat it is common in zoo animal husbandry.

Keeping of giraffes in zoos is coordinated by the European Endangered Species Programme (EEP). The aims of this breeding programme are the conservation of subspecies and prevention of inbreeding and hybridization. For these purposes ancestry of all individuals is recorded in a studbook. Due to missing data subspecies of several animals are unknown. Since hybridization cannot be ruled out these animals are not permitted for breeding. To get insights in the subspecies status of these individuals they were genetically characterized in this study.

In total, 26 zoological institutes from 14 European countries provided samples. 78 giraffes were analyzed of which the subspecies of 27 individuals was unknown. The other 51 individuals represented six subspecies kept in European zoos: *G. c. angolensis*, *G. c. antiquorum*, *G. c. giraffa*, *G. c. reticulata*, *G. c. rothschildi* and *G. c. tippelskirchi*.

Seven polymorphic microsatellites were used for assignment of animals with unknown subspecies. Bayesian clustering analyzes identified eight individuals as *G. c. rothschildi* and three individuals as *G. c. reticulata*. 16 individuals were recognized to be hybrids. A phylogenetic tree was constructed from mitochondrial DNA-Sequences of D-loop. Three individuals were assigned to *G. c. rothschildi*.

On the basis of these results missing data can be complemented in the giraffe's studbook. Eleven of all the previously unknown individuals can be included in the international breeding programme whereas the 16 hybrids should be still excluded from breeding.

1 Einleitung

1.1 Systematik

Die Giraffe gehört innerhalb der Säugetiere zu der Ordnung der Paarhufer und der Unterordnung der Wiederkäuer. Die Familie der Giraffenartigen beinhaltet neben der Gattung *Okapia* ausschließlich die Gattung *Giraffa*. Die einzig rezente Art innerhalb dieser Gattung ist die Giraffe *Giraffa camelopardalis* LINNAEUS 1758, welche in mehrere Unterarten eingeteilt werden kann.

1.2 Die Klassifizierung der Unterarten

Die taxonomische Klassifizierung der Unterarten wurde in den vergangenen hundert Jahren kontrovers diskutiert. Zu Beginn dieser Kontroverse im Jahre 1904 wurde von zwei verschiedenen Arten ausgegangen. Dies war die Art *G. reticulata* und die Art *G. camelopardalis*, welche 10 Unterarten enthalten sollte (Lydekker, 1904). Ab den 1960er Jahren wurden die Giraffen nur noch als eine einzige Art *G. camelopardalis* erfasst. Die Kontroverse um die Anzahl der Unterarten blieb jedoch bestehen. Die Unterarten wurden zunächst zu neun (Dagg & Foster, 1976), acht (Kingdon, 1997), sechs (East, 1999) und schließlich zu fünf (Grubb, 2005) Unterarten zusammengefasst (Brown *et al.*, 2007). Jüngste Studien haben jedoch gezeigt, dass am wahrscheinlichsten von neun Unterarten ausgegangen werden muss (Bock *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2007; Fennessy *et al.*, 2013; Hassanin *et al.*, 2007). Dies sind die Angola-Giraffe *G. c. angolensis*, die Kordofan-Giraffe *G. c. antiquorum*, die Nubische Giraffe *G. c. camelopardalis*, die Kapgiraffe *G. c. giraffa*, die Westafrikanische Giraffe *G. c. peralta*, die Netzgiraffe *G. c. reticulata*, die Rothschild-Giraffe *G. c. rothschildi*, die Massaugiraffe *G. c. tippelskirchi* und die Thornicroft-Giraffe *G. c. thornicrofti* (Dagg & Foster, 1976).

Zur Differenzierung der Unterarten wurden sowohl die geographischen Verbreitungsgebiete der Giraffen als auch morphologische Merkmale berücksichtigt. Die Fellzeichnung von Tieren in verschiedenen geographischen Regionen ist so variabel, dass verschiedene Muster genutzt wurden, um die Unterarten voneinander zu unterscheiden (Abb. 1.1) (Dagg & Foster, 1976).

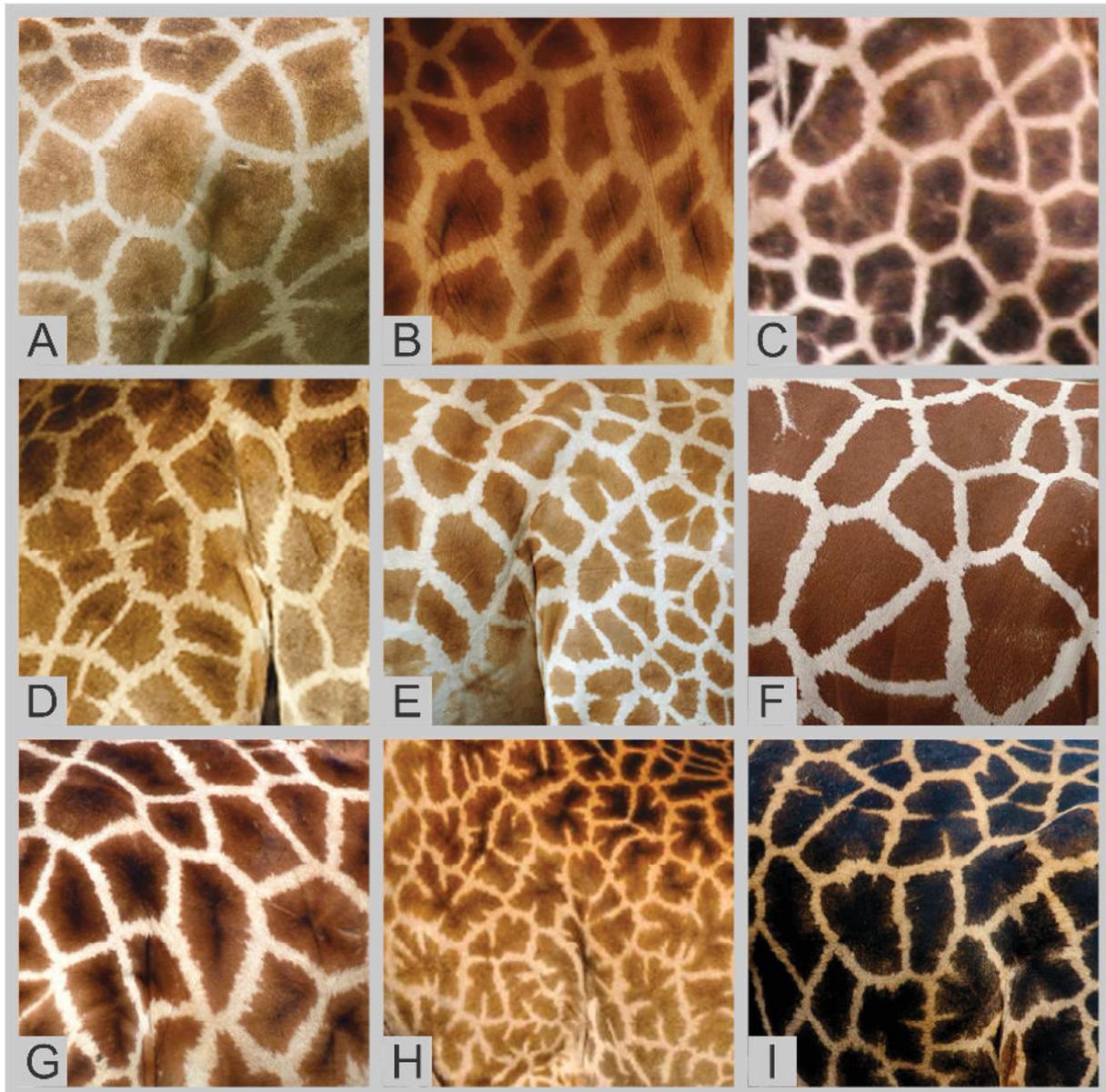


Abbildung. 1.1 Charakteristische Fellzeichnungen der neun Unterarten von *G. camelopardalis*. Unterschiede sind in der Form der Flecken als auch in der Farbe erkennbar. A *G. c. angolensis*. B *G. c. antiquorum*. C *G. c. camelopardalis*. D *G. c. giraffa*. E *G. c. peralta*. F *G. c. reticulata*. G *G. c. rothschildi*. H *G. c. tippelskirchi*. I *G. c. thornicrofti*.

Das kurze und dichte Fell der Giraffen weist ein charakteristisches Muster auf. Es besteht aus großen, unregelmäßig geformten, kastanienbraunen bis schwarzen Flecken, die durch ein Netzwerk von weißen oder gelblich-weißen Banden voneinander getrennt werden (Dagg & Foster, 1976). Die Flecken unterscheiden sich in ihrer Anzahl, der Form sowie der Größe der Fläche, die sie auf dem Körper der Giraffe bedecken (Dagg, 1968). Die Giraffen Afrikas können grob in Nord- und Südgiraffen unterteilt werden. Hierbei verläuft die Grenzlinie zwischen den zu den Nordgiraffen gehörenden Unterarten *G. c. rothschildi* sowie *G. c. reticulata* und der zu den Südgiraffen zählenden Unterart *G. c. tippelskirchi* (Abb. 1.2). Bereits hier sind morphologische Unterschiede erkennbar. Die Fellzeichnung der Südgiraffen

weist häufig zerrissene Flecken auf, die bis zu den Hufen hinab reichen. Bei den Nordgiraffen sind die Beine bis zu den Sprunggelenken meist unbefleckt und die Hörner sind stärker ausgeprägt (Krumbiegel, 1971). Die als charakteristisch angesehene Fellzeichnung ist jedoch innerhalb einer Population nicht immer einheitlich (Dagg, 1968). Die Fellfarbe der Tiere kann variieren und mit zunehmendem Alter nachdunkeln (Dagg & Foster, 1976). Die Musterung der Flecken ist jedoch bei Tieren derselben Population gleich (Dagg, 1962).

1.3 Verbreitungsgebiete der Giraffen

Das Verbreitungsgebiet der heute lebenden Giraffen erstreckt sich auf dem afrikanischen Kontinent weitläufig zwischen der Sahelzone und Südafrika in Savannen und dem Buschland (Abb. 1.2) (Brown *et al.*, 2007)

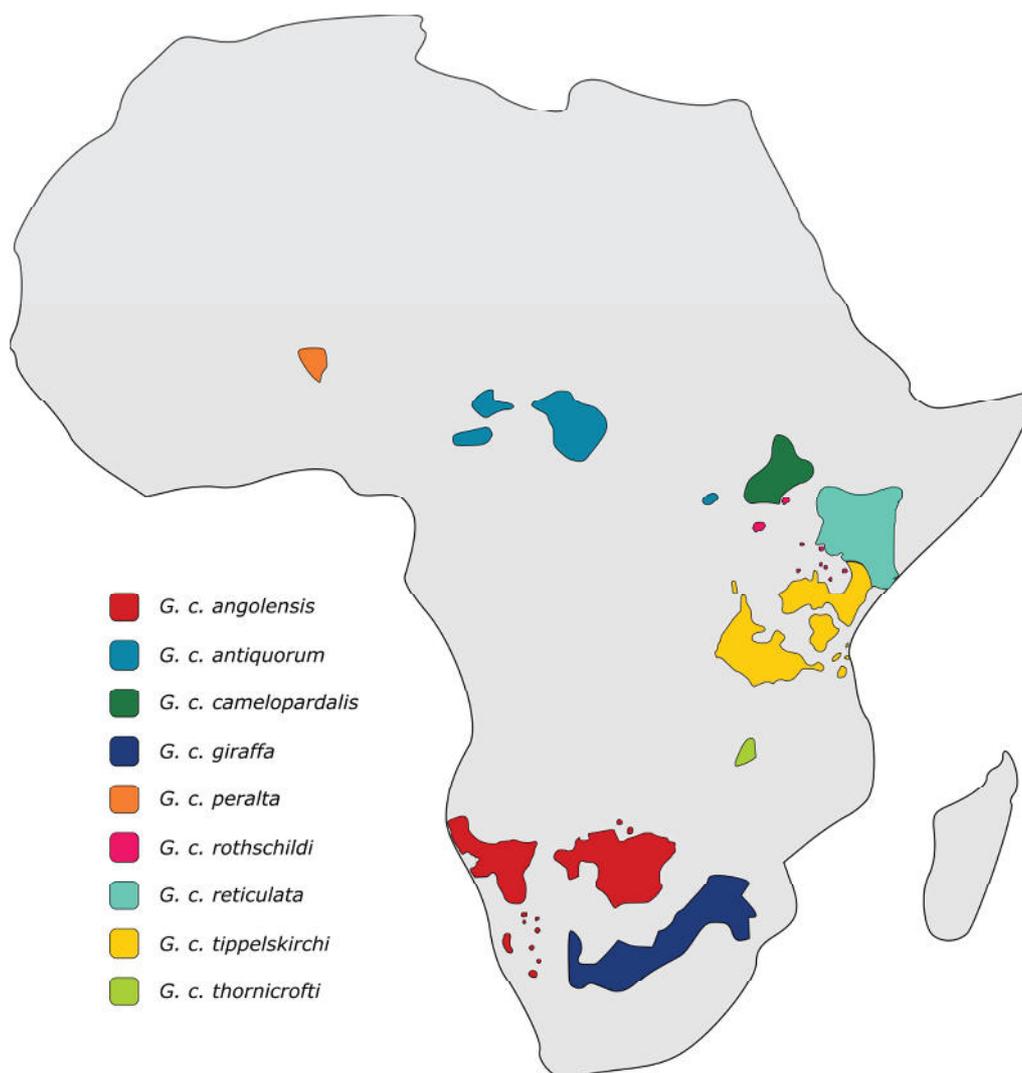


Abbildung 1.2: Heutige Verbreitungsgebiete der neun *G. camelopardalis* Unterarten in Afrika. Verändert nach <http://www.giraffeconservation.org/posters.php>

Säugetiere in ariden Lebensräumen durchstreifen in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von Nahrung und Wasser große Areale (Fennessy, 2009). Auch das Klima, die Topographie, die Dichte der Räuber sowie die Bejagung durch Menschen sind weitere Faktoren, welche die Größe der Streifgebiete beeinflussen (Dagg & Foster, 1976). Die Streifgebiete von Giraffen können in Abhängigkeit vom Individuum und den verschiedenen genannten Faktoren eine Größe von bis zu 1950 km² erreichen (Fennessy, 2009). Bei so hoch mobilen Arten, die zudem in zusammenhängenden Habitaten vorkommen, kann anhaltender Genfluss die genetische Differenzierung und Artbildung unterdrücken (Mayr, 1963). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die Differenzierung der verschiedenen Giraffenpopulationen durch das hohe Ausbreitungspotential der Tiere und dem damit verbundenen Genfluss nur gering ist (Bohonak, 1999). Dies konnte bereits für andere große afrikanische Landwirbeltiere wie den Afrikanischen Elefanten und den Kaffernbüffel nachgewiesen werden, bei denen nur eine geringe Differenzierung zwischen benachbarten Populationen gefunden wurde (Comstock *et al.*, 2002; van Hooft *et al.*, 2000).

Die Giraffen in verschiedenen geographischen Regionen unterscheiden sich jedoch deutlich voneinander. Zum einen weisen sie verschiedene Fellmuster auf und zum anderen sind sie auch genetisch klar abgrenzbar, was durch Variationen in der mitochondrialen DNA nachgewiesen werden konnte (Brown *et al.*, 2007; Hassanin *et al.*, 2007). Daher wurde postuliert, dass trotz des großen Ausbreitungspotentials und der Möglichkeit zum genetischen Austausch eine signifikante Populationsdifferenzierung durch eine reproduktive Isolation stattfindet (Brown *et al.*, 2007). Dies konnte bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. Eine genetische Trennung wurde sowohl für die in Westafrika verbreiteten Unterarten *G. c. antiquorum* und *G. c. peralta* sowie für die Unterarten *G. c. angolensis* und *G. c. giraffa* in Südafrika nachgewiesen (Bock *et al.*, 2014; Hassanin *et al.*, 2007). Auch die Unterart *G. c. thornicrofti* ist genetisch so deutlich isoliert, dass der Status einer eigenen Unterart nicht mehr angezweifelt werden kann (Fennessy *et al.*, 2013).

1.4 Hybridisierungen

Da die Verbreitungsgebiete der Giraffen verschiedener Unterarten sich teilweise überlappen, wurde vermutet, dass Hybridisierungen zwischen den Unterarten stattfinden (Stott, 1959). Hybridisierung bedeutet, dass Tiere verschiedener Arten oder Unterarten Nachkommen zeugen und aufziehen. Hybridisierungen wurden zwischen den Unterarten *G. c. reticulata* und *G. c. tippelskirchi* sowie für *G. c. reticulata* und *G. c. rothschildi* beschrieben (Brown *et al.*, 2007; Kingdon, 1988). Eine Studie zeigte jedoch, dass die Rate der Hybridisierung bei wild lebenden Giraffen nur sehr gering ist. Von 381 untersuchten Tieren waren nur drei Tiere

Hybride, was einem Anteil von 0,8 % entspricht (Brown *et al.*, 2007). Während Hybridisierungen in der Natur ein seltenes Phänomen sind, finden sie bei Giraffen, die in einem Zoo gehalten werden, häufiger statt. Von 890 im Zuchtbuch gelisteten Giraffen waren 121 Tiere Hybride. Dies entspricht einem Anteil von 13,6 % (Jebram, 2014).

1.5 Zootierhaltung und Zuchtprogramme

Die European Association of Zoos and Aquaria (EAZA) ist ein tiergärtnerischer Verband, dem über 340 zoologische Institutionen in über 40 Ländern angehören. Innerhalb der EAZA gibt es zwei verschiedene Zuchtprogramme. Dies ist zum einen das EEP (European Endangered Species Programme) und zum anderen das ESB (European StudBook) (EAZA Manual).

Zuchtprogramme sind wichtige Bestandteile im Management vieler gefährdeter oder vom Aussterben bedrohter Arten. Die meisten Zuchtstrategien für in menschlicher Obhut gehaltene Tiere streben an, genetische Variabilität für kommende Generationen sicherzustellen und Inzucht sowie Hybridisierungen zu vermeiden. Um diese Ziele zu erreichen, werden Zuchtbücher eingesetzt, in denen die Abstammung einzelner Individuen in Form von Stammbäumen erfasst werden (Ballou *et al.*, 2010). Informationen aus den Zuchtbuchstammbäumen sind häufig die Basis für das genetische Management von Tieren in menschlicher Obhut. Diese Informationen können allerdings ungenau oder unvollständig sein (Haig *et al.*, 1994; Morin & Ryder, 1991). Um die Zucht mit nah verwandten Individuen zu vermeiden und um das Level der Inzucht innerhalb einer Art mit unvollständigen Stammbäumen beurteilen zu können, sollte die genetische Abstammung einer Population akkurat aufgezeichnet werden (Haig *et al.*, 1994).

1.6 Das Zuchtbuch der Giraffe

Das Europäische Zuchtprogramm für Giraffen wurde im Jahre 1988 zunächst für die Netzgiraffen *G. c. reticulata* etabliert. Bereits 1991 wurde es auf alle anderen Unterarten erweitert und die Netzgiraffen in das allgemeine Giraffen-EEP eingeschlossen. Das erste Zuchtbuch wurde 2001 publiziert. Im Zeitraum von 2003 bis 2006 wurde das EEP erneut aufgeteilt: das Netzgiraffen-EEP mit den beiden Unterarten *G. c. reticulata* und *G. c. tippelskirchi* sowie das Rothschild-Giraffen-EEP, welches alle anderen Unterarten umfasste. Seit der erneuten Zusammenlegung besteht das Giraffen EEP für alle Unterarten unverändert bis heute. Derzeit wird das Zuchtbuch von Dipl. Biol. Herrn Jörg Jebram aus der Zoom Erlebniswelt (Gelsenkirchen, Deutschland) koordiniert. Es umfasst 168 Zoos, die

Giraffen halten, von denen 164 Mitglieder der EAZA sind. Insgesamt werden 890 Giraffen in europäischen Zoos gehalten, die durch sechs Unterarten repräsentiert werden. Dies sind *G. c. angolensis*, *G. c. antiquorum*, *G. c. giraffa*, *G. c. reticulata*, *G. c. rothschildi* und *G. c. tippelskirchi*. Des Weiteren gibt es Tiere unbekannter Unterart sowie Hybride aus verschiedenen Unterarten (Jebram, 2014).

Jede Giraffe hat eine einzigartige Zuchtbuchnummer. Die erste Zahl gibt die Unterart des Tieres an, die letzten vier Zahlen sind fortlaufende Nummern. Die in europäischen Zoos anzutreffenden Giraffen haben folgende Bezeichnungen: *G. c. angolensis* (8), *G. c. giraffa* (9), *G. c. reticulata* (4), *G. c. rothschildi* (5) und *G. c. tippelskirchi* (6). Des Weiteren gibt es Tiere, deren Unterart unbekannt ist (0) sowie Hybride (*). Für die Unterart *G. c. antiquorum* sind drei verschiedene Artkennzeichnungen vorhanden (1, 2 oder *). Dies setzt sich zusammen aus der Unterart *G. c. antiquorum* (1), *G. c. peralta* (2) sowie Hybride dieser beiden Unterarten (*). Vor einigen Jahren wurde davon ausgegangen, dass auch *G. c. peralta* in europäischen Zoos gehalten wurden. Durch eine genetische Studie konnte jedoch nachgewiesen werden, dass alle als *G. c. peralta* erfassten Zootiere zur Unterart *G. c. antiquorum* gehören (Hassanin *et al.*, 2007).

Die Herkunft der Giraffen und somit auch der Status ihrer Unterart wurde nahezu vollständig dokumentiert. Dennoch gibt es Tiere, deren Herkunftsdaten unvollständig sind und deren Unterart dadurch unbekannt ist. Auch für die Nachkommen dieser Tiere sind die Daten, zum Teil über mehrere Generationen, lückenhaft (Abb. 1.3).

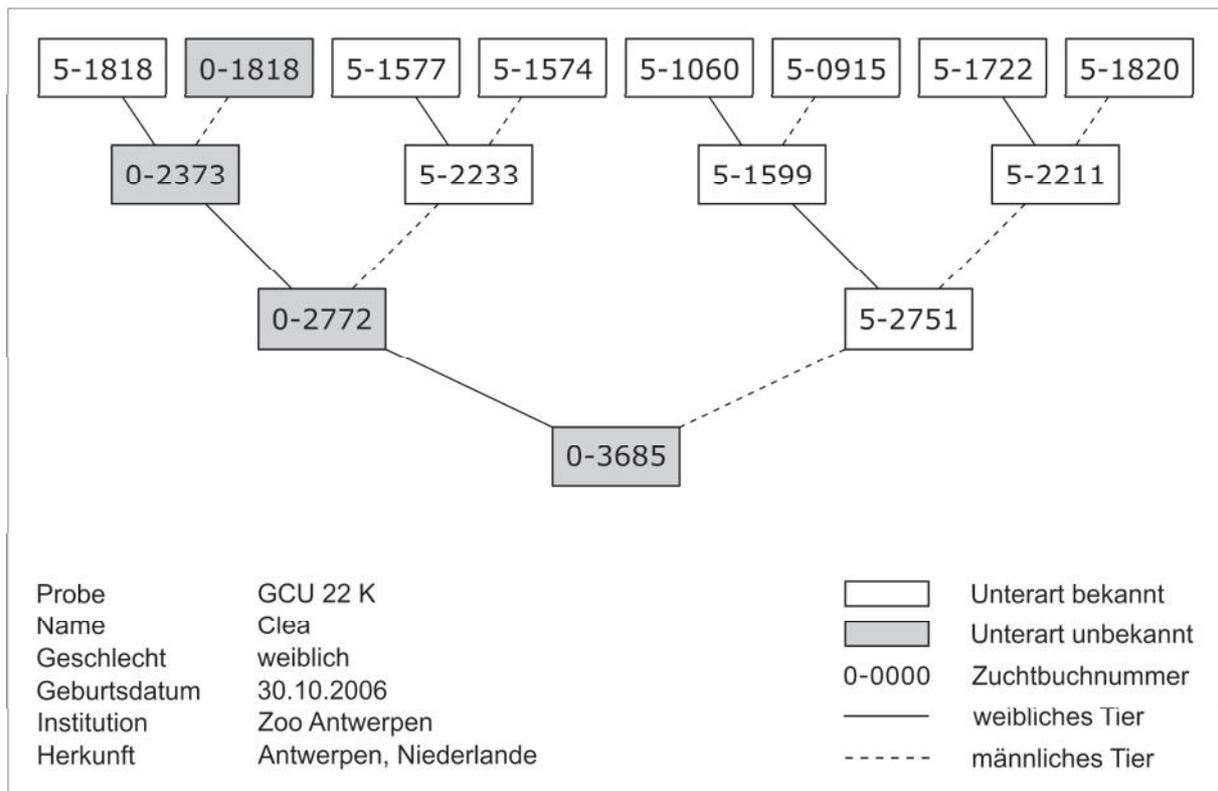


Abbildung. 1.3: Stammbaum eines Tieres unbekannter (unb.) Unterart. Das Tier 0-3685 (f4-Generation) stammt von einem unb. ♀ Tier (f3-Generation), einem unb. ♀ Tier (f2-Generation), einem unb. ♂ Tier (f1-Generation) und einem wild gefangenen ♂ Tier (P-Generation) ab. Alle anderen Tiere des Stammbaumes tragen die Kennzeichnung „5-....“ für *G. c. rothschildi*

Hat ein Tier unbekannter Unterart Nachkommen mit einem Tier bekannter Unterart A, so ist auch die Unterart der Nachkommen unbekannt. Dies gilt auch, wenn diese unbekanntes Nachkommen sich wiederum mit Tieren derselben Unterart A paaren. Sollte das Tier mit unbekanntem Status derselben Unterart A angehören, so kann eine Hybridisierung ausgeschlossen werden. Hat dieses Tier jedoch einen anderen Unterartstatus B, muss von einer Hybridisierung ausgegangen werden. Den Zielen des Zuchtprogrammes folgend, Hybridisierungen zwischen verschiedenen Unterarten zu vermeiden, sind Tiere mit unbekanntem Unterartstatus derzeit von der Zucht ausgeschlossen.

1.7 Beprobung der Giraffen

Der Unterartstatus von 45 Tieren in europäischen Zoos ist derzeit unbekannt (Jebram, 2014). In dieser Studie sollten diese Tiere mit genetischen Markern untersucht werden, um Kenntnis über ihre Unterart zu erlangen und somit die fehlenden Daten im Zuchtbuch der Giraffen zu ergänzen.

Eine invasive Beprobung ist bei Giraffen nur schlecht möglich. Meistens sind sie so scheu, dass keine medizinischen Eingriffe am Tier durchgeführt werden können. Auch tierärztliche Untersuchungen in Narkose werden vermieden, da durch die Größe einer Giraffe, dem langen Hals und den langen Beinen eine sehr hohe Verletzungsgefahr besteht. Zudem steigen Puls und Blutdruck beim Liegen stark an, sodass es während einer Narkose zu Herzversagen kommen kann (Fowler & Miller, 2008).

Aus diesem Grund wurde zur Beprobung der Tiere eine nichtinvasive Methode gewählt. Die nichtinvasive Beprobung erlaubt es, genetische Studien an Tieren durchzuführen, ohne diese fangen oder anfassen zu müssen (Taberlet *et al.*, 1999). Das Probenmaterial als Quelle der DNA können beispielsweise verlorene Haare, Kot, Urin sowie Schleimhautzellen an Futterbrocken sein (Morin & Woodruff, 1996). Bei der Wahl des Materials stand vor allem die Notwendigkeit einer einfachen Durchführbarkeit der Beprobung im Vordergrund. Grund dafür war, dass die Probenentnahme nicht selbst durchgeführt wurde, sondern durch die Mitarbeiter in den europäischen Zoos erfolgen musste. Daher wurden für diese Studie primär Kotproben als Probenmaterial ausgewählt.

1.8 Auswahl der genetischen Marker

Bei einer nichtinvasiven Beprobung kann sowohl die Menge als auch die Qualität der DNA gering sein. Die DNA liegt häufig nur in kurzen und degradierten Fragmenten vor, wodurch die Amplifikation langer Sequenzen erschwert wird. (Frantzen *et al.*, 1998). Aus diesem Grund sind genetische Marker sehr gut geeignet, welche eine Länge von etwa 200-300 Basenpaaren aufweisen (Taberlet *et al.*, 1999).

Mikrosatelliten können bei einer Länge von 100-300 Basenpaaren auch aus degradiertem DNA mittels PCR amplifiziert werden (Taberlet *et al.*, 1999). Zudem sind Mikrosatelliten hoch polymorph (Zane *et al.*, 2002) und liefern so hochauflösende Informationen. Sie werden unter anderem zur Untersuchung von Verwandtschaftsverhältnissen einzelner Individuen eingesetzt (Selkoe & Toonen, 2006). In einer populationsgenetischen und phylogeographischen Studie zur Differenzierung der Unterarten von Giraffen wurden Mikrosatelliten bereits erfolgreich eingesetzt (Brenneman *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2007).

Mitochondriale DNA (mtDNA) liegt in jeder Zelle eines Säugetieres in mehreren hundert bis tausend Kopien vor (Robin & Wong, 1988). Aus diesem Grund sind für eine Extraktion bereits kleine Mengen an Probenmaterial ausreichend (Pakendorf & Stoneking, 2005). Die Vererbung der mtDNA erfolgt, bis auf seltene Ausnahmen, uniparental über die maternale Linie (Gyllensten *et al.*, 1991; Stoneking, 1993). Im mitochondrialen Genom ist die

nicht-kodierende Kontrollregion lokalisiert (Stoneking *et al.*, 1991), welche eine hoch variable Sequenz, den displacement loop (D-loop) enthält. Dieser Marker konnte bereits erfolgreich für phylogenetische Studien an Giraffen genutzt werden (Bock *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2007; Fennessy *et al.*, 2013; Hassanin *et al.*, 2007).

1.9 Ziele dieser Arbeit

Die wesentlichen Ziele von Zuchtprogrammen sind die Erhaltung der genetischen Diversität einer Zootierpopulation sowie die Vermeidung von Inzucht und Hybridisierungen. Um diese Ziele zu erreichen, sollten die Informationen über die Verwandtschaft von Tieren und den Status ihrer Unterart so akkurat und vollständig wie möglich sein. Innerhalb des Giraffenzuchtprogrammes gibt es derzeit 45 Tiere, deren Unterartstatus unbekannt ist (Jebram, 2014). Aus diesem Grund sind diese Tiere derzeit von der Zucht ausgeschlossen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die Unterart dieser Tiere mithilfe von Mikrosatelliten und Sequenzanalysen zu bestimmen. Damit werden zum einen die Daten für das Zuchtbuch vervollständigt, zum anderen könnten diese Tiere, falls sie sich eindeutig einer Unterart zuordnen lassen, wieder in das Zuchtprogramm aufgenommen werden. Sollten diese Tiere seltene Allele aufweisen, könnte außerdem durch eine Zucht mit diesen Tieren die genetische Diversität innerhalb der Zootierpopulation erhöht werden. Auch die Institutionen, die Halter der hier beprobten Giraffen sind, können von den Ergebnissen dieser Studie profitieren, da zur Zucht zugelassene Tiere rentabler sind als nicht zugelassene Tiere.

2 Material und Methoden

2.1 Labormaterial

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
DNA-Extraktion & DNA Fällung	
AquaGenomic™ Kit	MoBiTec
Aqua Precipi™	MoBiTec
Proteinase K 20 mg/mL	Qiagen
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen
QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit	Qiagen
DNAzol® Genomic DNA Isolation Reagent	Molecular Research Center, Inc.
DNAzol®, Polyacryl Carrier	Molecular Research Center, Inc.
EtOH abs.	Sigma-Aldrich
3M autoklaviertes Natriumacetat	ROTH
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) pH 7,4	eigene Herstellung
137 mM Natriumchlorid	
2,7 mM Kaliumchlorid	
12 mM Dinatriumhydrogenphosphat	
TE-Minimum Puffer	eigene Herstellung
100mM Tris HCl (pH 7,5) 100 µL	
10mM EDTA (pH 8) 10 µL	
Reinst H ₂ O 9,89 mL	
Polymerase-Kettenreaktion	
BSA (Bovine Serum Albumin, 20 mg/mL)	NEW ENGLAND BioLabs Inc.
DMSO (Dimethylsulfoxid, 1x)	J.T.Baker
dNTP-Mix (2 mM pro Nukleotid)	Roche
HPLC-gereinigtes Wasser	J.T. Baker
M13 Primer	Metabion
Euro Taq (5 U/µL)	EuroClone
PCR-Puffer 10 x	EuroClone
MgCl ₂ (50 mM)	EuroClone
HotMaster Taq (5 U/µL)	5Prime
PCR-Puffer 10x	5Prime
Taq DNA Polymerase (5 U/µL)	Thermo Scientific
PCR-Puffer 10x (NH ₄) ₂ SO ₄ , Taq-Puffer 10x KCL	Thermo Scientific
MgCl ₂ (25 mM)	Thermo Scientific
Biotaq DNA Polymerase	Bioline
PCR-Puffer 10x NH ₄	Bioline
MgCl ₂ Lösung (50 mM)	Bioline
Hot Start Taq II	Phire Hot Start II
PCR-Puffer 5x	Phire Hot Start II
MgCl ₂	Phire Hot Start II

Chemikalie	Hersteller
Primer	
Mikrosatelliten (100 pmol/μL)	Biomers, Metabion International AG
Mitochondriale Sequenz (100 pmol/μL)	Metabion International AG
Agarosegelelektrophorese	
6x Orange DNA Loading Dye	Fermentas
O'GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (0,1 μg/μL)	Fermentas
LE Agarose	Biozym
TBE-Puffer (10x) pH 8,3 ±0,2	
EDTA (Ethylendiamintetraacetat, 0,02 M)	MERCK
Borat (0,89 M)	MERCK
Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethan, 0,89 M)	MERCK
Ethidiumbromid 1 %	ROTH
LI-COR Polyacrylamidgelelektrophorese	
KB ^{Plus} Lösung 6,5 % Gelmatrix	LI-COR Biosciences
APS (Ammoniumperoxidisulfat) 10%	MERCK
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	MERCK
TBE-Puffer 1x (s.o.)	MERCK
Blue Stop Solution	LI-COR Biosciences
700 IRDye® Sizing Standard solution 50-350bp	LI-COR Biosciences
800 IRDye® Sizing Standard solution 50-350bp	LI-COR Biosciences
700 IRDye® Sizing Standard solution 50-700bp	LI-COR Biosciences
Aufreinigung des PCR-Produktes	
Exonuclease Exol (1 U/μL)	Fermentas
Alkalin-Phosphatase Fast AP (1 U/μL)	Fermentas

2.1.2 Geräte

Gerät	Gerätename	Hersteller
Waage, max. 310 g		Faust
Waage, max. 1500 g		Faust
Tischzentrifuge	Mini Star Silverline	VWR
Tischzentrifuge	Galaxy MiniStar	VWR
Kühlzentrifuge	Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo SCIENTIFIC
BeadBeater	TissueLyser LT	Qiagen
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Heizblock	TS1 Thermoshaker	Biometra
Thermocycler	Flex Cyclor	AnalytikJena
Thermocycler	T Professional Thermocycler	Biometra
Thermocycler	Primus 96 plus	MWG-BIOTECH
Spannungsgeber für die Gelelektrophorese	Power Pac 200	Biorad
Geldokumentationsanlage	Serva DIAS II	Gemini LabTec
LI-COR	DNA-Analyzer 4300 LI-COR	Bioscenes GmbH

2.1.3 Software

Software	Version	Hersteller
ARLEQUIN	3.5.2.2	Excoffier, Laval, Schneider; 2006
CLUMPP	1.1.2	Jacobsson, Rosenberg; 2007
CONVERT	1.3.1	Glaubnitz; 2004
DISTRUCT	1.1	Rosenberg; 2004
GENEIOUS	9.0.9	Biomatters Limited 2005-2015
IRFAN VIEW	4.27	Irfan Skiljan; 2010
MICRO-CHECKER	2.2.3	Oosterhout, Hutchinson, Wills; 2004
PCA-GEN	1.2.1	Goudet; 1999
REMOTE CAPTURE DC		Canon Utilities
SAGALITE (SAGA ^{GT})		LI-COR Biosciences GmbH
STRUCTURE	2.3.4	Pritchard, Wen, Falush; 2000
STRUCTURE HARVESTER	Webv0.6.94	Earl, vonHoldt; 2012
TESS	2.3.1	Chen; 2007

2.2 Herkunft und Versand des Probenmaterials

Zur Untersuchung der Giraffen unbekannter Unterart wurden insgesamt 118 Proben aus 36 europäischen Zoos angefordert. Grundlage war die Bestandsliste aus dem Zuchtbuch der Giraffen vom 31.12.2013. Es handelte sich um 14 Proben der Unterart *G. c. angolensis*, 15 Proben der Unterart *G. c. antiquorum*, 12 Proben von *G. c. giraffa*, 15 Proben von *G. c. reticulata* sowie 16 Proben von *G. c. rothschildi* und eine Probe von *G. c. tippelskirchi*. Die Anzahl der Proben unbekannter Tiere lag bei 45 (Tab. 2.1). Um eine nichtinvasive Beprobung durchzuführen, wurden primär Kotproben und Abstriche der Maulschleimhaut angefordert. Blut- und Gewebeproben sollten nur dann entnommen werden, wenn dadurch das Tier nicht beeinträchtigt würde. An jeden Zoo wurde ein Päckchen mit den benötigten Utensilien zum Sammeln der Proben verschickt. Jedes Paket enthielt pro Giraffe jeweils ein Probengefäß für Kotproben bzw. Abstriche der Maulschleimhaut sowie zwei Paar Handschuhe und einen adressierten Rückumschlag. Zudem wurde jeweils eine Anleitung zum korrekten Sammeln der Proben, entweder in deutscher, englischer, französischer oder russischer Sprache beigelegt (Anhang 6.1, S. 90 ff.).

Tabelle. 2.1: Herkunft der Proben der Tiere mit unbekanntem Artstatus und der sechs Unterarten. Für jede Institution werden Anzahl aller Proben und Anzahl der Proben für jede Unterart dargestellt.

Institution	Anzahl der Proben	Anzahl der Proben je Unterart						
		<i>Giraffa camelopardalis</i> ssp.						
		<i>angolensis</i>	<i>antiquorum</i>	<i>giraffa</i>	<i>reticulata</i>	<i>rothschildi</i>	<i>tippelskirchi</i>	Unbekannt
1 Almaty, Kasachstan	5			5				
2 Amersfoort, Niederlande	6	1			2	4		1
3 Antwerpen, Belgien	2						1	1
4 Bordeaux-Pessac, Frankreich	3							3
5 Burford, Großbritannien	1							1
6 Bussulengo, Italien	1							1
7 Chessington, Großbritannien	1							1
8 Dalton in Furness, Großbritannien	4		3					1
9 Deigne-Aywaille, Belgien	1							1
10 Dortmund, Deutschland	5	5						
11 Duisburg, Deutschland	4				5			
12 Ebeltoft, Dänemark	5					2		3
13 Falconara Marittima, Italien	1							1
14 Gelsenkirchen, Deutschland	5					5		
15 Kaunas, Litauen	1							1
16 Kolmarden, Schweden	7							7
17 Kristiansand, Norwegen	1							1
18 La Barben, Frankreich	5		5					
19 La Fleche, Frankreich	5		4					1
20 Le Guerno, Frankreich	4		1			2		1
21 Le Vigen, Frankreich	4		2			1		1
22 Lissabon, Portugal	8	8						
23 Malton, Großbritannien	1							1
24 Montpellier, Frankreich	1							1
25 Moskau, Russische Föderation	4			3				1
26 Osnabrück, Deutschland	7				5			2
27 Palic, Serbien	2					1		1
28 Pleugueneuc, Frankreich	1							1
29 Pont-Scorff, Frankreich	2					1		1
30 Port Saint Père, Frankreich	4			4				
31 Riga, Lettland	3							3
32 Rom, Italien	3				1			2
33 St. Petersburg, Russische Föderation	2				1			1
34 Videbæk, Dänemark	2				1			1
35 Wien, Österreich	2							2
36 Zlin, Tschechien	2							1
Gesamt	118	14	15	12	15	16	1	45

2.3 Labormethoden

2.3.1 DNA-Extraktion und Fällung der DNA

Für die Extraktion der genomischen DNA wurden verschiedene Untersuchungsmaterialien verwendet. Zur Etablierung der Extraktionsmethode wurden bei Giraffen in der Zoom Erlebniswelt Gelsenkirchen fünf Kotproben, vier Abstriche der Maulschleimhaut, eine flüssige Speichelprobe, jeweils eine Haarprobe mit und ohne Haarwurzel und eine Blutprobe entnommen. Im späteren Verlauf der Studie konnten von einer Giraffe aus dem Zoo Duisburg auch Gewebeproben aus Muskelgewebe untersucht werden.

DNA-Extraktion aus Haaren

Für die Haarprobe ohne Haarwurzeln wurden lose Haare vom Hals der Giraffe abgesammelt und ohne Medium in ein Gefäß überführt. Für die Haarprobe mit Haarwurzeln wurden mit einer Pinzette Haare vom Kopf und Hals der Giraffe ausgezogen und ohne Medium in ein Gefäß überführt. Die Extraktion der Haare mit Haarwurzeln erfolgte nach Herstellerangaben (DNeasy® Blood & Tissue Kit; Fa. Qiagen), wobei das Standardprotokoll modifiziert wurde (User-Developed Protocol DY04, Qiagen). 300 µL ATL Puffer wurden mit 20 µL Proteinase K und 20 µL 1M DTT in ein Gefäß gegeben. Nach Zufügen der Haare wurde die Probe bis zur vollständigen Lyse der Haare etwa eine Stunde bei 56 °C inkubiert. Nach dem Vortexen für 15 Sekunden wurden 300 µL AL Puffer hinzugefügt und erneut gevortext. Nach Zufügen von 300 µL Ethanol (96-100 %) wurde erneut gevortext und anschließend mit dem Standardprotokoll fortgefahren. Die Elution erfolgte in 50 µL AE Puffer.

Um eine weitere Methode zu testen, wurde eine DNA-Extraktion einer Probe aus Haaren mit und ohne Haarwurzel mit DNAzol® nach Angaben des Herstellers (Chomczynski *et al.*, 1997), modifiziert nach Schweinsberg (2010), durchgeführt. Die Proben wurden zur Lyse des Gewebes für 45 Minuten inkubiert und anhand des Standardprotokolls extrahiert. Das Pellet wurde schließlich in 50 µL TE-Minimum-Puffer gelöst.

DNA-Extraktion aus flüssigem Speichel und Maulschleimhautabstrichen

Eine Probe flüssiger Speichel einer Giraffe konnte in einem Gefäß aufgefangen werden. Die Maulschleimhautabstriche wurden mit zwei Wattestäbchen entnommen. Diese wurden etwa zehnmal an der Innenseite der Wange entlanggestrichen, um die Schleimhautzellen an den Wattestäbchen zu fixieren. Die Wattestäbchen wurden für 15 Minuten in 500 µL TE-Minimum-Puffer eingelegt, um die Schleimhautzellen im Puffer zu lösen. Nach der Inkubationszeit wurden die Wattestäbchen verworfen. Die Extraktion der DNA aus der

flüssigen Speichelprobe sowie der Maulschleimhautabstriche erfolgte nach Angaben des Herstellers (DNeasy® Blood & Tissue Kit; Fa. Qiagen). Dabei wurde das Standardprotokoll folgendermaßen modifiziert (User-Developed Protokoll DY07, Qiagen): 4 mL PBS wurden zur Probe zugefügt und für fünf Minuten zentrifugiert (1800 g). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 180 µL PBS resuspendiert. 25 µL Proteinase K und 200 µL Puffer AL wurden hinzugefügt und die Probe nach dem Vortexen für 10 Minuten bei 56 °C inkubiert. Nach Durchführung des Standardprotokolls wurde die DNA in 50 µL AE Puffer eluiert.

Eine zweite Extraktionsmethode mit DNAzol® wurde nach Herstellerangaben, modifiziert nach Schweinsberg (2010), für die Abstriche der Maulschleimhaut durchgeführt.

DNA-Extraktion aus Blut- und Gewebeproben

Die Blutprobe wurde im Zoo mithilfe einer Raubwanze entnommen. Diese saugt bei der Giraffe Blut und lässt sich anschließend auf den Boden fallen. Nach dem Aufsammeln der Wanze konnte mit einer Spritze das Blut aus dem Abdomen der Wanze entnommen und in ein EDTA-Röhrchen (Ethyldiamintetraessigsäure) überführt werden. Das EDTA verhindert die Gerinnung des Blutes. Die Gewebeproben aus Muskelgewebe wurden im Zoo Duisburg bei einem verstorbenen Tier aus der Kaumuskulatur entnommen und in Ethanol abgelagert. Die DNA-Extraktion der Blut- und Gewebeproben wurde nach den Angaben des Herstellers (DNeasy® Blood & Tissue Kit; Fa. Qiagen) durchgeführt.

DNA-Extraktion aus einer Raubwanze

Um zu testen, ob die aus dem Blut extrahierte DNA von der Giraffe und nicht von der Wanze stammt, wurde aus den Extremitäten sowie dem Abdomen der Wanze DNA extrahiert. Dies erfolgte gemäß Herstellerangaben (DNeasy® Blood & Tissue Kit; Fa. Qiagen), wobei das Protokoll modifiziert wurde (Qiagen Supplementary Protocol DY14, Qiagen). Zu einer Probe wurde 180 µL ATL Puffer und 20 µL Proteinase K hinzugefügt. Nach dem Vortexen wurde die Probe des Abdomens zur Lyse des Gewebes für etwa drei Stunden bei 56 °C inkubiert. Die Probe der Extremitäten wurde über Nacht inkubiert. 200 µL Puffer AL und 20 µL Ethanol (96-100 %) wurden zu den Proben gegeben und die weiteren Schritte laut Standardprotokoll durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte in 100 µL AE Puffer, um die DNA-Konzentration zu erhöhen.

DNA-Extraktion aus Kotproben

Die genomische DNA der Giraffen wird bei Kotproben aus den Darmschleimhautzellen auf der Außenseite der Kotpellets gewonnen. Im Inneren der Pellets befindet sich hauptsächlich pflanzliche DNA aus der Nahrung der Tiere. Zur Präparation der Kotproben wurde mit einem sterilen Skalpell die äußere Schicht der Kotpellets abgekratzt und in ein Probengefäß überführt.

Zur Etablierung einer geeigneten Methode wurden drei verschiedene Extraktionsmethoden getestet: das QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit der Firma Qiagen, die Extraktion mit DNAzol® (Molecular Research Center) sowie das AquaGenomic™ Kit der Firma MoBiTec. Fünf Tiere aus der Zoom Erlebniswelt in Gelsenkirchen wurden jeweils viermal beprobt und jede Methode mit diesen Proben durchgeführt.

Die Extraktion mit dem QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit® (Qiagen) erfolgte für die fünf Proben jeweils zweimal gemäß Herstellerangaben, wobei die zweite Extraktion modifiziert wurde. Dazu wurden die Kotproben nach dem Abwiegen mit einem Pistill zerkleinert, um die Zellen aufzuschließen. Nach Zugabe des ATE-Puffers wurde die Inkubationszeit auf fünf Minuten verlängert, um die Effizienz der Elution zu erhöhen. Zudem erfolgte die Elution der Proben jeweils in 100 µL ATE-Puffer.

Die mit DNAzol® (Molecular Research Center) durchgeführte Extraktion erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers und wurde nach Schweinsberg (2010) modifiziert.

Die Extraktion mit dem AquaGenomic™ Kit (MoBiTec) erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei das Protokoll modifiziert wurde (Crowhurst *et al.*, 2013). 30 mg einer Kotprobe wurden präpariert und 400 µL AquaGenomic Solution (MoBiTec) hinzugefügt. Eine Stahlperle (ø 3 mm) oder 0,2 mL Glasperlen (ø 1,0 mm) wurden zur Probe gegeben und für 15 Minuten bei höchster Stufe in einem Beadbeater gevortext, um die Zellen zu lysieren. Nach Zugabe von 25 µL Proteinase K (Qiagen) wurden die Proben zunächst für 90 Minuten bei 60 °C und dann für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert, um die Proteinase K wieder zu deaktivieren. Die Proben wurden für eine Minute gevortext und anschließend für vier Minuten zentrifugiert (14.000 g), um Zelltrümmer zu pelletieren. Der die DNA enthaltende Überstand (ca. 400 µL) wurde in ein neues Gefäß überführt und jeweils 200 µL Ethanol abs. und 200 µL AquaPrecipi Solution (MoBiTec) zur Probe pipettiert. Nach dem Vortexen wurde die Probe für 30 Minuten bei -20 °C gelagert und anschließend für vier Minuten zentrifugiert (14.000 g). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das DNA-Pellet mehrmals mit 70 % Ethanol ausgespült und mit der Oberseite nach unten auf Papier gestellt, um das DNA-Pellet zu trocknen. Das Pellet wurde mit 100 µL TE-Minimum-Puffer resuspendiert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Schließlich wurde die Probe für zwei Minuten zentrifugiert (12.000 g) und der

Überstand, welcher die DNA enthält, in ein neues Gefäß überführt. Um ein weiteres Aliquot der DNA zu erhalten, wurden die letzten beiden Schritte wiederholt.

Fällung der DNA

Um den Reinheitsgrad der DNA zu erhöhen, wurde die aus den Kot- und Speichelproben extrahierte DNA gefällt (nach Schweinsberg, 2010). Einer Probe von 40 µL Volumen wurde 80 µL Ethanol abs. (-20°C) sowie 4 µL Natriumacetat zugegeben. Sie wurde über Nacht bei -20 °C gelagert und anschließend bei 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert (11000 rpm). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 100 µL Ethanol (70 %) gelöst und für eine Minute zentrifugiert (5000 rpm). Dieser Vorgang wurde wiederholt und das Pellet schließlich in 40 µL TE-Minimum-Puffer resuspendiert.

2.2.3 Auswahl der Mikrosatelliten

Zur Untersuchung der Giraffen wurden 17 Mikrosatelliten ausgewählt (Tab. 2.2). Bei der Auswahl wurden verschiedene Kriterien berücksichtigt. Im Hinblick auf die Qualität und Auflösung der Marker wurden die Anzahl der Allele, die Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht sowie die Produktgröße der Allele bedacht. Weitere Aspekte waren die Übertragbarkeit der Loci zwischen den verschiedenen Unterarten von *Giraffa camelopardalis* sowie die Verwendung verschiedener biologischer Materialien als Quelle für die DNA.

Die Loci 11HDZ073, 11HDZ102, 11HDZ443, 11HDZ480, 11HDZ550, 11HDZ562, 11HDZ567, 11HDZ626, 11HDZ665 und 11HDZ1004 wurden für die Massai-Giraffe *G. c. tippelskirchi* etabliert (Huebinger *et al.*, 2002) und in populationsgenetischen Studien auch für andere Unterarten der Giraffe erfolgreich verwendet (Brenneman *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2007). Die Loci Gica 9976, Gica 16160, Gica 10894, Gica 9905 sowie Gica 14170 wurden speziell für die Analyse von aus Kotproben extrahierter DNA entwickelt (Crowhurst *et al.*, 2013). Sie wurden ausgewählt, da in dieser Studie der Fokus der Untersuchung auf Kotproben als nichtinvasive Beprobung gerichtet war. Die Loci Gca_21 und Gca_22 wurden etabliert, um alle bekannten Unterarten analysieren zu können (Carter *et al.*, 2012). Mit der Software NETPRIMER (Premier Biosoft International) wurde getestet, an welchem Primer eines jeweiligen Primerpaares die fluoreszierende M13-Sequenz für die spätere Untersuchung zur Genotypisierung angehängt werden soll. Dabei wurde für jeden Locus der Primer ausgewählt, bei dem die geringste Anzahl an Self Dimeren und Hair Pins kalkuliert worden war.

Tabelle. 2.2: Eigenschaften der Mikrosatelliten. Motiv, Allelgröße und Annealing-Temperatur (bei Gradient mit ermittelter bester Temperatur) der verwendeten Mikrosatelliten sowie Sequenzen der Primer (F: Forward, R: Reverse) mit M13-IRDye Fluoreszenzmarkierung (grau unterlegt) und Erstveröffentlichung der Loci ¹Huebinger *et al.* 2002, ²Crowhurst *et al.* 2013, ³Carter *et al.* 2012

Locus	Repeat Motif	Allelgröße [bp]	Primersequenz (5'-3')	T _a [°C]
11HDZ073 ¹	(GT) ₁₂	221-229	F: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CAG ACC TAA TGC CAC CAG AAT G R: GAG GGT AGT GGA ACT GGG A	54
11HDZ102 ¹	(CA) ₁₀	193-195	F: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CTG GAA TAG GAA ATG GCA ACC R: GAT TGA AGG AAA CCA GAC ACG	56
11HDZ443 ¹	(GT) ₁₇	139-147	F: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CCA TAA AAT TAA AAG GCA CTT GTT CC R: ATG GGG GTC ACA AAG AGT CTG	Gradient 59
11HDZ480 ¹	(TG) ₁₅	122-126	F: TGC TTT AGT AAA GTG TGT GAA ATG C R: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CCA CAG AAT CTA CAC ACA TCA CAC ATC	Gradient 54
11HDZ550 ¹	GTCT(GT) ₁₄ CT (GT) ₄	168-180	F: GGA CAG TGG ACT AGG AGA AAA GG R: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CGC CTG GGA TTC CTG GTA AAC	54
11HDZ562 ¹	(CA) ₁₉	138-144	F: AAA GAG TTA GAT GCA ACT GAG TGA C R: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CTC AGC ATC CTA TAT TTT CAC ACC	52
11HDZ567 ¹	(CA) ₁₃	182-212	F: GGT TTC AGA AGG TTT GTT GGC R: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CTG CAT TAT CCC AAG TTC TTT AGC	52
11HDZ626 ¹	(GT) ₁₆	182-194	F: CAT TGG CAG GTG GAT TCT TTA C R: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CAG CCC AAT TAT TCT TTT ACT TCC C	50
11HDZ665 ¹	(CA) ₁₆	194-228	F: GCC CCT TGC CTA GCT TAA C R: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CCC GAC TGT AGA AAT GAA GCG	Gradient 56
11HDZ1004 ¹	(CA) ₆ (TA) ₂ (CA) ₅ TA(CA) ₆	148-164	F: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CCT CAT GTC TCT TGC ACT GGC R: GTA ATG GCA TAT TTC ACT CTT TTT C	54
Gica 9976 ²	(GT) ₁₈	250-272	F: GGG AGG AGA CTG GAT TGT CA R: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CAG TGG CTC TCC AAA GCA CAT	63
Gica 16160 ²	(GT) ₂₄	133-167	F: TGC AGA GCA ATT GCA AAC AT R: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CGT GGG CAA CTG TTC ATA GGG	60
Gica 10894 ²	(GT) ₁₆	240-254	F: TGT TGT CAC TTA CCC GTT TTC C R: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CAG AGT CTG GGA TGC ATT TGG	63
Gica 9905 ²	TG) ₁₁ A(GT) ₂	289-327	F: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CAT GAT ATT CAG CTG GGC CTC T R: CCT GAT GGA CAC CAG GTT G	60
Gica 14170 ²	(AT) ₃ (GT) ₁₈	261-269	F: GTG AGG TGC CAT CAC CTT CT R: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CCA CTG GAG GCA AGT CAA CAA	63
Gca_21 ³	(AGAT) ₁₁	237-257	F: GAG ACA CAG AAC CAA CAG GC R: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CTC ATA CTT TGA GCA TCC CAG C	65 / 58
Gca_22 ³	(AC) ₉	257-273	F: CGC TGA CTG AAG TGT GAA GC R: CAC GAC GTT GTA AAA CGA CAC ACT AAC TCC AGG CTC ACG	62 / 54

2.3.3 Amplifikation der DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der Mikrosatelliten mittels PCR erfolgte anhand spezifischer Protokolle aus den jeweiligen Veröffentlichungen der Loci (Carter *et al.*, 2012; Crowhurst *et al.*, 2013; Huebinger *et al.*, 2002). Diese Protokolle wurden standardmäßig verwendet und zur Etablierung der optimalen PCR-Bedingungen verschiedene Parameter verändert.

2.3.4 Optimierung der PCR-Bedingungen

Zur Optimierung der PCR-Ergebnisse wurden verschiedene Komponenten der PCR verändert. Dies diente zum einen der Verbesserung der Qualität der Banden auf dem LI-COR-Gel (siehe Genotypisierung 2.3.7). Zum anderen wurden ökonomische Aspekte wie der Verbrauch der Chemikalien bedacht. Um die exakten Ergebnisse der einzelnen Optimierungsschritte nachvollziehen zu können, wurde in einer einzelnen PCR immer nur eine Bedingung variiert. In Kapitel 2.3.5 sind die optimierten Protokolle für die verschiedenen Loci dargestellt, die nach den Maßnahmen zur Optimierung ausgewählt wurden.

Gradienten-PCR

Für die Loci 11HDZ443, 11HDZ480, 11HDZ626 und 11HDZ665 wurde jeweils eine PCR mit Temperatur-Gradient durchgeführt. Für den Locus 11HDZ443 mit einer Annealing-Temperatur von 52 °C wurden folgende Temperaturen für das Annealing eingestellt: 49 °C, 51 °C, 53,4 °C, 54,6 °C, 57 °C, 59 °C. Der Gradient für die Annealing-Temperatur des Locus 11HDZ626, welche mit 50 °C angegeben war, verlief folgendermaßen: 47 °C, 49 °C, 51,4 °C, 52,6 °C, 55 °C, 57 °C. Für den Gradienten der Loci 11HDZ480 und 11HDZ665, welche eine Annealing-Temperatur von 54 °C aufwiesen, wurden folgende Temperaturen gewählt: 46 °C, 48 °C, 50,4 °C, 52,8 °C, 55 °C, 56 °C.

Gesamtvolumen

Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes wurde, abweichend von dem angegebenen Volumen von 25 µL (Huebinger *et al.*, 2002), auf 10 µL, 15 µL und 20 µL herabgesetzt. Dabei wurde die eingesetzte DNA-Menge von 1 µL beibehalten. Für die weiteren Loci (Crowhurst *et al.*, 2013) wurden die Mengen der Gesamtansätze von 15 µL auf 10 µL reduziert.

Konzentration der DNA

Die Konzentration der DNA in einer Probe konnte mit dem NanoDrop nicht quantifiziert werden, da neben der Herbivoren-DNA auch pflanzliche und bakterielle DNA extrahiert wurde. Daher wurde das Volumen der eingesetzten DNA für die PCR variiert. Die eingesetzte Menge der DNA im Verhältnis zum Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug 1/10, 2/10, 5/10, 5/20 und 10/20. Um die Menge möglicher PCR-Inhibitoren, welche in Kotproben besonders präsent sind, zu reduzieren, wurde die eingesetzte DNA verdünnt. Dazu wurde eine zuvor erfolgreich amplifizierte Probe in einer Verdünnungsreihe mit folgenden Verdünnungen getestet: unverdünnt, 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/70 und 1/90. Bei diesen Versuchen wurde 1 μ L DNA bei einem Gesamtvolumen von 10 μ L verwendet.

MgCl₂-Konzentration

Mit der Magnesiumchlorid-Konzentration können die Trennung der Einzelstränge bei der Denaturierung, das Primerannealing und die Produktspezifität verändert werden (Mülhardt, 2009). Die Konzentration des MgCl₂ wurde daher mit Konzentrationen von 0,3 mM, 0,6 mM und 0,8 mM variiert.

Taq-Polymerase

Zur Etablierung der bestmöglichen Taq-Polymerase wurden fünf verschiedene Polymerasen getestet. Dies waren Euro Taq (EuroClone), HotMaster Taq (5Prime), Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific), Biotaq (Biotaq) sowie Hot Start Taq II (Phire Hot Start II). War eine Amplifikation erfolgreich, wurde aus ökonomischen Gründen versucht, die Menge der Taq-Polymerase zu reduzieren.

Zusätze

Als Zusatz für die PCR-Ansätze wurden DMSO und BSA getestet. DMSO (Dimethylsulfoxid) wird zur Steigerung der Spezifität eingesetzt. Auch die Amplifikation von GC-reichen Sequenzen kann damit erleichtert werden (Mülhardt, 2009). Auch BSA (Bovine Serum Albumin) zeigt diese Effekte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich BSA an Inhibitoren binden kann und diese somit ihre Wirkung verlieren (Höss *et al.*, 1992).

Transfer des PCR-Protokolls

Die Loci aus zwei verschiedenen Veröffentlichungen (Crowhurst *et al.*, 2013; Huebinger *et al.*, 2002) wurden zunächst jeweils mit den dort vorgegebenen PCR-Bedingungen und Einstellungen für den Thermocycler getestet. Diese Protokolle wurden anschließend auch mit den Loci der jeweils anderen Veröffentlichung getestet.

Programm des Thermocyclers

Zur Verringerung von Stotterbanden wurde die finale Elongation bei den Loci 11HDZ073, 11HDZ443, 11HCZ626 und 11HCZ665 von zehn Minuten sowohl auf 30 Minuten als auch auf 45 Minuten verlängert. Zudem wurden bei den Loci aus Huebinger *et al.* die Anzahl der Zyklen von 35 auf 40 erhöht.

2.3.5 Optimierte PCR-Konditionen

Im Folgenden werden die optimierten PCR-Protokolle dargestellt, mit denen die zuverlässigste Amplifikation der Mikrosatelliten erreicht werden konnte (Tab. 2.3).

Die Loci aus Huebinger *et al.* 2002 wurden mit HotMaster Taq amplifiziert. Das Reaktionsvolumen betrug 15 μL für jeden PCR-Ansatz und wurde vor Zugabe der DNA in einem Premix hergestellt. Das Volumen der DNA betrug 0,6 μL und wurde auf 1,2 μL erhöht, wenn eine Probe ausgefallen war. Zur Amplifikation der Mikrosatelliten wurden für den Thermocycler 40 Zyklen gewählt. Die Elongation erfolgte bei dem Temperaturoptimum der HotMaster Taq bei 65 $^{\circ}\text{C}$.

Für die PCRs der Loci aus Crowhurst *et al.* 2013 wurde Euro Taq verwendet. Der Gesamtansatz von 15 μL für eine Reaktion setzte sich aus 1 μL DNA sowie 14 μL Premix zusammen. Die Amplifikation der Loci erfolgte bei einer Annealing-Temperatur von 72 $^{\circ}\text{C}$ über 40 Zyklen.

Tabelle 2.3 PCR-Protokoll für die Loci aus Huebinger *et al.* 2002 mit HotMaster Taq und für die Loci aus Crowhurst *et al.* 2013 mit Euro Taq. ²Nach Ausfall von Proben wurde das DNA-Volumen erhöht

Komponente	Konzentration	Huebinger <i>et al.</i> 2002		Crowhurst <i>et al.</i> 2013	
		Volumen [μ l]		Volumen [μ l]	
DNA		0,6	1,2 ²	1	
H ₂ O		8,8	8,2 ²	8,55	
Puffer	10 x	1,5		1,5	
MgCl ₂	50 mM	---		0,675	
dNTP	2 mM	1,5		1,2	
Primer untailed	10 pmol/ μ l	0,75		0,3	
Primer tailed	10 pmol/ μ l	0,2		0,075	
Primer M13-IRDye	10 pmol/ μ l	0,75		0,3	
HotMaster Taq	5 U/ μ l	0,15		---	
Euro Taq	5 U/ μ l	---		0,15	
BSA	10 mg/ml	0,75		0,75	
Gesamtvolumen		15		15	

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer	Zyklen	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 min	1	15 min	1
Denaturierung	95	30 sec		30 sec	
Annealing	Spezifisch für Primer (Tab. 2.2)	30 sec	40	45 sec	40
Elongation	65 ¹ 72 ²	30 sec		30 sec	
Finale Elongation	65 ¹ 72 ²	10 min	1	5 min	1

Die Amplifikation der Loci aus Carter *et al.* 2012 war auch nach mehrmaligen Versuchen nicht erfolgreich, sodass die Loci von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden.

2.3.6 Agarosegelelektrophorese

Eine Agarosegelelektrophorese wurde sowohl zur Erfolgskontrolle der DNA-Extraktionen, als auch zur Erfolgskontrolle der PCRs durchgeführt. Aus 4 g Agarose und 200 mL TBE-Puffer wurde ein 2 % Agarosegel hergestellt. Dies wurde vollständig mit 200 mL 1x TBE-Puffer bedeckt und die DNA-Proben in die Taschen pipettiert. Dazu wurde jeweils 3 μ L einer Probe mit 2 μ L Loading dye versetzt. Zusätzlich wurde 1 μ L eines Größenstandards aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 120 V mit einer Spannung von 2 A für eine Dauer von 30 Minuten.

Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, erfolgte eine Färbung des Agarosegels. Dazu wurde das Gel für eine Minute in ein Färbebad mit Ethidiumbromid gelegt und anschließend für drei Minuten in Reinstwasser entfärbt. Die DNA-Banden wurden mit einer Geldokumentationsanlage unter UV-Licht dokumentiert und das Bild schließlich mit dem Programm IRFAN VIEW (Vers. 4.27, IRFANSKILIAN 2010) bearbeitet.

2.3.7 Genotypisierung der Mikrosatelliten mittels LI-COR Analyzer

Um die PCR-Produkte zu genotypisieren, wurde mit dem LI-COR Analyzer 4300 eine hochauflösende Gelelektrophorese durchgeführt. Das Polyacrylamidgel wurde aus 20 mL einer 6,5 % Gelmatrix (KB+/LI-COR), 150 μ L des Radikalstarters 10 % APS (Ammoniumperoxidsulfat) und 15 μ L des Polymerisierungskatalysators TEMED (Tetramethyldiamin) hergestellt. Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstand von 0,25 mm gegossen. Nach etwa 90 Minuten war das Gel auspolymerisiert und wurde gemäß Herstellerangaben im LI-COR Analyzer aufgebaut. Um die Detektionsapparatur zu justieren, wurde mit dem Programm SAGA-Lite ein Vorprogramm durchlaufen (1500 V, 40 W, 40 mA, 45 °C, 25 min).

Da die PCR-Produkte auf den Bildern der Agarosegelelektrophorese meist keine sichtbaren Banden lieferten, wurden die Produkte zunächst unverdünnt aufgetragen. Dazu wurden je 1 μ L einer Probe mit 1 μ L LI-COR Blue Stop Solution versetzt und im Thermocycler bei 94 °C für sieben Minuten denaturiert. Um eine Renaturierung zu verhindern wurden die Proben während des Auftragens auf Eis gelagert.

Der Laser des LI-COR Analyzers detektiert die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte bei einer Wellenlänge des Lichtes von 700 nm und 800 nm. Um die Allelgrößen bestimmen zu können, wurde in vier Taschen des Gels ein Größenstandard mit aufgetragen. Dieser wurde zuvor aus zwei Teilen LI-COR Blue Stop Solution und jeweils einem Teil eines LI-COR Size Standard IRDye® 700 50-350 bp und LI-COR Size Standard IRDye® 800 50-350 bp hergestellt.

Die Proben sowie der Größenstandard wurden mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen pipettiert. Die Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte bei 1500 V, 40 W, 40 mA und 45 °C für eine Dauer von 90 Minuten.

Die Auswertung der Gelfotos erfolgte mit dem Programm SAGALITE (SAGA^{GT}, LI-COR) und wurde manuell korrigiert. Die Allele waren durch die Fluoreszenzmarkierung als Banden sichtbar. Mit Hilfe des Größenstandards konnte die Größe der Allele in Basenpaaren bestimmt werden.

2.4 Statistische Analysen zur Qualität der Mikrosatelliten

2.4.1 Allelfrequenzen und Variabilität der Mikrosatelliten

In der vorliegenden Arbeit wurden 17 Mikrosatelliten getestet, von denen sieben in die statistische Auswertung einbezogen wurden. Dies waren die Loci 11HDZ443, 11HDZ665, 11HDZ102, 11HDZ480, 11HDZ562, 11HDZ567 und 11HDZ1004 (Huebinger *et al.*, 2002). Alle 78 Individuen wurden mit den sieben Mikrosatelliten genotypisiert. Dazu wurden die Loci zunächst mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurde mit dem LI-COR Analyzer eine hochauflösende Gelelektrophorese durchgeführt, um die Fragmentgrößen der Allele zu bestimmen. Zur Untersuchung der genetischen Variabilität wurden für jeden Locus die Anzahl der verschiedenen Allele sowie ihre Allelfrequenz bestimmt. Außerdem wurden die innerhalb eines Locus vorkommenden Allelkombinationen für alle sieben Loci ermittelt. Schließlich wurde verglichen, ob sich die Unterarten in der Anzahl der Allele sowie der Anzahl der Allelkombinationen unterscheiden.

2.4.2 Überprüfung der Genotypisierung

Zur Detektion von Genotypisierungsfehlern wurden die Ergebnisse der Analyse mit dem LI-COR Analyzer mit dem Programm MICRO-CHECKER 2.23 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) geprüft. Häufige Genotypisierungsfehler sind Nullallele, also das Fehlen eines oder beider Allele, sowie ein Large Allel Dropout, bei dem das größere von zwei Allelen nicht detektiert wird. Stotterbanden sind unerwünschte Amplifikationsartefakte, die das Scoring der Allele erschweren können. Nach der Identifikation von Genotypisierungsfehlern im Datensatz konnten potentiell problematische Loci überprüft werden.

2.4.3 Test auf Hardy-Weinberg-Equilibrium und Linkage Disequilibrium

Um Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht festzustellen, wurde das Programm ARLEQUIN 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010) verwendet. Des Weiteren kann durch die Analyse des Linkage Disequilibrium festgestellt werden, ob Loci gemeinsam oder unabhängig voneinander vererbt werden. Für die Analysen wurden folgende Einstellungen gewählt:

Hardy Weinberg Equilibrium Test

No. of steps in Markov chain = 1.000.000

No. of Dememorisation steps = 100.000

Locus by locus

Linkage Disequilibrium Test

No. of permutations = 10000

No. of initial conditions for EM = 1

Significance level = 0,05

2.5 Statistische Analysen zur Differenzierung der Unterarten und zur Zuordnung der Tiere mit unbekanntem Unterartstatus

2.5.1 Untersuchungen zur Populationsdifferenzierung

Zur Berechnung der Populationsdifferenzierung der sechs bekannten Unterarten wurden F_{ST} -Werte berechnet. Sie geben Aufschluss über herrschenden Genfluss oder eine mögliche genetische Isolation Für die Analyse wurden folgende Einstellungen gewählt:

No. of permutations = 1000

Significance level = 0,05

Compute pairwise differences

Des Weiteren wurde eine Principal Component Analyse (PCA) durchgeführt. Mit einer PCA kann die Variabilität von Daten auf wenige Faktoren reduziert und diese graphisch dargestellt werden. Die Analyse erfolgte mit dem Programm PCA-GEN 1.2.1 (Goudet, 1999). Um die statistische Signifikanz der Achsen zu kalkulieren, wurden 10.000 Randomisierungen durchgeführt. Die Analyse erfolgte zum einen auf dem Niveau von Populationen, wobei sechs Populationen aus Tieren der sechs bekannten Unterarten bestanden. Die siebte Population fasste alle Tiere zusammen, deren Unterartstatus unbekannt war. Zum anderen erfolgte eine Analyse auf dem Niveau von Individuen, um die Zugehörigkeit der unbekanntem Tiere exakter darstellen zu können.

2.5.2 Zuordnung der Tiere unbekannter Unterart zu den bekannten Unterarten

Um die Tiere, deren Unterart nicht bekannt ist, den Unterarten zuordnen zu können, wurden die Programme STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) und TESS 2.3.1 (Chen *et al.*, 2007) angewandt. Beide Programme ermöglichen es, einzelne Individuen Populationen zuzuordnen, wobei verschiedene bayessche Algorithmen verwendet werden. Alle Analysen wurden mit beiden Programmen durchgeführt und anschließend verglichen. Um zu testen, ob sich die sechs bekannten Unterarten genetisch differenzieren lassen, wurde vorausgehend eine Berechnung mit 41 Tieren durchgeführt, bei denen die Daten für alle sieben Loci vollständig waren. Nachfolgend wurde die Berechnung für alle Proben,

einschließlich der unbekanntenen Tiere, durchgeführt. Dabei wurde von sieben Populationen ausgegangen, bestehend aus den sechs bekannten Unterarten *G. c. angolensis*, *G. c. antiquorum*, *G. c. giraffa*, *G. c. reticulata*, *G. c. rothschildi* und *G. c. tippelskirchi*, sowie einer Gruppe von Individuen unbekannter Unterart.

Analyse mit STRUCTURE

Zur Analyse der Daten wurden folgende Einstellungen ausgewählt:

Length of Burnin Period: 10.000	No. of iterations per K: 20
Number of MCMC Reps after Burnin: 10.000	K = 1 bis K = 12

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt, 2012) welches die Daten nach dem Evanno-Verfahren (Evanno *et al.*, 2005) korrigiert. Das Ergebnis zeigt die wahrscheinlichste Anzahl der Cluster innerhalb des gewählten Bereiches von $K = 1$ bis $K = 12$. Um die Genauigkeit der Clusteranalyse zu erhöhen, wurde die Berechnung mit STRUCTURE für das wahrscheinlichste K wiederholt. Dazu wurden folgende Einstellungen gewählt:

Length of Burnin Period: 100.000	No. of iterations per K: 100
Number of MCMC Reps after Burnin: 100.000	K = wahrscheinlichstes K

Nachfolgend wurden die Ergebnisse mit CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg, 2007) analysiert. Dieses Programm berechnet aus den 100 Wiederholungen der STRUCTURE Analyse einen Mittelwert. Zur Visualisierung der Daten wurden diese mit DISTRUCT 1.1 (Rosenberg, 2004) bearbeitet.

Analyse mit TESS

Um die Ergebnisse von STRUCTURE zu überprüfen, wurden alle Analysen mit TESS wiederholt. Für den ersten Durchlauf wurden 20 Wiederholungen für jedes K von $K = 2$ bis $K = 12$ gewählt. Die weiteren Einstellungen waren wie folgt:

Total Number of Sweeps: 50.000	Burn In Number of Sweeps: 10.000
--------------------------------	----------------------------------

Zur Ermittlung der wahrscheinlichsten Clusteranzahl K wurden die Ergebnisse nach dem DIC-Wert sortiert (Deviance Information Criterion). Der niedrigste Wert zeigt die wahrscheinlichste Anzahl der Cluster an. Für dieses K wurde ein zweiter Durchlauf mit 50 Wiederholungen und den folgenden Einstellungen wiederholt.

Total Number of Sweeps: 20.000

Burn In Number of Sweeps: 2.000

Die Herabsetzung der Parameter war nötig, um die Datenmengen mit CLUMPP 1.1.2 verarbeiten zu können. Dazu wurden zehn Wiederholungen mit den niedrigsten DIC-Werten ausgewählt und diese schließlich mit DISTRUCT 1.1 visualisiert.

2.6 Sequenzanalyse von Tieren unbekannter Unterart

2.6.1 Vorbereitung der Proben zum Sequenzieren

Um mehr Informationen über die Tiere zu gewinnen, deren Unterart unbekannt ist, wurden Sequenzanalysen durchgeführt. Es wurde der mitochondriale Marker D-loop in der Kontrollregion ausgewählt (Tab. 2.4), welcher bei Giraffen bereits erfolgreich etabliert wurde (Bock *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2007; Fennessy *et al.*, 2013; Hassanin *et al.*, 2007). Da mitochondriale Marker bei Giraffen nur in der maternalen Linie vererbt werden, wurden von 27 unbekanntem Tieren neun ausgewählt, bei denen die mütterliche Linie unbekannt ist (Vgl. Stammbäume der Tiere, Anhang 6.2, S. 95 ff.). Es handelte sich um die Proben GCU 3K, GCU 8K, GCU 9K, GCU 12K, GCU 13K, GCU 16K, GCU 18K, GCU 19B und GCU 20B. Bei den Proben GCU 19B und GCU 20B handelte es sich um Blutproben. Die übrigen sechs DNA-Proben wurden aus Kotproben extrahiert.

Tabelle. 2.4: Name, Sequenz, Fragmentgröße und Annealing-Temperatur der verwendeten Primer. F = Forward, R = Reverse

Primer	Sequenz (5'-3')	Fragmentgröße [bp]	T _a [°C]
D-loop HF	5'-CAT CGG ACA ACT AGC ATC TAT-3'	600	50
D-loop HR	5'-CCA GAT GTC TGA TAA AGT TCA-3'		

Als Template in der PCR wurden 2 µL DNA bei einem Reaktionsvolumen von 25 µL eingesetzt. Als Zusätze wurden jeweils BSA und DMSO getestet. Die Amplifikation erfolgte bei einer Annealing-Temperatur von 50 °C und über 40 Zyklen (Tab. 2.5).

Tabelle. 2.5: PCR-Protokoll für die Amplifikation der D-loop Region

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Volumen [μL]	
DNA		2	
H ₂ O		8,42	
Puffer	10 x	2,5	
dNTP	2 mM	8,25	
Primer forward	10 pmol/ μL	1,25	
Primer reverse	10 pmol/ μL	1,25	
HotMaster Taq	5 U/ μL	0,08	
BSA / DMSO	10 mg/mL	1,25	
Gesamtvolumen		25	

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	4 min	1
Denaturierung	94	1 min	40
Annealing	50	1 min	
Elongation	65	1 min	
Finale Elongation	65	5 min	1

Der Erfolg der PCR wurde anhand einer Gelelektrophorese überprüft. Erfolgreich amplifizierte Proben wurden für die Sequenzierung aufgereinigt. Dazu wurden zu 9 μL des PCR-Produktes 0,5 μL der Exonuclease Exo I (Fermentas) und 1 μL der thermosensitiven Alkalin-Phosphatase Fast-AP (Fermentas) pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde zunächst für die Dauer von 25 Minuten bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und anschließend für 15 Minuten bei 85 $^{\circ}\text{C}$ im Thermocycler inkubiert, um die Enzymaktivitäten zu gewährleisten. Schließlich wurden 5 μL einer Probe jeweils mit dem Forward- und dem Reverse-Primer (5 pmol/ μL) vermengt. Die Sequenzierung erfolgte über den Sequenzierservice der Biochemischen Abteilung der Ruhr-Universität Bochum (ND 6/166).

2.6.2 Rekonstruktion der phylogenetischen Stammbäume

Die sechs Chromatogramme der drei eingeschickten Proben wurden mit GENEIOUS 9.0.9 (Biomatters Limited) paarweise assembliert, danach editiert und jeweils eine Consensus Sequenz erstellt. Diese wurden zunächst gegen das Mitogenom von *Giraffa camelopardalis* mit einer Sequenzlänge von 16.433 bp aligniert. Die Consensus Sequenzen lag mit einer Länge von 679 bis 690 bp nicht nur im Bereich des D-loop, sondern deckten auch das tRNA-Tyr Gen sowie einen Teil des Cytochrom B Gens ab. Da nur der D-loop untersucht werden sollte, wurden die Consensus Sequenzen auf eine Länge von 416 bp im D-loop

editiert. Diese wurden zunächst in der NCBI-Datenbank über BLAST mit allen Referenzen abgeglichen. Anschließend wurden für jede dort hinterlegte Unterart fünf Sequenzen ausgewählt und in GENEIOUS eingelesen. Als Außengruppe wurde eine Sequenz vom Okapi *Okapia johnstoni* ausgewählt. Aus den Referenzen, der Außengruppe sowie den Sequenzen wurde ein MUSCLE-Alignment mit den voreingestellten Optionen und 8 Iterationen erstellt. Anhand des Alignments konnte ein genetischer Stammbaum generiert werden. Dies erfolgte mit dem Neighbor-Joining-Algorithmus nach dem Jukes-Cantor-Model mit 5000 Bootstraps.

Aufgrund der Ergebnisse von BLAST, bei der die Unterart *G. c. reticulata* eine 100 % Übereinstimmung zeigte sowie der Gruppierung der Tiere bei *G. c. rothschildi* im phylogenetischen Stammbaum, wurden anschließend alle Referenzen dieser Unterarten aus der NCBI-Datenbank extrahiert und in GENEIOUS erneut ein Neighbor-Joining-Tree erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Herkunft und Art des Probenmaterials

In ganz Europa wurden 36 Zoos gebeten, insgesamt 118 Proben von Giraffen zur genotypischen Untersuchung zu versenden. Davon waren 29 Zoos Halter von Giraffen unbekannter Unterart. Darüber hinaus wurden sieben Institutionen ausgewählt, um weitere Referenzproben für die einzelnen Unterarten zu beproben. Von den 36 Zoos haben 25 Zoos Proben zurück geschickt, was einer Rücklaufquote von 69,4 % entspricht. Zudem wurden fünf Giraffen aus der Zoom Erlebniswelt Gelsenkirchen zur Etablierung der Methode beprobt.

Die Bestandsliste, anhand derer die Tiere ausgewählt worden waren, wurde im September 2014 im Zuchtbuch der Giraffen veröffentlicht. (Jebram, 2014). Seitdem wurden vier der gelisteten Tiere in andere Zoos transferiert und konnten nicht mehr beprobt werden. Darüber hinaus waren sieben Tiere verstorben und es wurde kein Probenmaterial konserviert. Somit musste die Anzahl verfügbarer Proben von 118 auf 107 korrigiert werden. Insgesamt konnten 78 Tiere beprobt werden (Tab. 3.1), von denen 27 Tiere einen unbekanntem Unterartstatus hatten. Ausgehend von den einzelnen und tatsächlich verfügbaren Proben betrug die Rücklaufquote dieser Studie 72,9 %.

Verschiedene biologische Materialien wurden von den Institutionen zur Verfügung gestellt (Tab. 3.1). Von 73 Giraffen konnten Kotproben gesammelt werden. Von 30 dieser Giraffen wurden zusätzlich Abstriche der Maulschleimhaut und von drei Giraffen zusätzlich Blutproben zur Verfügung gestellt. Von einem Tier war ausschließlich eine Blutprobe verfügbar. Zudem konnten von zwei bereits verstorbenen Giraffen Blut- und Gewebeproben, von zwei weiteren verstorbenen Tieren ausschließlich Gewebeproben bereitgestellt werden. Drei Gewebeproben bestanden aus Haut und Muskelgewebe, eine Probe wurde von der Leber entnommen.

Die Giraffen aus den Zoos Gelsenkirchen, Duisburg sowie Dortmund wurden persönlich beprobt. Die übrigen 23 Institutionen haben die Proben über den Postweg verschickt, was zwischen drei bis sieben Tage dauerte. Der Versand der Probe aus Montpellier dauerte aufgrund des Poststreiks vier Wochen.

Tabelle 3.1: Zuchtbuchnummer, Geschlecht und Herkunft aller Proben. Art des Probenmaterials: B = Blut, G = Gewebe, K = Kot, S = Speichel. Grau unterlegte Proben waren verfügbar, sind jedoch nicht extrahiert worden. Geschlecht: M = Male, F = Female, contF = contracepted Female (chemische Verhütung); † Tier verstorben

Unterart	Probenbezeichnung	Gewebe	Geschlecht	Zuchtbuchnummer	Institution und Herkunftsland	
<i>G. c. angolensis</i>	GCA 01 B	B	K	M	8-4535	Zoo Dortmund, Deutschland
<i>G. c. angolensis</i>	GCA 02 K		K S	M	8-3960	Zoo Dortmund, Deutschland
<i>G. c. angolensis</i>	GCA 03 K		K S	F	8-2862	Zoo Dortmund, Deutschland
<i>G. c. angolensis</i>	GCA 04 K		K S	F	8-2735	Zoo Dortmund, Deutschland
<i>G. c. angolensis</i>	GCA 05 K		K	F	8-1948	Jardim Zoologico de Lisboa, Portugal
<i>G. c. angolensis</i>	GCA 06 K		K	M	8-2965	Jardim Zoologico de Lisboa, Portugal
<i>G. c. angolensis</i>	GCA 07 K		K	F	8-3259	Jardim Zoologico de Lisboa, Portugal
<i>G. c. angolensis</i>	GCA 08 K		K	F	8-3519	Jardim Zoologico de Lisboa, Portugal
<i>G. c. angolensis</i>	GCA 09 K		K	F	8-3744	Jardim Zoologico de Lisboa, Portugal
<i>G. c. angolensis</i>	GCA 10 K		K	M	8-4208	Jardim Zoologico de Lisboa, Portugal
<i>G. c. angolensis</i>	GCA 11 K		K	F	8-4339	Jardim Zoologico de Lisboa, Portugal
<i>G. c. angolensis</i>	GCA 12 K		K		?	Jardim Zoologico de Lisboa, Portugal
<i>G. c. antiquorum</i>	GCQ 01 K		K	F	1-2763	Zoo De La Barben, Frankreich
<i>G. c. antiquorum</i>	GCQ 02 K		K S	F	1-3367	Zoo De La Barben, Frankreich
<i>G. c. antiquorum</i>	GCQ 03 K		K S	F	2-4360	Zoo De La Barben, Frankreich
<i>G. c. antiquorum</i>	GCQ 04 K		K S	M	2-4521	Zoo De La Barben, Frankreich
<i>G. c. antiquorum</i>	GCQ 05 K		K	F	*-3454	Zoo de la Flèche, Frankreich
<i>G. c. antiquorum</i>	GCQ 06 K		K	F	*-3540	Zoo de la Flèche, Frankreich
<i>G. c. antiquorum</i>	GCQ 07 K		K	F	2-4396	Zoo de la Flèche, Frankreich
<i>G. c. antiquorum</i>	GCQ 08 B	B	K	M	2-4344	Parc Zoologique et Paysager du Reynou, Frankreich
<i>G. c. antiquorum</i>	GCQ 09 K		K	M	2-4583	Parc Zoologique et Paysager du Reynou, Frankreich
<i>G. c. giraffa</i>	GCG 01 K		K	F	9-3467	Planète Sauvage, Frankreich
<i>G. c. giraffa</i>	GCG 02 K		K	M	9-3650	Planète Sauvage, Frankreich
<i>G. c. giraffa</i>	GCG 03 K		K	F	9-4035	Planète Sauvage, Frankreich
<i>G. c. giraffa</i>	GCG 04 K		K	F	?	Moscow Zoological Park, Russische Föderation

Unterart	Proben- bezeichnung	Gewebe	Geschlecht	Zuchtbuch- nummer	Herkunft
<i>G. c. reticulata</i>	GCE 01 G	G	F †	4-2891	Zoo Duisburg, Deutschland
<i>G. c. reticulata</i>	GCE 02 K	K	M	4-2984	Zoo Duisburg, Deutschland
<i>G. c. reticulata</i>	GCE 03 K	K	F	4-3009	Zoo Duisburg, Deutschland
<i>G. c. reticulata</i>	GCE 04 K	K	M	4-4532	Zoo Duisburg, Deutschland
<i>G. c. reticulata</i>	GCE 05 K	K	F	4-4716	Zoo Duisburg, Deutschland
<i>G. c. reticulata</i>	GCE 06 K	K	M	4-4248	Bioparco di Roma, Italien
<i>G. c. reticulata</i>	GCE 07 K	K S	M	4-2916	Zoo Osnabrück, Deutschland
<i>G. c. reticulata</i>	GCE 08 K	K S	F	4-2948	Zoo Osnabrück, Deutschland
<i>G. c. reticulata</i>	GCE 09 K	K S	F	4-4185	Zoo Osnabrück, Deutschland
<i>G. c. reticulata</i>	GCE 10 K	K S	M	4-4782	Zoo Osnabrück, Deutschland
<i>G. c. reticulata</i>	GCE 11 K	K S	M	4-4511	Zoo Osnabrück, Deutschland
<i>G. c. reticulata</i>	GCE 12 B	B	M	4-3434	Dierenpark Amersfoort
<i>G. c. rothschildi</i>	GCR 21 K	K S	M	5-1888	Zoom Erlebniswelt Gelsenkirchen, Deutschland
<i>G. c. rothschildi</i>	GCR 22 B	B K S	M	5-3511	Zoom Erlebniswelt Gelsenkirchen, Deutschland
<i>G. c. rothschildi</i>	GCR 23 K	K S	M	5-4501	Zoom Erlebniswelt Gelsenkirchen, Deutschland
<i>G. c. rothschildi</i>	GCR 24 K	K	F	5-2991	Zoom Erlebniswelt Gelsenkirchen, Deutschland
<i>G. c. rothschildi</i>	GCR 25 K	K S	F	5-2292	Zoom Erlebniswelt Gelsenkirchen, Deutschland
<i>G. c. rothschildi</i>	GCR 26 K	K	M	5-4025	Dierenpark Amersfoort, Niederlande
<i>G. c. rothschildi</i>	GCR 27 K	K	M	5-4231	Dierenpark Amersfoort, Niederlande
<i>G. c. rothschildi</i>	GCR 28 K	K	M	5-4409	Dierenpark Amersfoort, Niederlande
<i>G. c. rothschildi</i>	GCR 29 K	K	M	5-3128	Ree Park - Ebeltoft Safari, Dänemark
<i>G. c. rothschildi</i>	GCR 30 K	K	F	5-3990	Ree Park - Ebeltoft Safari, Dänemark
<i>G. c. rothschildi</i>	GCR 31 K	K S	M	5-3745	Parc Zoologique de Pont-Scorff, Frankreich
<i>G. c. rothschildi</i>	GCR 32 K	K	M	5-3867	Parc Zoologique et Paysager du Reynou, Frankreich
<i>G. c. rothschildi</i>	GCR 33 K	K	M	5-4459	Parc Zoologique et Paysager du Reynou, Frankreich
<i>G. c. tippelskirchi</i>	GCT 01 G	G	F †	6-3635	Zoo of Antwerp, Niederlande

Unterart	Proben- bezeichnung	Gewebe	Geschlecht	Zuchtbuch- nummer	Herkunft
unbekannt	GCU 01 K	K S	M	0-3667	Cotswold Wildlife Park and Gardens, Großbritannien
unbekannt	GCU 02 K	K S	M	0-3406	Lietuvos Zoologijos Sodas, Litauen
unbekannt	GCU 03 K	K S	contF	0-2831	Château et Parc Zoologique de La Bourbansais, Frankreich
unbekannt	GCU 04 K	K S	M	0-3564	Rigas Zoologiskais Darzs, Lettland
unbekannt	GCU 05 K	K S	M	0-3265	Rigas Zoologiskais Darzs, Lettland
unbekannt	GCU 06 K	K S	M	0-3631	Rigas Zoologiskais Darzs, Lettland
unbekannt	GCU 07 K	K S	F	0-2772	Zlin-Lesna Zoological Garden and Chateau, Tschechien
unbekannt	GCU 08 K	K S	M	0-3786	Parco Zoo di Falconara, Italien
unbekannt	GCU 09 K	K S	M	0-3881	Parc Zoologique de Lunaret, Frankreich
unbekannt	GCU 10 K	K	F	0-3396	Bioparco di Roma, Italien
unbekannt	GCU 11 K	K	F	0-4177	Bioparco di Roma, Italien
unbekannt	GCU 12 K	K	F	0-3832	Kristiansand Zoo, Norwegen
unbekannt	GCU 13 K	K	F	0-4175	Monde Sauvage Safari Parc, Belgien
unbekannt	GCU 14 K	K S	F	0-2937	Tiergarten Schönbrunn, Österreich
unbekannt	GCU 15 K	K S	F	0-3506	Tiergarten Schönbrunn, Österreich
unbekannt	GCU 16 K	K S	F	0-4450	Zoo Osnabrück, Deutschland
unbekannt	GCU 17 K	K	contF	0-3257	Zoo de la Flèche, Frankreich
unbekannt	GCU 18 K	K	M	0-3880	Dierenpark Amersfoort, Niederlande
unbekannt	GCU 19 B	B G	F †	0-2919	Ree Park - Ebeltoft Safari, Dänemark
unbekannt	GCU 20 B	B G	F †	0-2976	Ree Park - Ebeltoft Safari, Dänemark
unbekannt	GCU 21 K	K	F	0-3405	Ree Park - Ebeltoft Safari, Dänemark
unbekannt	GCU 22 K	K	F	0-3685	Zoo of Antwerp, Niederlande
unbekannt	GCU 23 K	K S	M	0-3111	Parc Zoologique de Pont-Scorff, Frankreich
unbekannt	GCU 24 K	K	F	0-3261	Zoo de Bordeaux-Pessac, Frankreich
unbekannt	GCU 25 K	K	F	0-3642	Zoo de Bordeaux-Pessac, Frankreich
unbekannt	GCU 26 K	K	F	0-3657	Zoo de Bordeaux-Pessac, Frankreich
unbekannt	GCU 27 K	K S	M	0-2486	Moscow Zoological Park, Russische Föderation

3.2 Labormethoden

3.2.1 Auswahl des biologischen Materials und Etablierung der DNA Extraktion

Zur Etablierung einer geeigneten Beprobungsmethode wurden zu Beginn der Studie verschiedene, nichtinvasive Methoden getestet. Dies geschah, um zu gewährleisten, dass das von den Institutionen verschickte Untersuchungsmaterial uneingeschränkt für die Studie verwendet werden konnte. Zu diesem Zweck wurden fünf Tiere aus der Zoom Erlebniswelt Gelsenkirchen beprobt. Als Untersuchungsmaterial wurden Haare, flüssiger Speichel, Abstriche der Maulschleimhaut sowie Kot ausgewählt. Zudem konnten die Ergebnisse dieser Extraktionen mit einer Blut- und einer Gewebeprobe verglichen und verifiziert werden.

Extraktion von DNA aus Haaren mit und ohne Haarwurzel

Die DNA-Extraktion aus Haaren mit Haarwurzel war mit dem speziell für Haare modifizierten Protokoll für das DNeasy® Blood & Tissue Kit nicht erfolgreich. Die Extraktion mit DNAzol®, bei der sowohl Haare mit als auch ohne Haarwurzel verwendet wurden, konnte erfolgreich durchgeführt werden. Aufgrund der schwierigen Beprobungsmethode und den mäßigen Ergebnissen wurde dieses Probenmaterial jedoch nicht in die Studie einbezogen.

Extraktion von DNA aus flüssigem Speichel und Abstrichen der Maulschleimhaut

Die Extraktion der DNA aus flüssigem Speichel sowie aus den Abstrichen der Maulschleimhaut konnte erfolgreich durchgeführt werden. Daher wurden Speichelproben als mögliches Untersuchungsmaterial eingeschlossen. Da die Entnahme von flüssigem Speichel allerdings sehr schwierig ist, wurde der Fokus hier auf die Maulschleimhautabstriche gelegt.

Extraktion von DNA aus Blut- und Gewebeproben

In der Zoom Erlebniswelt Gelsenkirchen konnte bei einer Giraffe mit Hilfe einer Raubwanze eine Blutprobe entnommen werden. Der Zoo in Duisburg stellte eine Gewebeprobe von einem bereits verstorbenen Tier zur Verfügung. Aus beiden Proben konnte erfolgreich DNA extrahiert werden.

Extraktion von DNA aus einer Raubwanze

Die Wanze, welche zur Blutentnahme an einer Giraffe genutzt wurden, konnte ebenfalls zur Verfügung gestellt werden. Die DNA-Extraktion aus dem Gewebe der Wanze war erfolgreich.

Extraktion von DNA aus Kotproben

Zur Etablierung einer geeigneten Methode wurden drei verschiedene Extraktionsmethoden getestet. Alle drei Methoden waren erfolgreich und lieferten Ergebnisse bei der Genotypisierung mit dem LI-COR Analyzer (siehe 3.2.2). Jedoch zeigten sich Unterschiede in der Stärke und Klarheit der Banden. Die besten Ergebnisse lieferte das AquaGenomic™ Kit, welches anschließend standardmäßig zur Extraktion von Kotproben eingesetzt wurde.

Evaluation des Probenmaterials und der Extraktionsmethoden

Verschiedene Untersuchungsmaterialien wurden im Hinblick auf die Durchführbarkeit der Beprobung und die Erfolge bei der DNA-Extraktion evaluiert. Primär wurden Faeces als Untersuchungsmaterial ausgewählt. Sie erwiesen sich als optimal zur Beprobung und das AquaGenomic™ Kit (MoBiTec) erzielte die besten Resultate bei der Extraktion. Die Beprobung der Maulschleimhautabstriche waren nach den Kotproben am einfachsten. Die Extraktion mit DNAzol® (Molecular Research Center) lieferte gute Ergebnisse. Schwierig war die Gewinnung von Blut- und Gewebeproben, wobei diese Proben bei der Extraktion mit dem DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen) allerdings die besten Resultate lieferten. Flüssige Speichelproben und Haare wurden aufgrund der schwierigen Beprobung sowie der mäßigen Erfolge bei der Extraktion als Untersuchungsmaterial ausgeschlossen.

3.2.2 Extraktion des Probenmaterials

Von 78 Tieren standen aufgrund von Mehrfachbeprobungen insgesamt 113 Proben zur Verfügung. Aus Kostengründen wurde jedoch nicht das vollständige Material verwendet. Waren von einem Tier mehrere Proben aus verschiedenen Materialien vorhanden, so wurde für die Extraktion zunächst die Probe gewählt, von welcher die höchste DNA-Qualität zu erwarten war. Demnach wurden Blut- und Gewebeproben den Kotproben bevorzugt und diese wiederum den Maulschleimhautabstrichen.

Von 73 Kotproben wurden 71 Proben für die DNA-Extraktion ausgewählt (Tab. 3.1), wobei die Extraktion bei allen Proben erfolgreich war. Von den zwei übrigen Tieren standen auch Blutproben zur Verfügung, die aufgrund der höheren zu erwartenden DNA-Qualität den

Kotproben vorgezogen wurden. Von sieben Tieren wurden zusätzlich zu den Kotproben auch Speichelproben extrahiert, da die Kotproben nicht zuverlässig amplifiziert werden konnten. Aus diesen sieben Proben konnte bei den vier Proben GCR 31S, GCU 1S, GCU 8S und GCU 14S erfolgreich DNA gewonnen werden. Die Extraktion der Speichelproben GCQ 3S, GCQ 4S sowie GCU 16S war nicht erfolgreich.

Die Kotproben aus den Institutionen in Gelsenkirchen (GCR 21K – GCR 26K), Duisburg (GCE 2K – GCE 5K) und Dortmund (GCA 2K – GCA 4K) wurden persönlich abgeholt und innerhalb von 24 Stunden nach dem Sammeln extrahiert. Diese Proben zeigten sehr starke Banden auf dem LI-COR Analyzer, was auf einen hohen DNA-Gehalt hindeutet. Die übrigen Proben wurden über den Postweg versandt und unmittelbar nach ihrem Eintreffen extrahiert. Durch den Versand war die Zeitspanne zwischen dem Sammeln und Extrahieren mit etwa fünf bis sieben Tagen und etwa 28 Tagen für die Probe aus Montpellier (GCU 9K) deutlich länger. Die Banden auf dem LI-COR Analyzer waren für diese Proben schwächer.

Die Extraktion der fünf Blutproben sowie der vier Gewebeproben war erfolgreich. Drei Blutproben konnten bei lebenden Tieren entnommen werden. Zwei weitere Proben stammen von verstorbenen Tieren und konnten unmittelbar nach ihrem Tod gewonnen werden.

3.2.3 Amplifikation der DNA und Genotypisierung mit dem LI-COR Analyzer

Im Rahmen dieser Studie wurden 17 verschiedene Mikrosatelliten getestet. Dies waren die Loci 11HDZ073, 11HDZ102, 11HDZ443, 11HDZ480, 11HDZ550, 11HDZ562, 11HDZ567, 11HDZ626, 11HDZ665 und 11HDZ1004 (Huebinger *et al.*, 2002), Gica 9976, Gica 16160, Gica 10894, Gica 9905 und Gica 14170 (Crowhurst *et al.*, 2013) sowie Gca_21 und Gca_22 (Carter *et al.*, 2012). Die erfolgreiche Amplifikation gelang für die Loci 11HDZ102, 11HDZ443, 11HDZ480, 11HDZ550, 11HDZ562, 11HDZ567, 11HDZ626, 11HDZ665 und 11HDZ1004 sowie für Gica 16160, Gica 10894, Gica 9905 und Gica 14170. Für alle Loci wurden die PCR-Bedingungen mehrfach und systematisch variiert. Dennoch wurden die Loci 11HDZ550, Gica 16160, Gica 10894, Gica 9905 und Gica 14170 so unzuverlässig amplifiziert, dass diese für die Analysen ausgeschlossen wurden. Der Locus 11HDZ626 erzielte zwar zuverlässig Ergebnisse, jedoch traten bei allen Proben Stotterbanden auf. Diese waren so stark, dass selbst bei den Blut- und Gewebeproben keine Allele definiert werden konnten. Daher wurde dieser Locus bei der Auswertung ebenfalls nicht berücksichtigt. Die Loci 11HDZ073, Gica 9976, Gca_21 und Gca_22 lieferten auch nach der Optimierung der Protokolle keine sichtbaren Banden auf dem LI-COR Analyzer.

3.3 Untersuchungen zur Qualität der Mikrosatelliten

3.3.1 Frequenzen der Allele und Variabilität der Mikrosatelliten

Bei sieben der 17 getesteten Loci konnten Allele amplifiziert und Genotypen bestimmt werden. Diese Loci wurden somit in die statistischen Analysen einbezogen. Dies waren die Loci 11HDZ443, 11HDZ665, 11HDZ102, 11HDZ480, 11HDZ562, 11HDZ567 sowie 11HDZ1004. Für jeden Locus wurde die Anzahl der Allele ermittelt (Abb. 3.1). Die höchste Variabilität wiesen die Loci 11HDZ665 und 11HDZ562 mit 12 Allelen auf. Der Locus 11HDZ102 hatte mit vier Allelen die geringste Anzahl. Auch die Allelkombinationen von zwei Allelen eines Genotyps sind Hinweise auf die Variabilität eines Locus. Besonders variabel war der Locus 11HDZ665 mit 30 und der Locus 11HDZ562 mit 26 verschiedenen Allelkombinationen. Der Locus mit der geringsten Variabilität war mit 5 Allelkombinationen der Locus 11HDZ102 (Abb. 3.1).

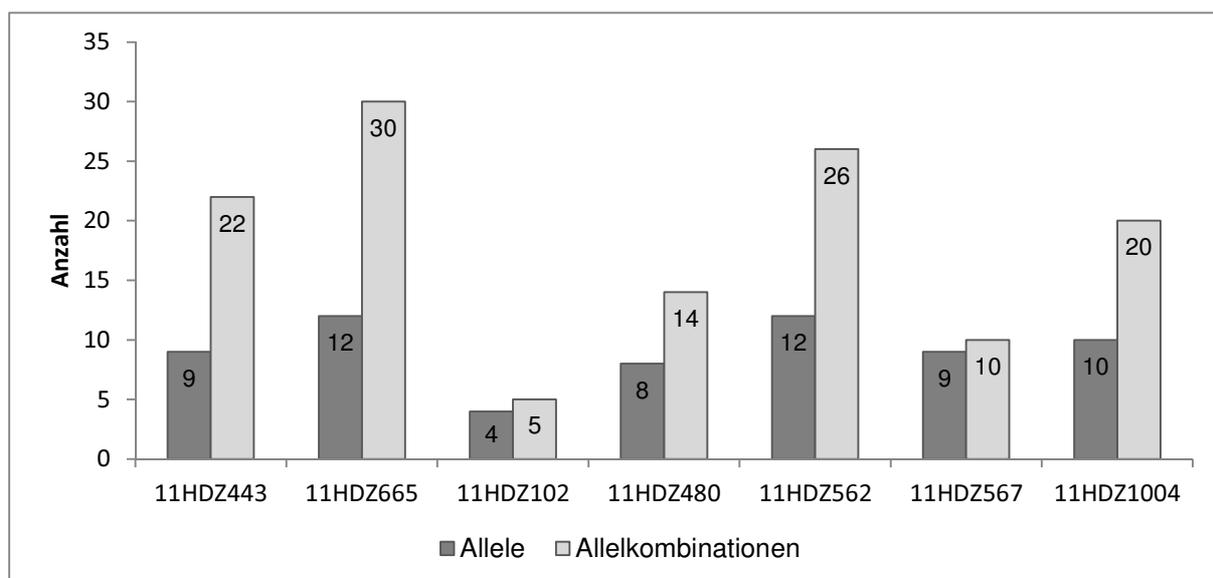


Abbildung 3.1: Anzahl der Allele und der verschiedenen Allelkombinationen der sieben Mikrosatellitenloci

Auch die Allelfrequenz wurde für alle Allele der sieben Loci ermittelt (Abb. 3.2). Der Locus 11HDZ102 erwies sich als wenig variabel, da ein Allel mit einer Frequenz von 0,7500 vertreten war. Auch der Locus 11HDZ567 hat ein mit einer Frequenz von 0,6507 sehr häufig vorkommendes Allel. Die übrigen Loci zeigten eine stärkere Variabilität.

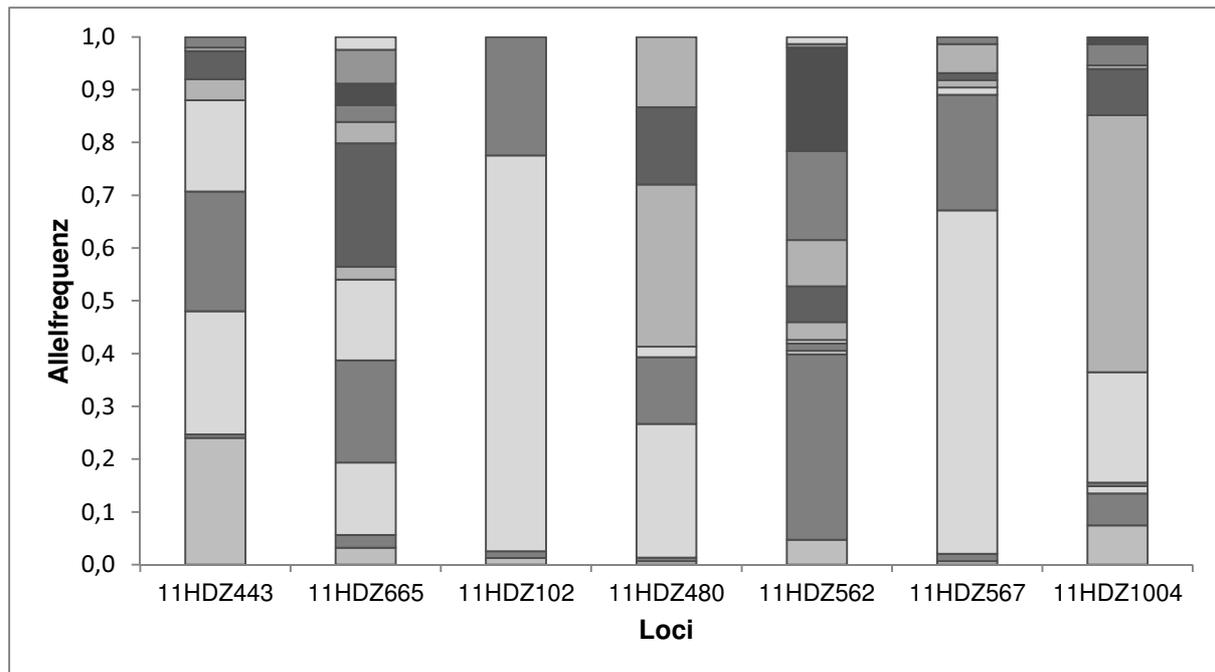


Abbildung 3.2: Allelfrequenzen verschiedener Allele bei den sieben Loci. Unterschiedliche Graustufen grenzen verschiedene Allele gegeneinander ab

Die Qualität der Mikrosatelliten-Marker wurde außerdem zwischen den einzelnen Unterarten verglichen. Für die sechs Unterarten *G. c. angolensis*, *G. c. antiquorum*, *G. c. giraffa*, *G. c. reticulata*, *G. c. rothschildi* sowie *G. c. tippelskirchi* wurden jeweils die Anzahl der Allele und die Anzahl der Allelkombinationen bestimmt (Abb. 3.3). Bei der Beurteilung der Variabilität muss jedoch die Anzahl der genotypisierten Individuen berücksichtigt werden. Die höchste Variabilität wiesen die Unterarten *G. c. reticulata* (zwölf Individuen) mit zwölf Allelen und 43 verschiedenen Allelkombinationen sowie *G. c. rothschildi* (13 Individuen) mit 25 Allelen und 36 Allelkombinationen auf. Die Unterarten *G. c. angolensis* (zwölf Individuen), *G. c. antiquorum* (neun Individuen) sowie *G. c. giraffa* (vier Individuen) zeigten eine mäßige Variabilität. Von der Unterart *G. c. tippelskirchi* wurde nur ein Individuum genotypisiert, sodass über die Variabilität innerhalb der Unterart keine Aussage gemacht werden kann.

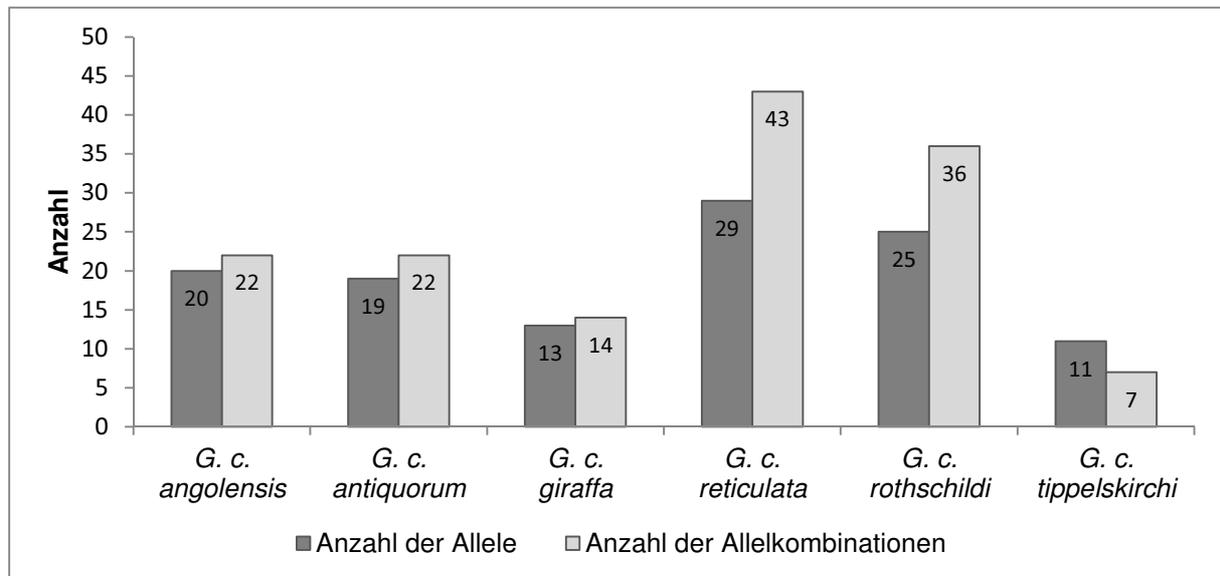


Abbildung 3.3: Anzahl der Allele und der Allelkombinationen aller Loci für die sechs bekannten Unterarten. Pro Unterart wurden verschieden viele Individuen analysiert: *G. c. angolensis* = 12, *G. c. antiquorum* = 9, *G. c. giraffa* = 4, *G. c. reticulata* = 12, *G. c. rothschildi* = 13, *G. c. tippelskirchi* = 1

Des Weiteren wurden die Fragmentgrößen der Allele der sechs Unterarten für alle Loci betrachtet (Tab. 3.2). Dabei wiesen die Loci 11HDZ665, 11HDZ562 mit einem Bereich von 50 bp und der Locus 11HDZ567 mit einem Bereich von 52 bp den größten Umfang auf. Dennoch überschneiden sich die Bereiche der Allele aller sechs Unterarten meist. Dies konnte an allen Loci beobachtet werden. Nur selten ist eine klare Trennung der Bereiche erkennbar, wie beispielsweise für *G. c. giraffa* und *G. c. tippelskirchi* am Locus 11HDZ567.

Tabelle 3.2: Allelgrößen der Allele aller Loci für die sechs bekannten Unterarten sowie Anzahl der genotypisierten Individuen

Unterart und Anzahl der Individuen	Anzahl der Allele pro Locus						
	11HDZ 443	11HDZ 665	11HDZ 102	11HDZ 480	11HDZ 562	11HDZ 567	11HDZ 1004
<i>G. c. angolensis</i>	156	216	214	135	151	202	170
12	158	230	216	137	155		178
		232		139	161		180
		236			163		
		238			165		
<i>G. c. antiquorum</i>	148	226	200	151	145	190	176
9	158	232	202	153	149	202	178
	160	236	214		193	228	
			216				
<i>G. c. giraffa</i>	156	232	216	133	159	198	162
4	168			137	163	202	178
							190
<i>G. c. reticulata</i>	148	216	214	137	145	202	162
12	156	218		139	155	212	178
	158	222		147	157	232	180
	160	226		149	159	234	
	162	228		151	161		
		238			163		
		240					
<i>G. c. rothschildi</i>	148	222	214	137	143	202	168
13	156	226		149	145	212	176
	158	228		151	161		178
	160	232		153	163		
	164	238					
		240					
		266					
<i>G. c. tippelskirchi</i>	162	216	214	137	159	226	162
1	164	234			161	242	176
Range	148-168	216-266	200-216	133-153	143-193	190-242	162-190
Range [bp]	20	50	16	20	50	52	28

3.3.2 Auswertung der Genotypisierung

Die Qualität der Mikrosatelliten-Marker wurde anhand verschiedener Aspekte untersucht. Für die Analysen wurden 51 Individuen der sechs bekannten Unterarten untersucht. Die Unterarten wurden als eigenständige Populationen definiert. Die Proben der unbekannteren Tiere waren nicht Teil dieser Analysen, da ihre Zugehörigkeit zu den Unterarten nicht bekannt war. Auch über mögliche Hybridisierungen zwischen verschiedenen Unterarten lagen keine Informationen vor, wodurch die Qualität der Marker nicht mehr unterartenspezifisch hätte erfolgen können.

Zur Überprüfung der Genotypisierung wurden die Daten mit MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004) analysiert (Tab. 3.3). Innerhalb der Population *G. c. angolensis* wiesen die Loci 11HDZ665 und 11HDZ480 Nullallele und Homozygoten Exzess auf. Zudem zeigte der Locus 11HDZ480 mögliche Scoringfehler durch Stotterbanden. In der Population *G. c. antiquorum* gibt es Hinweise auf Nullallele sowie Homozygoten Exzess bei den Loci 11HDZ443, 11HDZ665 und 11HDZ102. Bei der Unterart *G. c. giraffa* konnten keine Scoringfehler detektiert werden. Nullallele und Homozygoten Exzess traten jedoch auch bei der Population *G. c. reticulata* bei den Loci 11HDZ480 und 11HDZ567 sowie bei *G. c. rothschildi* ebenfalls bei dem Locus 11HDZ567 auf. Die Unterart *G. c. tippelskirchi* wurde von der Analyse ausgeschlossen, da es sich nur um eine einzige Probe handelt. Ein Large Allel Dropout konnte bei keinem Locus festgestellt werden. Die Loci 11HDZ562 und 11HDZ1004 wiesen bei keiner Unterart Scoringfehler auf.

Tabelle 3.3: Übersicht der Genotypisierungsfehler. Hinweise auf Scoringfehler durch Stotterbanden, Large Allel Dropout, Nullallele und Homozygoten Exzess sind mit „+“ dargestellt. Untersucht wurden alle Loci in den Populationen A *G. c. angolensis* B *G. c. antiquorum* C *G. c. giraffa* D *G. c. reticulata* E *G. c. rothschildi*

Locus	Scoringfehler durch Stotterbanden	Large Allel Dropout	Nullallele	Homozygoten Exzess
11HDZ443	-	-	+ B	+ B
11HDZ665	-	-	+ A B	+ A B
11HDZ102	-	-	+ B	+ B
11HDZ480	+ A	-	+ A D	+ A D
11HDZ562	-	-	-	-
11HDZ567	-	-	+ D E	+ D E
11HDZ1004	-	-	-	-

3.3.3 Untersuchung des Hardy-Weinberg-Equilibriums und des Linkage Disequilibriums

Der Test des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes (HWE) wurde für fünf bekannte Unterarten durchgeführt (Tab. 3.4). Ausgenommen war die Unterart *G. c. tippelskirchi*, da nur eine Probe vorlag. Die Analyse der Loci erfolgte jeweils innerhalb einer Population. Da die Loci 11HDZ665 bei der Population *G. c. giraffa*, 11HDZ102 bei *G. c. giraffa*, *G. c. reticulata* sowie *G. c. rothschildi* und 11HDZ567 bei *G. c. angolensis* monomorph waren, wurde hier keine Analyse durchgeführt. Das Signifikanzlevel wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Signifikante Abweichungen vom HWE wiesen innerhalb von *G. c. angolensis* die Loci 11HDZ443, 11HDZ102, 11HDZ480 und 11HDZ1004 auf. Bei der Unterart *G. c. antiquorum* konnte eine Abweichung bei den Loci 11HDZ443, 11HDZ665 und 11HDZ102 festgestellt werden. Die Population *G. c. giraffa* zeigte keine Abweichungen. Die Population *G. c. reticulata* wich am Locus 11HDZ567 signifikant vom HWE ab. Für die Unterart *G. c. rothschildi* wurde dies für die Loci 11HDZ480 sowie 11HDZ567 festgestellt. Alle Abweichungen vom HWE bestanden in einem Heterozygotiedefizit.

Tabelle 3.4: Test des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes. Beobachtete und erwartete Heterozygotie für jeden Locus von fünf bekannten Unterarten; „-“ keine Auswertung, da Locus monomorph ist; Signifikanzlevel $p < 0,05$; Signifikante Werte sind fett dargestellt

Locus	Genotypen	Beobachtete Heterozygotie	Erwartete Heterozygotie	P-Wert
<i>G. c. angolensis</i>				
11HDZ443	12	0,41667	0,45290	1,00000
11HDZ665	9	0,22222	0,61438	0,00266
11HDZ102	12	0,00000	0,15942	0,04363
11HDZ480	11	0,18182	0,54113	0,00945
11HDZ562	12	0,58333	0,63768	0,81953
11HDZ567	-	-	-	-
11HDZ1004	11	0,09091	0,25541	0,04527
<i>G. c. antiquorum</i>				
11HDZ443	7	0,14286	0,56044	0,02110
11HDZ665	8	0,00000	0,63333	0,00080
11HDZ102	9	0,22222	0,54902	0,01557
11HDZ480	9	0,22222	0,47059	0,16788
11HDZ562	8	0,25000	0,43333	0,13955
11HDZ567	7	0,14286	0,38462	0,07716
11HDZ1004	8	0,12500	0,45833	0,07704

Tabelle 3.4: Test des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes. Beobachtete und erwartete Heterozygotie für jeden Locus von fünf bekannten Unterarten; „-“ keine Auswertung, da Locus monomorph ist; Signifikanzlevel $p < 0,05$; Signifikante Werte sind fett dargestellt

<i>G. c. giraffa</i>				
11HDZ443	4	0,25000	0,53571	0,42849
11HDZ665	-	-	-	-
11HDZ102	-	-	-	-
11HDZ480	4	0,25000	0,25000	1,00000
11HDZ562	4	0,25000	0,25000	1,00000
11HDZ567	4	0,00000	0,42857	0,14278
11HDZ1004	4	0,50000	0,46429	1,00000
<i>G. c. reticulata</i>				
11HDZ443	12	0,75000	0,79710	0,34693
11HDZ665	12	0,58333	0,72826	0,26480
11HDZ102	-	-	-	-
11HDZ480	12	0,91667	0,77899	0,06806
11HDZ562	12	0,66667	0,77174	0,54304
11HDZ567	12	0,41667	0,70652	0,03397
11HDZ1004	12	0,58333	0,69203	0,79766
<i>G. c. rothschildi</i>				
11HDZ443	13	0,84615	0,80615	0,72328
11HDZ665	11	0,90909	0,87013	0,61665
11HDZ102	-	-	-	-
11HDZ480	13	0,30769	0,59077	0,01014
11HDZ562	13	0,84615	0,64923	0,33082
11HDZ567	13	0,15385	0,51692	0,02060
11HDZ1004	13	0,38462	0,58154	0,18850

Mit dem Test auf Linkage Disequilibrium kann überprüft werden, ob Loci gemeinsam vererbt werden. Dies wurde für alle sechs bekannten Unterarten durchgeführt (Tab. 3.5). In den Populationen *G. c. giraffa* und *G. c. tippelskirchi* konnten keine Verlinkungen gefunden werden. Bei der Unterart *G. c. rothschildi* wiesen zwei Loci eine Verlinkung auf. Jeweils zwei verlinkte Loci wurden innerhalb der Unterarten *G. c. angolensis* sowie *G. c. reticulata* detektiert. Die meisten Hinweise auf ein Linkage Disequilibrium zeigte die Population *G. c. antiquorum*. Insgesamt ist zwischen den Populationen aber für keinen Locus ein Muster zu erkennen. Aus diesem Grund konnten alle Loci in die weiteren Analysen eingeschlossen werden.

Tabelle 3.5: Test auf Linkage Disequilibrium für alle Loci bei sechs Populationen bekannter Unterart.
Signifikant gekoppelte Loci werden mit „+“ dargestellt

<i>G. c. angolensis</i>							
Locus	11HDZ 443	11HDZ 665	11HDZ 102	11HDZ 480	11HDZ 562	11HDZ 567	11HDZ 1004
11HDZ443		-	-	-	-	-	-
11HDZ665	-		-	-	+	-	+
11HDZ102	-	-		-	-	-	-
11HDZ480	-	-	-		-	-	+
11HDZ562	-	+	-	-		-	-
11HDZ567	-	-	-	-	-		-
11HDZ1004	-	+	-	+	-	-	

<i>G. c. antiquorum</i>							
Locus	11HDZ 443	11HDZ 665	11HDZ 102	11HDZ 480	11HDZ 562	11HDZ 567	11HDZ 1004
11HDZ443		+	+	-	+	+	+
11HDZ665	+		+	-	-	+	+
11HDZ102	+	+		-	-	-	-
11HDZ480	-	-	-		+	-	-
11HDZ562	+	-	-	+		-	+
11HDZ567	+	+	-	-	-		+
11HDZ1004	+	+	-	-	+	+	

<i>G. c. giraffa</i>							
Locus	11HDZ 443	11HDZ 665	11HDZ 102	11HDZ 480	11HDZ 562	11HDZ 567	11HDZ 1004
11HDZ443		-	-	-	-	-	-
11HDZ665	-		-	-	-	-	-
11HDZ102	-	-		-	-	-	-
11HDZ480	-	-	-		-	-	-
11HDZ562	-	-	-	-		-	-
11HDZ567	-	-	-	-	-		-
11HDZ1004	-	-	-	-	-	-	

<i>G. c. reticulata</i>							
Locus	11HDZ 443	11HDZ 665	11HDZ 102	11HDZ 480	11HDZ 562	11HDZ 567	11HDZ 1004
11HDZ443		-	-	-	-	+	-
11HDZ665	-		-	-	-	-	-
11HDZ102	-	-		-	-	-	-
11HDZ480	-	-	-		+	+	-
11HDZ562	-	-	-	+		-	-
11HDZ567	+	-	-	+	-		+
11HDZ1004	-	-	-	-	-	+	

Tabelle 3.5: Test auf Linkage Disequilibrium für alle Loci bei sechs Populationen bekannter Unterart.
Signifikant gekoppelte Loci werden mit „+“ dargestellt

<i>G. c. rothschildi</i>							
Locus	11HDZ 443	11HDZ 665	11HDZ 102	11HDZ 480	11HDZ 562	11HDZ 567	11HDZ 1004
11HDZ443		-	-	-	-	-	+
11HDZ665	-		-	+	-	-	-
11HDZ102	-	-		-	-	-	-
11HDZ480	-	+	-		-	-	-
11HDZ562	-	-	-	-		-	-
11HDZ567	-	-	-	-	-		-
11HDZ1004	+	-	-	-	-	-	

<i>G. c. tippelskirchi</i>							
Locus	11HDZ 443	11HDZ 665	11HDZ 102	11HDZ 480	11HDZ 562	11HDZ 567	11HDZ 1004
11HDZ443		-	-	-	-	-	-
11HDZ665	-		-	-	-	-	-
11HDZ102	-	-		-	-	-	-
11HDZ480	-	-	-		-	-	-
11HDZ562	-	-	-	-		-	-
11HDZ567	-	-	-	-	-		-
11HDZ1004	-	-	-	-	-	-	

3.4 Untersuchungen zur Differenzierung der sechs Unterarten und zum Status der Tiere unbekannter Unterart

3.4.1 Untersuchungen zur Populationsdifferenzierung

Mithilfe der F_{ST} -Werte kann der Grad der Populationsdifferenzierung, also die genetische Differenz zwischen Populationen, kalkuliert werden. Beträgt der F_{ST} -Wert eins, so sind die Populationen genetisch voneinander isoliert. Ein F_{ST} -Wert von null zeigt an, dass es keine Differenzierung zwischen den Populationen gibt. Die hier untersuchten Tiere der sechs bekannten Unterarten leben seit fünf bis sechs Generationen in verschiedenen zoologischen Institutionen. Durch die kontrollierte Zucht, bei der eine Hybridisierung zwischen verschiedenen Unterarten verhindert wird, kann der Genfluss zwischen den Populationen ausgeschlossen werden. Dennoch wurde die Analyse der F_{ST} -Werte in diese Studie mit einbezogen, da sie Aufschluss darüber geben, wie stark die genetische Differenzierung ist (Tab. 3.6).

Alle F_{ST} -Werte, die sich auf die Unterart *G. c. tippelskirchi* beziehen, waren nicht signifikant. Der mit 0,17430 geringste signifikante F_{ST} -Wert bestand zwischen den Unterarten *G. c. reticulata* und *G. c. rothschildi*. Die Werte für die Kombination *G. c. antiquorum* mit *G. c. rothschildi* (0,21531) bzw. mit *G. c. reticulata* (0,23776) lagen ebenso im niedrigen Bereich. Alle übrigen Populationen wiesen deutlich höhere F_{ST} -Werte zwischen 0,37528 und 0,57626 auf.

Tabelle 3.6: F_{ST} -Werte zeigen die Populationsdifferenzierung an. Signifikanzlevel $p < 0,05$, signifikante Werte werden fett dargestellt. Tab. 6.5 auf S. 115 im Anhang zeigt die Signifikanzwerte

<i>G. c.</i>	<i>angolensis</i>	<i>antiquorum</i>	<i>giraffa</i>	<i>reticulata</i>	<i>rothschildi</i>	<i>tippelskirchi</i>
<i>angolensis</i>	0.00000					
<i>antiquorum</i>	0.46190	0.00000				
<i>giraffa</i>	0.43555	0.57626	0.00000			
<i>reticulata</i>	0.37528	0.23776	0.45021	0.00000		
<i>rothschildi</i>	0.43020	0.21531	0.51183	0.17430	0.00000	
<i>tippelskirchi</i>	0.47853	0.40724	0.50058	0.10212	0.22252	0.00000

Die Principal Component Analyse auf dem Niveau von sieben Populationen lieferte mit einem Wert von $p = 0,121$ eine nicht signifikante X-Achse. Die Y-Achse hingegen war bei einem Wert von $p = 0,043$ signifikant. Die Populationen *G. c. angolensis* und *G. c. giraffa* lagen beieinander, jedoch weit entfernt von den anderen Populationen. Auch die zwei Unterarten *G. c. reticulata* und *G. c. tippelskirchi* sowie *G. c. rothschildi* und die Population der unbekannt Tiere wurden jeweils zusammen gruppiert. *G. c. antiquorum* hingegen stand alleine und scheint genetisch von den anderen Gruppen distanziert zu sein (Abb. 3.4).

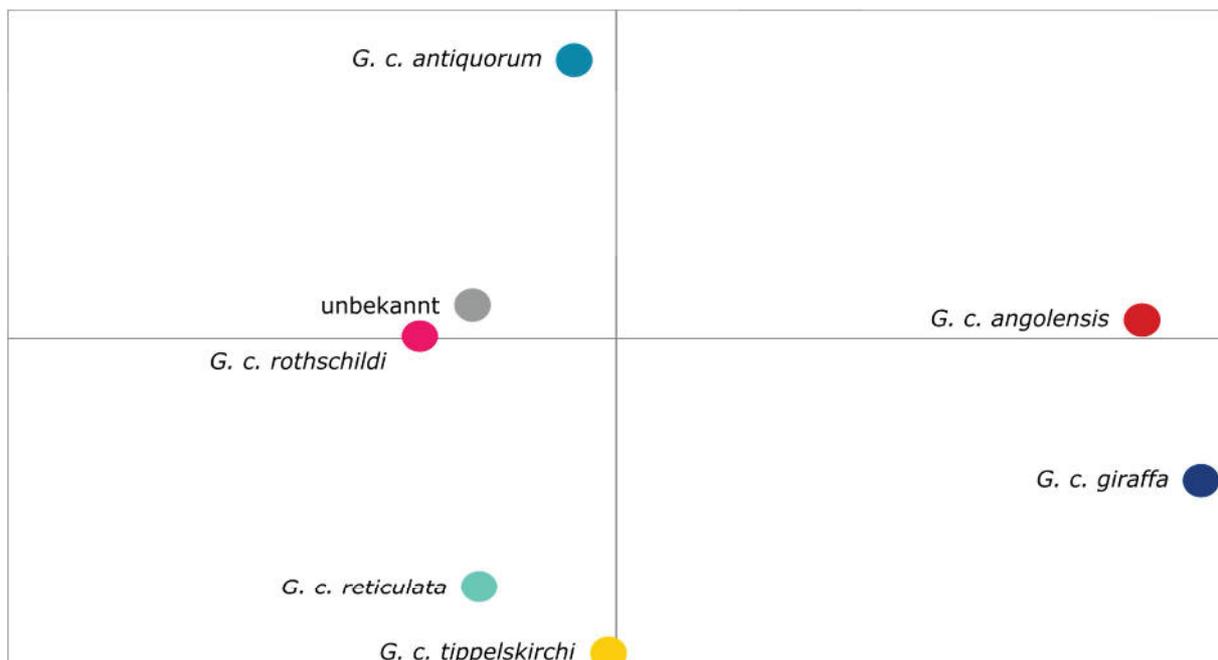


Abbildung 3.4: Principal Component Analyse für sieben Populationen

Bei der Principal Component Analyse aller 78 einzelnen Individuen waren die horizontale Achse mit einem p-Wert von 0,139 und die vertikale Achse mit einem p-Wert von 0,077 nicht signifikant (Abb. 3.5). Individuen der Unterart *G. c. angolensis* waren genetisch ähnlich zu *G. c. giraffa*. Auch das unbekannt Tier GCU 17 war Teil dieser Gruppierung. Die übrigen vier Unterarten bildeten zusammen mit 26 Individuen unbekannter Unterart eine zweite Gruppe. Die drei Unterarten *G. c. antiquorum*, *G. c. reticulata* und *G. c. rothschildi* wiesen hier Überschneidungen auf. Von jeder dieser Unterarten gab es jedoch auch einzelne Individuen, die weiter entfernt isoliert gruppiert wurden. In der Nähe von *G. c. reticulata* befand sich das zu *G. c. tippelskirchi* gehörende Individuum nah dem unbekannt Tier GCU 12.

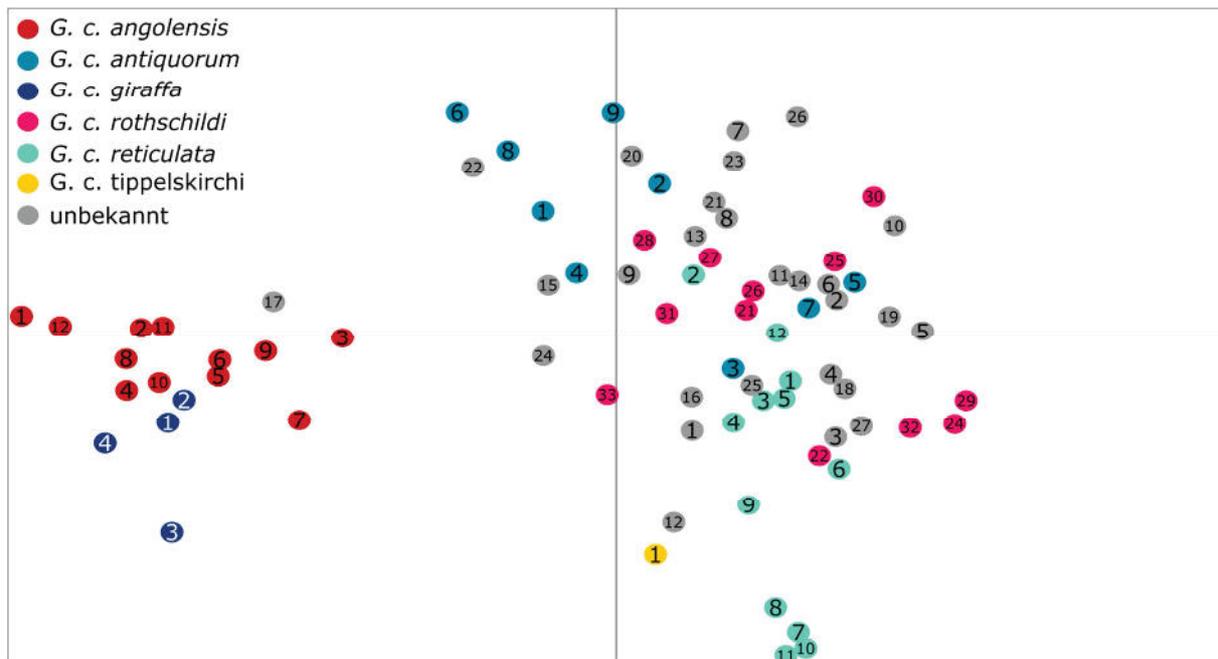


Abbildung 3.5: Principal Component Analyse für alle 78 Individuen. Unterschiedliche Farben kodieren sechs Unterarten sowie eine Gruppe unbekannter Tiere. Die Zahlen sind identisch mit den Probennummern der Individuen

3.4.2 Genetische Differenzierung der sechs bekannten Unterarten

Mit STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) und TESS 2.3.1 (Chen *et al.*, 2007) wurden zunächst nur Individuen der sechs bekannten Unterarten untersucht. Dazu wurden 41 Proben ausgewählt, bei denen die Daten für alle sieben Loci vollständig vorlagen. Da beide Programme fehlende Mikrosatellitendaten beim Erstellen der Cluster missinterpretieren können, sollte die Auflösung der sechs Unterarten in die Cluster vorab überprüft werden.

Die erste Analyse mit STRUCTURE und folgende Auswertung mit STRUCTURE HARVESTER ergab für ΔK den höchsten Peak bei $K = 4$. Somit war die wahrscheinlichste Anzahl an Cluster $K = 4$. Mit dieser Annahme wurde die Berechnung in STRUCTURE einhundert Mal wiederholt und mit CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg, 2007) ein Mittelwert berechnet. Zur Visualisierung der Daten wurde mit DISTRUCT 1.1 (Rosenberg, 2004) ein Barplot erstellt (Abb. 3.6).

Die 41 Proben der sechs Unterarten wurden in vier unterschiedlich farbige Cluster eingeteilt. Die Unterarten *G. c. angolensis* und *G. c. giraffa* waren genetisch sehr ähnlich und wurden daher einem Cluster zugeordnet. Eine genetische Ähnlichkeit bestand auch zwischen *G. c. reticulata* und *G. c. tippelskirchi*. Einige Tiere der Unterart *G. c. reticulata* wurden teilweise dem Cluster zugeordnet, welches die Unterart *G. c. rothschildi* definiert. Die Probe GCE 12 wurde diesem Cluster zu ca. 90 % zugeordnet. Es ist daher zu vermuten, dass dieses Tier zur Unterart *G. c. rothschildi* gehört. Die Probe GCE 2 wird diesem Cluster zu ca. 60 %, die Probe GCE 1 zu etwa 40 % zugeordnet. Die Population *G. c. antiquorum* unterschied sich deutlich von den anderen Clustern. Das Individuum GCR 28 aus der Rothschildi-Gruppe besaß etwa 40 % dieses Clusters.

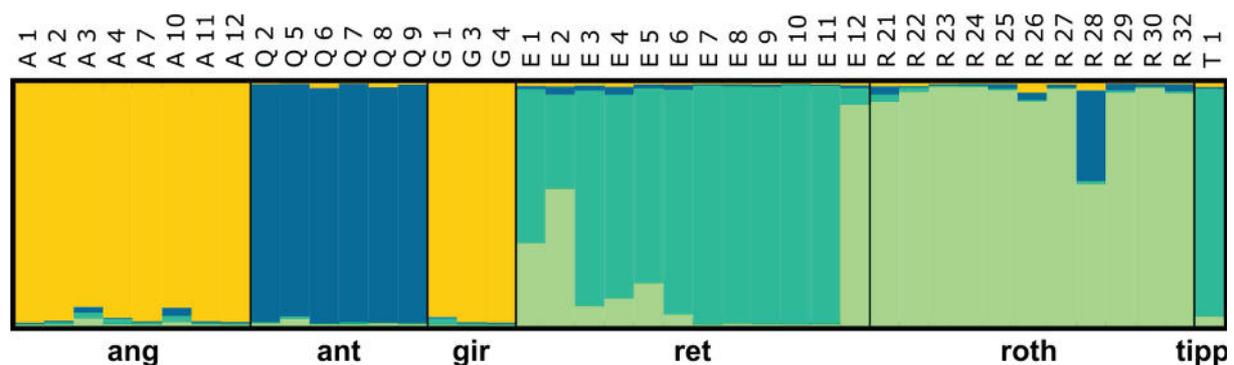


Abbildung 2.6: Barplot der STRUCTURE Berechnung für $K = 4$ und Probennamen. Unterschiedliche Cluster werden durch verschiedene Farben gekennzeichnet. Dargestellt sind auf der horizontalen Achse 41 Individuen der sechs Unterarten ang = *G. c. angolensis*, ant = *G. c. antiquorum*, gir = *G. c. giraffa*, ret = *G. c. reticulata*, roth = *G. c. rothschildi*, tipp = *G. c. tippelskirchi*. Die vertikale Achse definiert die prozentuale Zugehörigkeit zu den Clustern

Bei der Analyse mit TESS gibt der niedrigste DIC-Wert (Deviance Information Criterion) die wahrscheinlichste Anzahl von Clustern an. Die DIC-Werte lagen in einem Bereich von 1256,53 - 1627,64. Der niedrigste Wert lag bei $K = 12$ und definiert damit die Anzahl der Cluster. Diese Analyse wurde fünfzig Mal für dieses K wiederholt und die Ergebnisse der zehn Wiederholungen mit den niedrigsten DIC-Werten mit CLUMPP gemittelt und mit DISTRUCT visualisiert (Abb. 3.7).

Für die sechs Unterarten wurden zwölf Cluster kalkuliert. Fünf dieser Cluster waren jedoch nur zu einem so geringen prozentualen Anteil vertreten, dass sie kaum gewichtet wurden und nicht zur Differenzierung der Individuen beitragen konnten. Die Unterarten *G. c. angolensis* und *G. c. giraffa* wiesen eine hohe Ähnlichkeit auf. Dennoch konnten die beiden Unterarten durch geringfügige Unterschiede voneinander differenziert werden. *G. c. antiquorum* ließ sich deutlich von den übrigen Unterarten abgrenzen. Dies galt ebenso für *G. c. rothschildi*, wobei das Tier GCE 12 aus der Reticulata-Gruppe dasselbe Muster zeigte wie die Rothschildi-Gruppe. Die beiden Unterarten *G. c. reticulata* und *G. c. tippelskirchi* zeigten ein so ähnliches Muster, dass eine deutliche Trennung dieser Gruppen nicht möglich war.

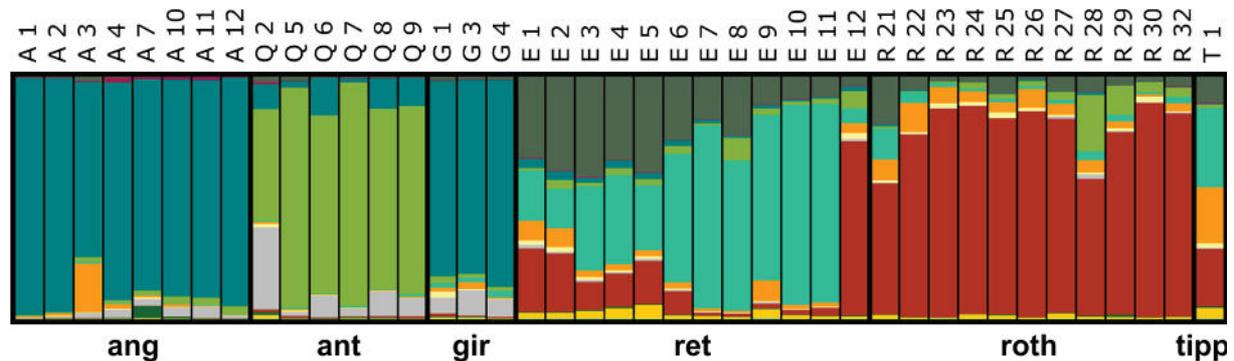


Abbildung 3.7: Barplot der Analyse mit TESS für $K = 12$ und Probenamen der 41 Individuen. Vertikale Balken bezeichnen einzelne Individuen der sechs Unterarten ang = *G. c. angolensis*, ant = *G. c. antiquorum*, gir = *G. c. giraffa*, ret = *G. c. reticulata*, roth = *G. c. rothschildi*, tipp = *G. c. tippelskirchi*. Verschiedene Farben signalisieren unterschiedliche Cluster, die vertikale Achse definiert die prozentuale Zugehörigkeit zu den Clustern

3.4.3 Status der Unterart der unbekanntnen Tiere

Für diese Analyse wurde von sieben Populationen ausgegangen. Diese setzten sich aus den sechs bekannten Unterarten sowie einer Population mit unbekanntnen Tieren zusammen. STRUCTURE interpretierte eine Anzahl von vier als wahrscheinlichstes K (Abb. 3.8). Auch hier bildeten die Unterarten *G. c. angolensis* und *G. c. giraffa* ein gemeinsames Cluster. Ebenso wurden die Unterarten *G. c. tippelskirchi* und *G. c. reticulata* zusammengefasst. Bei der letztgenannten Gruppe wiesen drei Tiere große Übereinstimmungen mit dem Cluster von *G. c. rothschildi* auf. In dieser Gruppe hingegen enthielten drei Tiere auch größere Anteile des Clusters der Antiquorum-Gruppe. Die Population der Tiere unbekannter Unterart war sehr inhomogen und enthielt alle Cluster der sechs bekannten Unterarten.

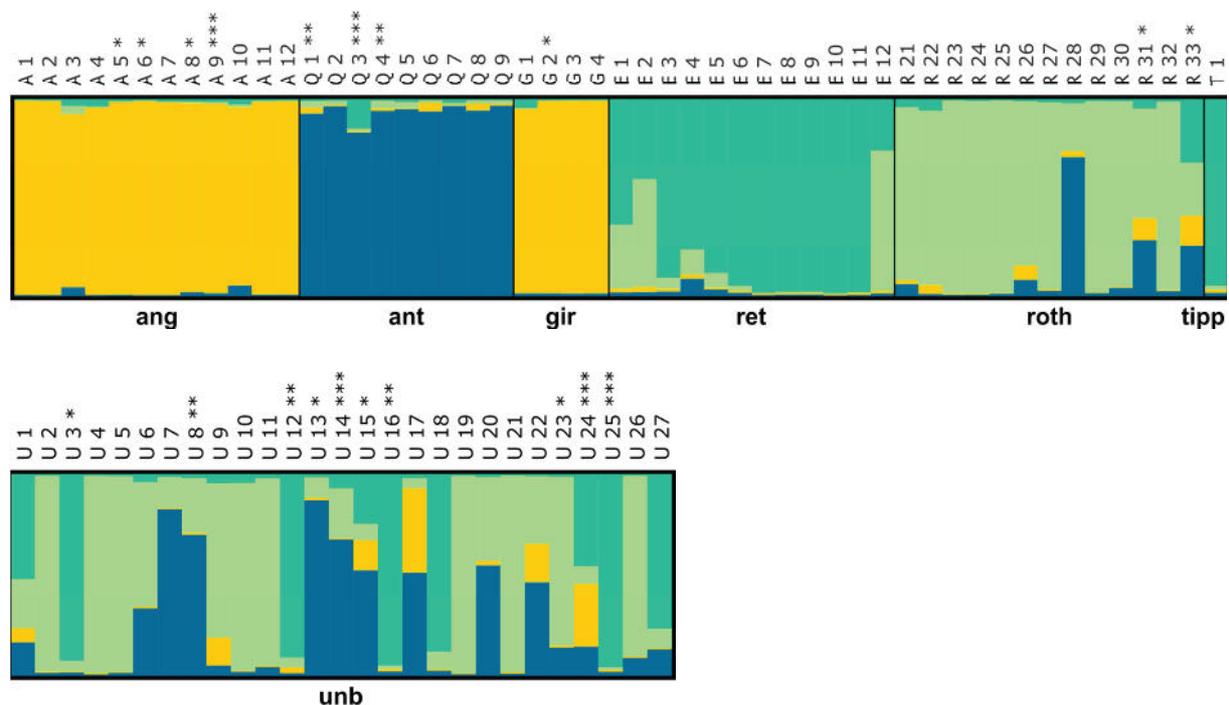


Abbildung 3.8: Barplot der STRUCTURE Analyse für K = 4 mit den Probenamen. Unterschiedliche Cluster werden durch verschiedene Farben gekennzeichnet. Dargestellt sind auf der horizontalen Achse 78 Individuen der sechs Unterarten ang = *G. c. angolensis*, ant = *G. c. antiquorum*, gir = *G. c. giraffa*, ret = *G. c. reticulata*, roth = *G. c. rothschildi*, tipp = *G. c. tippelskirchi* sowie unb = unbekanntne Unterart. Die vertikale Achse definiert die prozentuale Zugehörigkeit zu den Clustern. Die * zeigen die Datenausfälle an der entsprechenden Anzahl Loci an

Bei der Analyse mit TESS wurden für die sieben Populationen 11 Cluster definiert (Abb. 3.9). Die Unterart *G. c. angolensis* zeigte Ähnlichkeit zu *G. c. giraffa*, wobei die letztgenannte sich durch die größere prozentuale Zugehörigkeit zu einem anderen Cluster gut abgrenzen ließ. Die Antiquorum-Gruppe beinhaltete mehrere Cluster, die jeweilige prozentuale Zugehörigkeit der Individuen zu diesen Clustern zeigte jedoch weitestgehend dasselbe Muster. Lediglich das Individuum GQQ 1 fiel aus diesem Muster heraus. Die Unterart *G. c. reticulata* erschien

inhomogen, konnte jedoch, abgesehen von der Unterart *G. c. tippelskirchi*, gut von den übrigen unterschieden werden. Das Tier GCE 12 zeigte eine deutliche Übereinstimmung mit der Rothschildi-Gruppe. Die Tiere unbekannter Unterart zeigten verschiedene Muster, wobei hauptsächlich Cluster aus den Unterarten *G. c. antiquorum*, *G. c. reticulata* sowie *G. c. rothschildi* ähnlich waren.

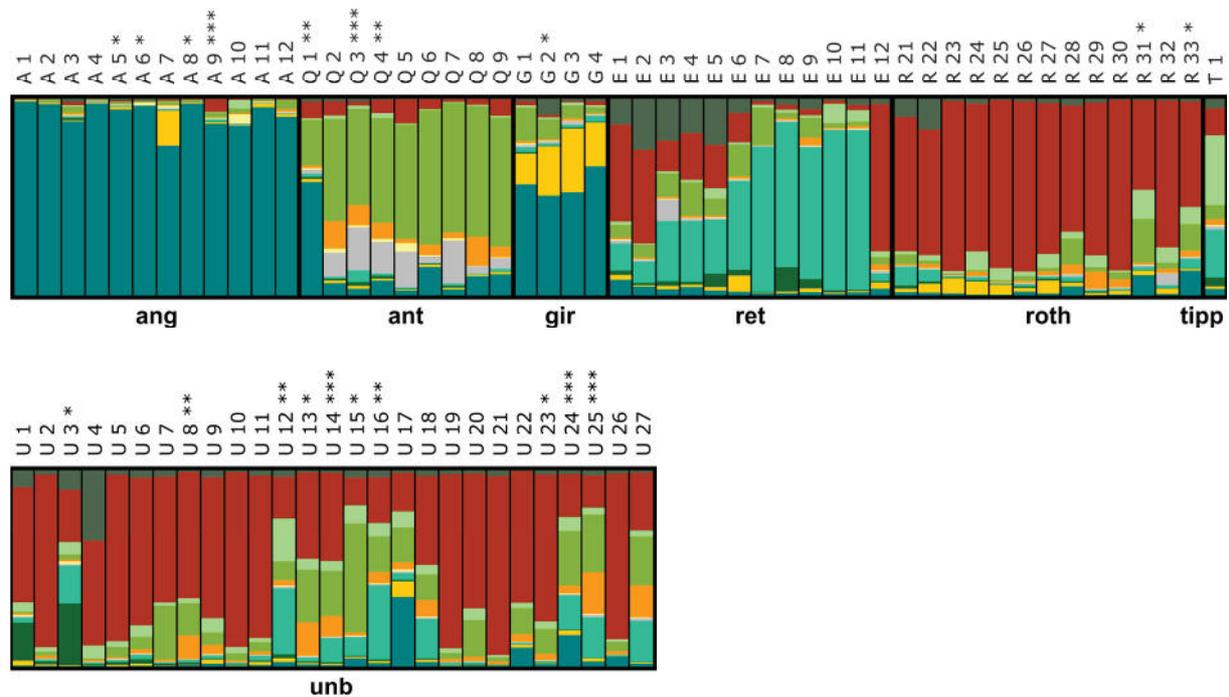


Abbildung 3.9: Barplot der Analyse mit Tess für K = 11 mit den Probenamen. Unterschiedliche Cluster werden durch verschiedene Farben gekennzeichnet. Dargestellt sind auf der horizontalen Achse 78 Individuen der sechs Unterarten ang = *G. c. angolensis*, ant = *G. c. antiquorum*, gir = *G. c. giraffa*, ret = *G. c. reticulata*, roth = *G. c. rothschildi*, tipp = *G. c. tippelskirchi* sowie unb = unbekannte Unterart. Die vertikale Achse definiert die prozentuale Zugehörigkeit zu den Clustern. Datenausfälle werden mit * gekennzeichnet für Ausfälle an * einem Locus, ** zwei Loci, *** drei Loci

Zur Zuordnung der Tiere unbekannter Unterart zu den bekannten Unterarten wurde hauptsächlich die Analyse mit STRUCTURE berücksichtigt. Da diese nur vier Cluster kalkulierte, konnte die Zugehörigkeit eines Tieres deutlicher definiert werden als bei dem Barplot mit elf Clustern. Der Barplot wurde neu strukturiert, um die prozentuale Zuordnung der einzelnen Individuen zu den Clustern deutlicher aufzulösen (Abb. 3.10). Einige Individuen wie beispielsweise GCU 19 oder GCU 25 konnten deutlich nur einem einzigen Cluster und somit auch einer Unterart zugeordnet werden. Andere Individuen hingegen zeigen zu mehreren Clustern eine Zugehörigkeit. Hier wurde verglichen, ob dieses Muster auch bei Individuen der bekannten Unterarten vorgekommen war, wie beispielsweise bei den Tieren GCU 27 und GCE 4. Bei einigen Tieren wie GCU 17 oder GCU 15 war kein

charakteristisches Muster für eine der sechs Unterarten erkennbar, sodass von einer Hybridisierung ausgegangen werden muss.

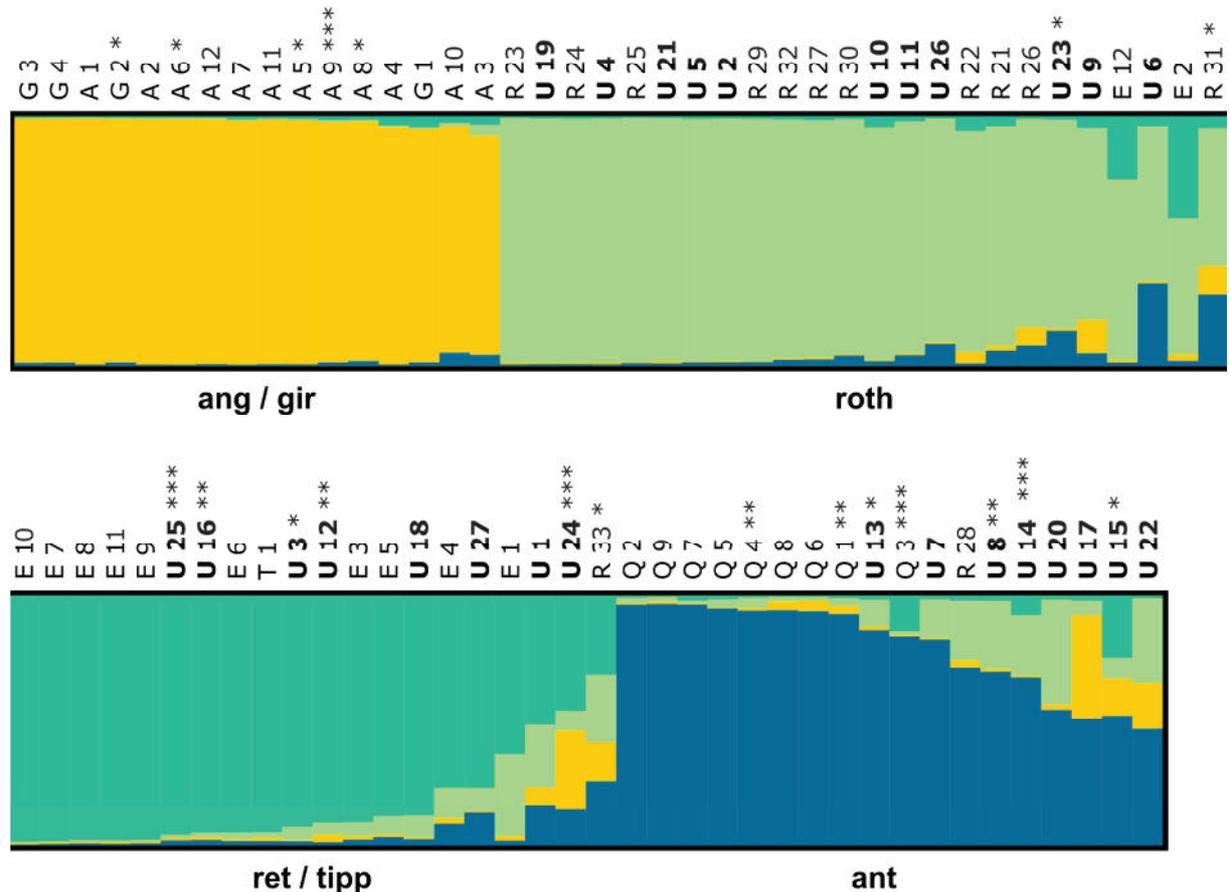


Abbildung 3.10: Barplot der Analyse mit STRUCTURE für K = 4 mit den Probenamen. Proben der Unterarten A = *G. c. angolensis*, Q = *G. c. antiquorum*, G = *G. c. giraffa*, E = *G. c. reticulata*, R = *G. c. rothschildi*, T = *G. c. tippelskirchi* und U = unbekannte Unterart (fett gedruckt) werden nach der Zugehörigkeit der Cluster sortiert. * = Datenausfall an der entsprechenden Anzahl Loci

Die Zuordnung der unbekannt Tiere erfolgte letztlich nicht nur Anhand der Clusteranalyse. Es wurden zudem die Informationen aus dem Zuchtbuch der Giraffen mit einbezogen. Dazu wurden die Stammbäume der unbekannt Tiere betrachtet (Anhang 6.2, S. 95 ff.). In der Abstammungslinie dieser Tiere sind auch Individuen bekannter Unterart verzeichnet. Daher konnte definiert werden, welche Unterart bei dem unbekannt Tier zu erwarten wäre. Außerdem wurden die Stammbäume aller 27 unbekannt Tiere miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass einige Tiere Vollgeschwister waren und demnach die Zuordnung gleichermaßen erfolgen müsste.

Die Informationen über die erwartete Unterart und die Verwandtschaftsbeziehungen der unbekannt Tiere wurden erneut graphisch dargestellt (Abb. 3.11). Die Tiere GCU 5,

GCU 2 und GCU 23 stammten von denselben Elterntieren ab. Alle bekannten Tiere im Stammbaum gehörten zur Unterart *G. c. rothschildi*. Demnach stimmte die erwartete Unterart mit den Ergebnissen der Clusteranalyse überein. Das Tier GCU 23 wurde jedoch zu etwa 20 % dem Antiquorum-Cluster zugeordnet. Dieses Muster fand sich auch bei den untersuchten Tieren bekannter Unterart. Zudem war hier ein Locus ausgefallen, wodurch fehlende Daten missinterpretiert worden sein können. Die Tiere GCU 4, GCU 21 und GCU 6 hatten ebenfalls identische Elterntiere. Des Weiteren war das Vatertier (0-2350), dessen Unterart unbekannt war, dasselbe wie in der ersten Gruppe der Tiere GCU 5, GCU 2 und GCU 23. Bei der zweiten Gruppe war ebenfalls die Unterart *G. c. rothschildi* zu erwarten, was sich mit den Ergebnissen von GCU 4 und GCU 21 deckte. Das Tier GCU 6 zeigte jedoch zu etwa 40 % eine Zugehörigkeit zum Antiquorum-Cluster. Aufgrund dieser deutlichen Tendenz musste davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Tier um einen Hybriden handelte. Somit musste bereits bei den unbekanntem Tieren in der Abstammungslinie eine Hybridisierung zwischen *G. c. rothschildi* und *G. c. antiquorum* aufgetreten sein, welche mindestens drei Generationen zurück lag. Durch die Zucht mit Tieren der Unterart *G. c. rothschildi* gingen immer mehr Antiquorum-Gene verloren. Die beiden Tiere GCU 23 und GCU 6 sollten von der Zucht ausgeschlossen werden, da ein Teil ihrer Gene auf *G. c. antiquorum* zurückgehen. Die übrigen Tiere GCU 5, GCU 2, GCU 4 sowie GCU 21 enthielten jedoch nur noch Gene aus der Unterart *G. c. rothschildi*. Da es keinerlei Anzeichen für Antiquorum-Gene gab, können diese Tiere zur Zucht zugelassen werden.

Die beiden Tiere GCU 3 und GCU 20 stammten ebenfalls von identischen Elterntieren ab. Aufgrund ihrer Abstammung wäre die Unterart *G. c. rothschildi* zu erwarten gewesen. Keines der beiden Tiere zeigte jedoch die charakteristischen Cluster-Merkmale dieser Unterart. Während bei GCU 20 von einer Hybridisierung zwischen *G. c. rothschildi* und *G. c. antiquorum* ausgegangen werden musste, zeigte das Tier GCU 3 deutlich das Muster der Reticulata-Gruppe. Die Abstammung der beiden Tiere ging auf ein unbekanntes mütterliches Tier zurück, über deren Elterntiere ebenfalls keine Informationen vorlagen. Daher ist es denkbar, dass es bereits hier Hybridisierungen stattgefunden haben. Das Tier GCU 3 sollte daher von der Zucht ausgeschlossen werden, das Tier GCU 20 war bereits verstorben.

Auch die Elterntiere von GCU 7 und GCU 14 waren identisch. Ihrer Abstammung nach wäre die Unterart *G. c. rothschildi* zu erwarten gewesen. Die Clusteranalyse ergab jedoch für beide Tiere eine 80 % bzw. 70 % Zugehörigkeit zur Antiquorum-Gruppe. Zwar gab es bei dem Tier GCU 14 an drei Loci Datenausfälle, dennoch wäre selbst mit vorhandenen Daten

keine eindeutige Zuordnung möglich. Demnach muss von einer Hybridisierung ausgegangen werden und beide Tiere sind von der Zucht auszuschließen.

Ebenfalls identisch waren die Elterntiere von GCU 16 und GCU 18, bei denen im Stammbaum einzig die Unterart *G. c. reticulata* vertreten war. Beide Tiere zeigten das für diese Unterart typische Muster. Demzufolge kann eine Zucht mit diesen Tieren empfohlen werden.

Die Tiere GCU 24 und GCU 17 gingen auch auf identische Elterntiere zurück. Aufgrund ihrer Abstammung war die Unterart *G. c. antiquorum* zu erwarten. Das Tier GCU 17 ließ sich jedoch nur zu etwa 50 %, das Tier GCU 24 sogar nur zu ca. 20 % dieser Unterart zuordnen. Auch hier können die Datenausfälle an drei Loci missinterpretiert worden sein. Es war jedoch davon auszugehen, dass selbst mit diesen Daten kein eindeutiges Muster von *G. c. antiquorum* zu erkennen wäre. Somit muss von einer Hybridisierung ausgegangen werden, wodurch eine Zucht mit diesen Tieren ausgeschlossen werden sollte.

Die Tiere GCU 19, GCU 10, GCU 11 und GCU 9 können eindeutig der Unterart *G. c. rothschildi*, das Tier GCU 12 eindeutig der Unterart *G. c. reticulata* zugeordnet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann eine Zucht mit den vier letztgenannten Tieren empfohlen werden. Das Tier GCU 19 ist bereits verstorben.

Bei den Tieren GCU 26, GCU 25, GCU 27, GCU 1, GCU 23, GCU 18, GCU 15 sowie GCU 22 muss davon ausgegangen werden, dass Hybridisierungen vorlagen. Zwar zeigte das Tier GCU 26 das Rothschildi-Cluster, jedoch war das Muttertier das als Hybrid kategorisierte Tier GCU 17. Ähnlich verhält es sich mit dem Tier GCU 25, welches eindeutig dem Reticulata-Cluster angehört. Das Muttertier war das als Hybrid eingeordnete Tier GCU 24, welches ein viel heterogenes Muster der Cluster zeigte. Beide Muttertiere GCU 17 und GCU 24 hatten zudem denselben unbekanntem Vater (0-3252), mit welchem sie jeweils die beiden Nachkommen GCU 26 und GCU 25 zeugten. Da die beiden Nachkommen deutlich zwei verschiedenen Unterarten zugeordnet werden, muss davon ausgegangen werden, dass das Vätertier (0-3252) bereits ein Hybride aus *G. c. reticulata* und *G. c. rothschildi* war.

Das Tier GCU 27 zeigte große Ähnlichkeiten zu den Tieren der Reticulata-Gruppe. Jedoch war der prozentuale Anteil für das Antiquorum-Cluster bei diesem Tier höher als bei den Referenzproben dieser Unterart. Eine eindeutige Aussage war hier nicht möglich. Bei einem konservativen Zuchtmanagement sollte dieses Tier somit von der Zucht ausgeschlossen werden.

Das Individuum GCU 1 zeigte aufgrund der Verteilung der Cluster eine eindeutige Hybridisierung.

Die zu erwartende Unterart bei dem Tier GCU 13 war *G. c. rothschildi*. Da die Clusteranalyse dieses Tier zu der Antiquorum-Gruppe einordnete, lag auch hier eine Hybridisierung vor. Zudem konnte bereits das Muttertier GCU 3 als Hybrid kategorisiert werden.

Das Tier GCU 8 erschien hier als Hybride mit einer großen Zugehörigkeit zur Antiquorum-Gruppe, wobei eine Zuordnung zu *G. c. rothschildi* erwartet wurde. Hier war zu beachten, dass das Muttertier (0-2403) identisch ist mit dem Muttertier von GCU 19. Daher war zu vermuten, dass das Muttertier ein Hybride aus *G. c. antiquorum* und *G. c. rothschildi* war, und dem Tier GCU 19 ausschließlich Rothschildi-Gene, dem Tier GCU 8 ausschließlich Antiquorum-Gene vererbt hat.

Auch das Tier GCU 15 zeigte ein Hybrid-Muster. Dies wurde dadurch bestätigt, dass das Muttertier GCU 14 ebenfalls ein Hybride war. Ebenso verhält es sich für das Tier GCU 22, welches von dem als Hybrid kategorisierten Muttertier GCU 7 abstammte.

Zusammenfassend wurden anhand der Clusteranalyse die Tiere GCU 5, GCU 2, GCU 4, GCU 21, GCU 19, GCU 10, GCU 11 und GCU 9 der Unterart *G. c. rothschildi* zugeordnet. Die Tiere GCU 16, GCU 18 sowie GCU 12 konnten als *G. c. reticulata* kategorisiert werden. Alle übrigen Tiere sind Hybride, mit denen die Zucht nicht empfohlen werden kann.

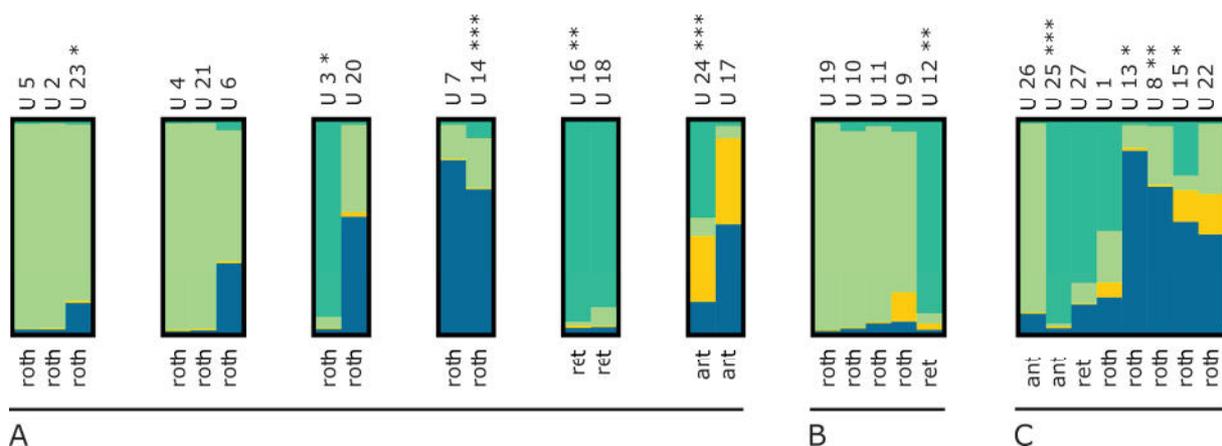


Abbildung 3.11: Barplot der Tiere unbekannter Unterart mit Probennummer und erwarteter Unterart. A Hybride und unterartenreine Tiere gruppiert anhand von identischen Elterntieren. B Zuordnung zu einer Unterart möglich. C Hybride. * = Datenausfall an * einem Locus, ** zwei Loci, *** drei Loci

3.5 Gruppierung der unbekanntem Giraffen im phylogenetischen Stammbaum

Für die Sequenzanalyse mit dem mitochondrialen Marker D-loop wurden neun Tiere ausgewählt. Die Amplifikation und anschließende Sequenzierung war bei drei Proben, GCU 3, GCU 19 und GCU 20, erfolgreich.

Die Consensus Sequenzen wurden zunächst mittels BLAST gegen die Datenbank von NCBI abgeglichen. Drei hinterlegte Sequenzen von *Giraffa camelopardalis* zeigten eine 100 % Übereinstimmung, wobei jedoch keine Informationen über die Unterart vorlagen. Bei zweien dieser Sequenzen gab es zudem keine Quellenangabe zu einer Veröffentlichung. Die dritte Übereinstimmung verwies auf eine Publikation (Confalone *et al.*, 1995), in welcher eine Giraffe aus dem Zoo Amsterdam beprobt worden war (AF151090). Aus der Datenbank des Giraffen-Zuchtbuches ging hervor, dass zu diesem Zeitpunkt ausschließlich Tiere der Unterart *G. c. reticulata* dort gehalten wurden.

Mittels GENEIOUS 9.0.9 (Biomatters Limited) wurde aus den drei Sequenzen sowie den Referenzen von NCBI ein Neighbor-Joining Tree erstellt (Abb. 3.12). Die dort hinterlegten Referenzen waren mit Ausnahme von *G. c. camelopardalis* für die übrigen acht Unterarten verfügbar. Der phylogenetische Stammbaum ließ eine deutliche Trennung aller acht Unterarten erkennen. Die drei sequenzierten Proben wurden gemeinsam nah der Rothschildi-Gruppe gruppiert. Somit waren sie nicht identisch mit *G. c. rothschildi*, schienen aber nah verwandt zu sein. Als Außengruppe wurde eine Sequenz von *Okapia johnstoni* ausgewählt.

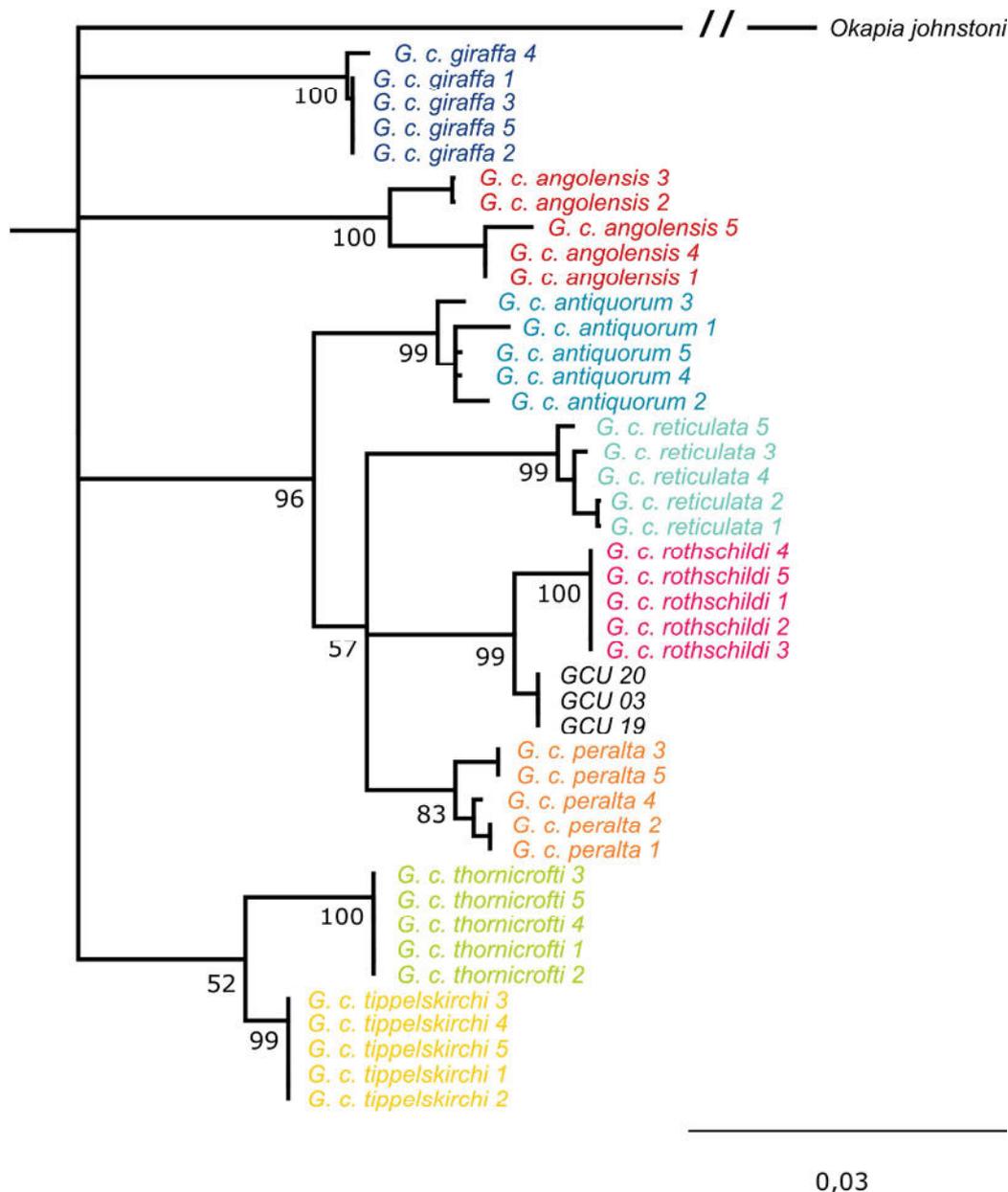


Abbildung 3.12: Stammbaumanalyse für die Sequenzen der drei unbekannt Tiere sowie für acht Unterarten von *G. camelopardalis*. Die Zahlen geben die Bootstrap-Werte der Knotenpunkte an. Die Außengruppe wird durch *Okapia johnstoni* definiert

Aufgrund der Gruppierung der unbekannt Tiere zu *G. c. rothschildi* im Stammbaum sowie der 100 % Übereinstimmung mit dem Tier aus Amsterdam der Unterart *G. c. reticulata* anhand der BLAST-Suche (AF151090) wurde ein zweiter Neighbor-Joining Tree erstellt (Abb. 3.13). Dazu wurden alle Referenzen dieser beider Unterarten berücksichtigt, welche in der D-loop Region lagen. Als Außengruppe wurde das Okapi *Okapia johnstoni* ausgewählt. Die drei untersuchten Tiere wurden gemeinsam mit dem Tier aus Amsterdam gruppiert und waren somit identisch. Diese vier Tiere wurden der Unterart *G. c. rothschildi* zugeordnet und sind dieser Unterart genetisch am nächsten. Innerhalb der Rothschildi-Gruppe fanden sich

auch zwei Tiere von *G. c. reticulata*. Drei Tiere, *G. c. rothschildi* 11 bzw. 12 sowie *G. c. reticulata* 7 sind jeweils einzeln vertreten und werden keiner Gruppe zugeordnet.

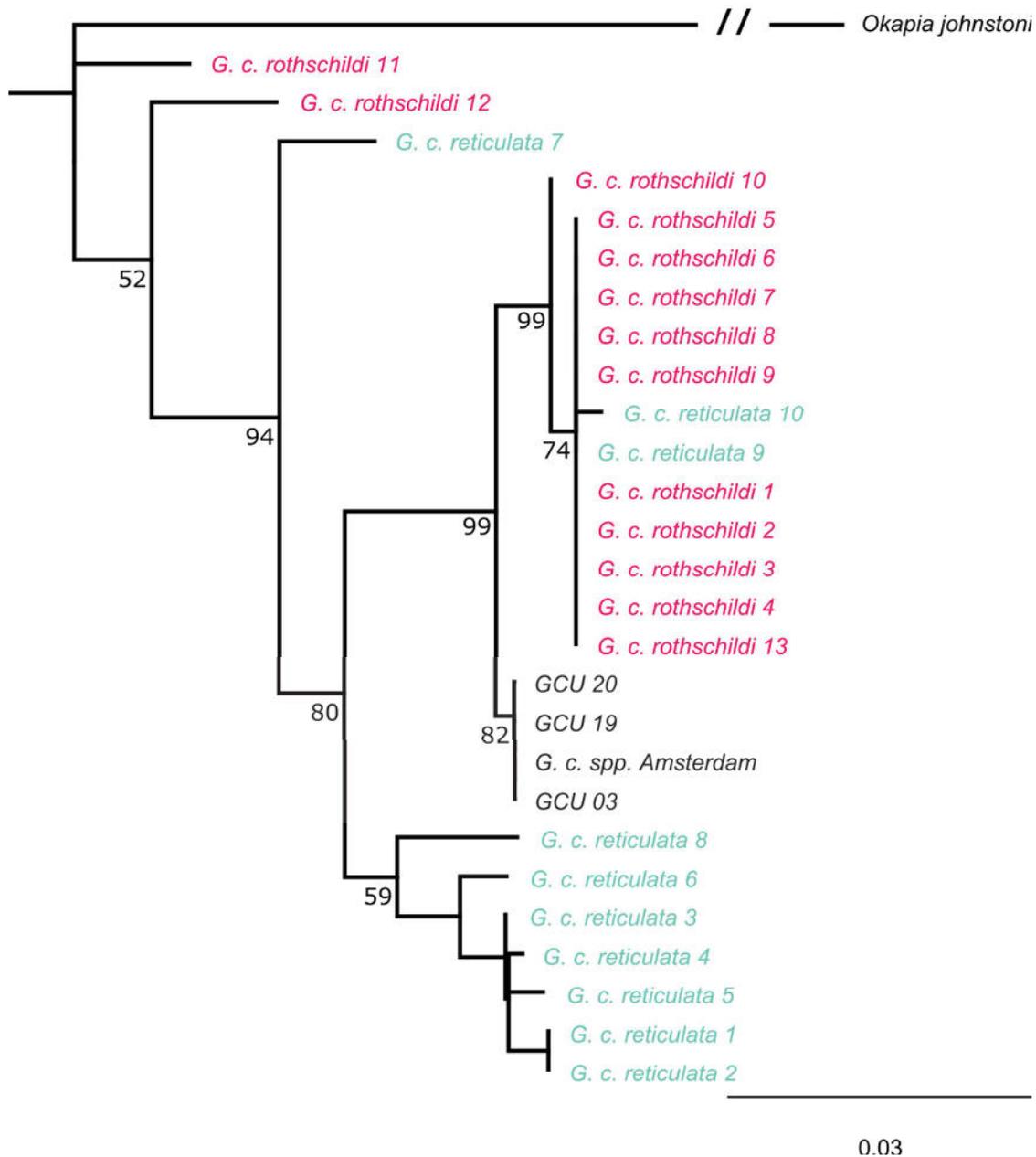


Abbildung 3.13: Phylogenetischer Stammbaum der drei unbekannt Tiere sowie der Giraffen der Unterarten *G. c. reticulata* und *G. c. rothschildi*. Die Zahlen geben die Bootstrap-Werte der Knotenpunkte an, die Außengruppe ist *Okapia johnstoni*.

Aufgrund der eindeutigen Gruppierung des Individuums der Unterart *G. c. reticulata* aus Amsterdam zu *G. c. rothschildi* wurde davon ausgegangen, dass es sich um einen Hybriden handelte. Bei einer Hybridisierung ist die Fellzeichnung der Giraffe charakteristisch für eine Unterart, die mitochondriale DNA hingegen stammt von einer anderen Unterart (Groves &

Grubb, 2011). Dies wurde auch für die beiden Tiere *G. c. reticulata* 9 (EU088326.1; (Brown *et al.*, 2007) und *G. c. reticulata* 10 (EU088327.1; (Brown *et al.*, 2007) vermutet. Beide Referenzen stammten aus einer Studie, in welcher zwei Reticulata-Rothschildi-Hybride identifiziert werden konnten (Brown *et al.*, 2007). Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Referenzen um die beiden Hybride handelte.

Da drei Tiere vollständig isoliert von den übrigen Tieren der jeweiligen Unterart waren, wurden die Sequenzen dieser Tiere erneut mittels BLAST gegen die Datenbank von NCBI abgeglichen. Für *G. c. rothschildi* 11 (EU088329.1; (Brown *et al.*, 2007), konnte bei zwei Sequenzen eine 100 % Übereinstimmung mit *G. c. tippelskirchi* (HG975260.1; (Bock *et al.*, 2014) und EF442269.1; (Hassanin *et al.*, 2007) gefunden werden. Auch für die Sequenz von *G. c. rothschildi* 12 (EU088330.1; (Brown *et al.*, 2007) ergab sich zwei Mal eine 100 % Übereinstimmung mit der Unterart *G. c. tippelskirchi* (EU088340.1, EU088337.1; (Brown *et al.*, 2007). Die Sequenz von *G. c. reticulata* 7 war mit einer Sequenz zu 100 % identisch, die keine Informationen über die Unterart enthielt. Des Weiteren gab es vier Sequenzen der Unterart *G. c. antiquorum*, die eine 98 % Übereinstimmung zeigten. Demnach ist fraglich, ob die Sequenzen dieser drei Tiere bei NCBI für die korrekte Unterart hinterlegt wurden.

4 Diskussion

4.1 Probenrücklauf

Aus 26 verschiedenen zoologischen Institutionen konnten Proben von 78 Giraffen zur Verfügung gestellt werden. Alle Proben wurden korrekt gesammelt und versandt. Demnach war die Sammelanleitung verständlich und detailliert genug, um auch ohne mündliche Erklärung verstanden zu werden. Mit einer Rücklaufquote von 72,9 % war die Resonanz sehr hoch.

4.2 Etablierung der geeigneten Extraktionsmethode

Die DNA befindet sich in Haaren in den Wurzelscheidezellen der Haarwurzel. Die Beprobung von Haaren mit Haarwurzel ist jedoch schwierig, da Giraffen zu scheu sind, um Haare mit einer Pinzette zu entnehmen. Haare, die beispielsweise beim Streicheln des Tieres von alleine ausfallen, besitzen meist keine Haarwurzel mehr sondern bestehen nur noch aus toten Haarzellen und enthalten demnach nur sehr wenig und häufig degradierte DNA. Um eine ausreichende DNA-Menge für die Extraktion sicherzustellen, könnten mehrere Haare verwendet werden. Dann kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Probe mit Fremd-DNA verunreinigt wird. Wird hingegen nur ein einzelnes Haar für die DNA Extraktion genutzt, so kann die DNA-Menge sehr gering sein und im Pikogramm-Bereich liegen (Taberlet *et al.*, 1999). Da diese Art der Beprobung nicht zuverlässig erschien, wurden Haare als Untersuchungsmaterial ausgeschlossen.

Flüssiger Speichel wird genutzt, um DNA aus abgestoßenen Epithelzellen der Maulschleimhaut zu extrahieren. Da sich die Oberfläche der Epithelschicht im Maul innerhalb weniger Stunden erneuert, stehen große Mengen an Zellen als DNA-Quelle zur Verfügung. Bei Abstrichen der Maulschleimhaut werden die Epithelzellen an einem Wattestäbchen fixiert. Verglichen mit anderen nichtinvasiven Beprobungsmethoden ist der DNA-Gehalt bei dieser Methode am höchsten. Zudem kann die DNA auch bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen gelagert werden, ohne dass sie degradiert (Quinque *et al.*, 2006). Bei der Beprobung der Giraffen in der Zoom Erlebniswelt Gelsenkirchen wurde evaluiert, dass Maulschleimhautabstriche entnommen werden können, flüssige Speichelproben hingegen nur schwer zu erhalten sind. Daher wurden ausschließlich Abstriche der Maulschleimhaut für diese Studie in Betracht gezogen.

Von den insgesamt 78 beprobten Tieren waren 30 Mauschleimhautabstriche verfügbar. Dies zeigt, dass diese Methode nicht alleinig zur Beprobung angewendet werden konnte. Zudem war die Extraktion nicht bei allen Proben erfolgreich. Um eine ausreichende DNA-Menge gewährleisten zu können, müssen zwei Wattestäbchen gleichzeitig so oft wie möglich an der Innenseite der Wange entlang gestrichen werden. Es ist zu vermuten, dass dies bei scheuen Tieren nicht häufig genug durchgeführt werden konnte und die Menge der DNA für eine erfolgreiche Extraktion zu gering war.

Gewebe und Blut enthalten viele kernhaltige Zellen und stellen somit zuverlässige DNA-Quellen dar. Die Entnahme dieser Proben erfolgt jedoch invasiv, sodass dem Tier eine Verletzung zugeführt werden muss. Demzufolge stehen Gewebeproben ausschließlich dann zur Verfügung, wenn Tiere versterben. Blutproben hingegen können am lebenden Tier entnommen werden. Häufig sind Giraffen jedoch zu scheu, um ihnen direkt Blut abnehmen zu können. Als Alternative kann die Blutabnahme über Raubwanzen erfolgen. Dies ist jedoch eine Methode, die bislang nur in wenigen Zoos verbreitet ist. Dennoch konnten von fünf der sechs Giraffenunterarten Blut- und Gewebeproben gewonnen werden, welche zuverlässige Ergebnisse bei der Amplifikation der Mikrosatelliten lieferten. Somit konnten diese Proben zum einen als Positivkontrollen für die PCRs eingesetzt werden. Zum anderen konnten die Resultate der Kot- und Mauschleimhautproben mithilfe der Bandenmuster der Blutproben verifiziert werden.

Die Blutprobe einer Giraffe aus der Zoom Erlebniswelt Gelsenkirchen wurde durch eine Raubwanze gewonnen. Von dieser Wanze wurde DNA aus dem Gewebe des Abdomens sowie den Extremitäten extrahiert. Diese zwei Proben sollten als Negativkontrollen bei der PCR eingesetzt werden. Beide Proben der Wanze lieferten jedoch dieselben Genotypen wie die mittels der Raubwanze gewonnene Blutprobe der Giraffe. Da Mikrosatelliten sehr spezifische Marker sind, ist davon auszugehen, dass die DNA der Wanze mit DNA der Giraffe kontaminiert war. Die Kontamination des Abdomens wurde durch das Blut, die der Extremitäten durch den Kontakt zur Giraffe verursacht. Zwei weitere eingesetzte Negativkontrollen von einem Wasserfloh *Daphnia* sp. und einem Amazonenkärpfling *Poecilia* sp. lieferten keine Resultate bei der DNA-Amplifikation und bestätigten die Spezifität der Mikrosatelliten.

Die DNA in Kotproben ist in den vom Darm abgestoßenen Schleimhautzellen lokalisiert. Da das Sammeln von Kotproben einfach ist und große Mengen entnommen werden können, stellt diese nichtinvasive Beprobungsmethode eine besonders vorteilhafte DNA-Quelle dar (Wehausen *et al.*, 2004). Die Einfachheit der Probenentnahme war notwendig, da die Beprobung der Giraffen von den Mitarbeitern der zoologischen Institutionen durchgeführt wurde. Zudem musste der Versand des Probenmaterials unkompliziert und einfach

durchzuführen sein. Somit wurden für die hier vorliegende Studie Kotproben primär als Probenmaterial ausgewählt.

4.3 Extraktion des Probenmaterials

Die Extraktion der DNA war bei allen Gewebe-, Blut-, und Kotproben sowie bei vier Maulschleimhautabstrichen erfolgreich. Jedoch gab es große Unterschiede in der Qualität der Ergebnisse auf dem LI-COR Analyzer in Abhängigkeit des verwendeten Ausgangsmaterials. Die Blut- und Gewebeproben lieferten, wie zu erwarten war, starke und klare Banden, was auf einen hohen DNA-Gehalt hindeutete. Die Banden der Maulschleimhautabstriche waren hingegen eher schwach.

Problematik bei Kotproben

Zwei wesentliche Faktoren beeinflussen die Menge der DNA, die aus dem Kot eines Tieres extrahiert werden kann: zum einen ist dies die Menge der ursprünglich in der Probe enthalten DNA, zum anderen ist es die DNA-Menge, die nach dem Sammeln und der Lagerung der Probe noch vorhanden ist (Nsubuga *et al.*, 2004). Die DNA im Kot wird durch Endonukleasen degradiert, wobei die Nukleinsäuren zu Mononukleotiden reduziert werden. Um die Degradierung zu verhindern, müssen die Endonukleasen degradiert oder inaktiviert werden. Dies wird beispielsweise durch eine schnelle Austrocknung oder niedrige Temperaturen begünstigt (Hofreiter *et al.*, 2001). Auch sofortiges Einfrieren der Kotproben wirkt sich günstig auf die DNA-Konservierung aus. Die Aufrechterhaltung der Kühlkette ist bei dem Versand der Proben allerdings schwer umsetzbar (Nsubuga *et al.*, 2004). Weitere empfohlene Konservierungsmethoden sind die Trocknung der Faeces mit Silicagel (Wasser *et al.*, 1997) oder die Lagerung in 90 % Ethanol (Murphy *et al.*, 2002). Dies ist jedoch kostenintensiv und es besteht die Gefahr, dass das Ethanol beim Transport aus den Probengefäßen ausläuft. Um einen einfachen sowie kostengünstigen Versand durchzuführen, wurden die Kotproben ohne Zusätze in dicht verschließbaren Probengefäßen transportiert. Es wurde jedoch empfohlen, die Proben nach dem Sammeln für etwa eine Stunde zum Abkühlen und Trocknen im offenen Probengefäß zu belassen. Dies sollte die Bildung von Schimmel verhindern. Zudem wurde darauf hingewiesen, dass die Dauer der Lagerung bis zum Versand so kurz wie möglich sein sollte.

Alle Kotproben wurden korrekt versandt, wobei zwei Proben leicht verschimmelt waren. Die Präparation erfolgte unmittelbar nach dem Eintreffen der Proben. Die Faeces von Giraffen haben die Form von ovalen Pellets, wobei die Darmschleimhautzellen hauptsächlich auf der

Außenseite der Pellets lokalisiert sind. Die Verwendung von Material vom äußeren Rand erhöht somit die Erfolgsrate der Amplifikation verglichen mit homogenisierten Kotproben (Flagstad *et al.*, 1999). Daher wurden mit einem Skalpell 30 mg von der äußeren Schicht abgekratzt. Jede Probe bestand aus etwa fünf Pellets, sodass zur Präparation saubere und unverschimmelte Bereiche frei von Stroh, Erde und Pflanzenfasern ausgewählt werden konnten.

Die Extraktion der genomischen DNA sowie die Genotypisierung mit dem LI-COR Analyser waren bei allen 71 Proben erfolgreich. Die Qualität der Banden lag in einem Bereich von sehr schwach bis sehr stark. Starke Banden lieferten vor allem die Proben aus den Zoos in Gelsenkirchen, Dortmund und Duisburg, bei denen die Extraktion innerhalb von 24 Stunden nach der Probenentnahme erfolgte. Im Gegensatz dazu war jedoch auch die Extraktion der Probe aus Montpellier (GCU 9) erfolgreich, bei welcher der Versand aufgrund des Poststreiks etwa 28 Tage dauerte. Die Zeitspanne zwischen dem Sammeln und dem Extrahieren der Probe hat große Auswirkungen auf die Erfolgsraten der Amplifikation. Die besten Ergebnisse werden für sehr frische Proben erzielt (Murphy *et al.*, 2007), was hier bestätigt werden konnte. Zudem bietet die Beschaffenheit der Giraffenfaeces einen Vorteil: da der Kot aus kleinen Pellets besteht, trocknen diese nach dem Absetzen schnell aus. Die äußere Schicht mit den Darmschleimhautzellen trocknet als erstes, sodass die DNA darin am wenigsten mikrobiell degradiert wird. Gute Amplifikationsergebnisse aufgrund der pelletförmigen Beschaffenheit der Faeces sowie der auch hier angewandten Präparationstechnik konnten bereits in einer Studie mit Dickhornschafen erzielt werden (Wehausen *et al.*, 2004).

4.4 Optimierung des PCR-Protokolls

Faeces enthalten vom Darm abgestoßene Zellen sowie eine komplexe Zusammensetzung anderer Komponenten. Dazu zählen unverdautes Futter, Verdauungsenzyme, Sekret, Gallensalze, Bilirubin und Mikroorganismen (Sidransky *et al.*, 1992). Es konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene Substanzen im Kot-Extrakt als PCR-Inhibitoren wirken und die Wirkung der Taq-Polymerase unterdrücken (Höss *et al.*, 1992). Besonders Herbivore stellen eine große Herausforderung bei der Untersuchung von DNA aus Kotproben dar, weil sekundäre Pflanzenstoffe ebenfalls inhibitorische Effekte auf die PCR haben (Fernando *et al.*, 2003). Um die Menge der Inhibitoren zu reduzieren, wurde die DNA verschieden stark verdünnt. Durch eine Verdünnung wird jedoch auch die Menge des DNA-Templates vermindert, wodurch nicht mehr genügend Ausgangsmaterial für die Amplifikation vorhanden sein kann. Dies schien sich hier zu bestätigen, da die Amplifikation der

verdünnten Proben nicht erfolgreich war. Im Gegensatz dazu erzielten Proben mit doppeltem DNA-Volumen manchmal dort Ergebnisse, wo die einfache Menge nicht ausreichend war. Es ist also davon auszugehen, dass der DNA-Gehalt im Extrakt häufig nur sehr gering war. Eine vorausgehende Messung des DNA-Gehaltes hätte jedoch keine relevanten Informationen über die einzusetzende DNA-Menge ergeben. Bei einer solchen Messung kann nicht zwischen der Ziel-DNA des Tieres und der zusätzlich extrahierten DNA von Bakterien oder Pflanzen unterschieden werden, welche ebenfalls im fäkalen Extrakt vorliegen (Morin *et al.*, 2001).

Um den Reinheitsgrad der DNA-Extrakte zu verbessern und PCR-Inhibitoren zu entfernen, wurde die DNA gefällt. Die Fällungslösung AquaPrecipi™ ist ein effektives Reagens, welches eine 100 % PCR-Erfolgsrate verspricht. Obwohl die Ergebnisse besser waren als die ungefallter DNA, war die Amplifikation der DNA-Proben noch nicht zuverlässig. Daher wurde die DNA ein zweites Mal mit Ethanol und Natriumacetat gefällt. Diese Fällung erhöhte die Zuverlässigkeit der Amplifikation und die Stärke der Banden nochmals. Des Weiteren wurde den PCR-Ansätzen BSA hinzugefügt. Dieses Protein stabilisiert die Taq-Polymerase und verhindert die Inhibition der PCR (Höss *et al.*, 1992).

4.5 Qualität der Mikrosatellitenloci

4.5.1 Zuverlässigkeit der Amplifikationen

Die Auswahl der Mikrosatelliten erfolgte nach verschiedenen Kriterien. Zum einen wurden Marker verwendet, mit denen bereits verlässliche Ergebnisse in populationsgenetischen Studien erzielt werden konnten (Brenneman *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2007; Huebinger *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurden neue Loci eingesetzt, die speziell für die Analyse von fäkaler DNA entwickelt wurden (Crowhurst *et al.*, 2013). Da alle Mikrosatelliten für die Unterart *G. c. tippelskirchi* entwickelt worden sind, wurden zudem zwei Loci getestet, die innerhalb aller Unterarten übertragen werden konnten (Carter *et al.*, 2012).

Von den zehn getesteten Loci aus Huebinger *et al.* (2002) konnten sieben erfolgreich und zuverlässig amplifiziert werden. Der Locus 11HDZ102 konnte an allen Proben genotypisiert werden. Fünf Loci hatten einen geringen Datenausfall zwischen 3,85 % und 6,41 %. Der Datenausfall bei dem Locus 11HDZ665 war mit 20,51 % sehr hoch. Dieser Locus wurde aufgrund seiner hohen Variabilität trotzdem in die statistischen Analysen mit einbezogen.

Die von Crowhurst *et al.* (2013) entwickelten Mikrosatelliten schienen sehr vielversprechend zu sein, da diese an degradiertes, fäkales DNA getestet wurden. Die Zuverlässigkeit dieser Loci wurde jedoch noch nicht durch eine weitere Studie verifiziert. Von den hier getesteten

fünf Loci war die Amplifikation zwar bei vier Loci erfolgreich, jedoch war die Qualität der Banden auf dem LI-COR Analyzer zum Großteil sehr schlecht. Die Banden waren häufig diffus oder verschmiert. Zudem gab es auch nach der Optimierung der PCR-Protokolle noch hohe Datenausfälle. Wohingegen bei Huebinger *et al.* (2002) HotMaster Taq deutlich bessere Resultate hervorbrachte als Euro Taq, waren die Ergebnisse der Amplifikation mit HotMaster hier schlechter. Dies wurde vermutlich durch die hohen Annealing Temperaturen der Loci von 60 °C und 63 °C bedingt. Das Temperaturoptimum der HotMaster Taq für die Elongation lag bei 65 °C. Durch den geringen Temperaturunterschied war eine klare Trennung der beiden PCR-Schritte nur schlecht möglich. Die Amplifikation mit Euro Taq, bei der die Elongation bei 72 °C erfolgt, war zudem auch hier nicht zuverlässig. Auch der Einsatz von drei weiteren Taq-Polymerasen brachte keinen Erfolg.

Im Gegensatz zu den Kotproben funktionierten die Loci für die Blut- und Gewebeproben sehr gut. Die Mikrosatelliten wurden an fäkaler DNA getestet, wobei die Beprobung in Afrika erfolgt war. Es wurden nur frische oder bereits getrocknete Proben gesammelt (Crowhurst, 2012). Demnach könnte die Degradierung der DNA aufgrund des trockenen Klimas verhindert worden und der DNA-Gehalt im Extrakt somit höher gewesen sein. Aufgrund der hier erzielten Resultate muss angezweifelt werden, dass diese Loci sich besonders gut für die Analyse degradierter DNA eignen.

Die Untersuchung der zwei Loci aus Carter *et al.* (2012) umfasste nur wenige Test-PCRs. Diese Marker konnten jedoch in keiner PCR erfolgreich amplifiziert werden. Eine mögliche Ursache können Mutationen in den flankierenden Regionen der Mikrosatelliten sein. Veränderungen der Nukleotidsequenz, beispielsweise durch Punktmutationen, können das Annealing des Primers an das DNA-Template und somit die Amplifikation verhindern (Chapuis & Estoup, 2007; Dakin & Avise, 2004)

4.5.2 Polymorphie der Mikrosatelliten

In dieser Studie wurden sieben Mikrosatellitenloci für die Untersuchung der 78 Giraffen genutzt. Die Auflösung der Marker war hoch genug, sodass jedem Individuum ein einzigartiger Multilocus-Genotyp zugeordnet werden konnte. Die Loci wiesen unterschiedlich viele Allele auf. Am wenigsten variabel war der Locus 11HDZ102 mit vier Allelen, die höchste Variabilität zeigten die Loci 11HDZ665 und 11HDZ562 mit jeweils zwölf Allelen. Im Durchschnitt lag die Anzahl der Allele bei 9,1.

Zwei Publikationen können zum Vergleich herangezogen werden. Bei der Etablierung der Mikrosatelliten wurde für die identischen sieben Loci eine durchschnittliche Anzahl von 4,7 Allelen pro Locus gefunden. Allerdings erfolgten die Untersuchungen an nur 25 Individuen

einer einzigen Unterart (Huebinger *et al.*, 2002). Demnach war eine geringere Variabilität zu erwarten. Eine weitere Studie konnte hingegen durchschnittlich 12,4 Allele pro Locus detektieren. Die Anzahl der untersuchten Giraffen lag mit 381 Tieren jedoch deutlich höher (Brown *et al.*, 2007), wodurch die größere Variabilität bedingt wurde.

Innerhalb der Unterarten waren die Loci verschieden divers, wobei drei Loci in einigen Unterarten monomorph waren. Diese geringe Alleldiversität wurde vermutlich durch die geringe Anzahl der beprobten Individuen hervorgerufen. Da zudem einige Tiere nah verwandt waren, ist anzunehmen, dass die Loci weniger divers sind als die von nicht verwandten Individuen.

4.5.3 Mögliche Genotypisierungsfehler

Genotypisierungsfehler können zwei verschiedene Konsequenzen haben: durch Nullallele und dem damit einhergehenden Homozygoten Exzess wird die genetische Diversität reduziert (Paetkau & Strobeck, 1995). Das fehlerhafte Scoren von Stotterbanden als Allele hingegen überschätzt die genetische Diversität.

Stotterbanden kommen vor allem bei dinukleotiden Mikrosatelliten vor (Taberlet *et al.*, 1996), welche ausschließlich in dieser Studie untersucht wurden. Sie werden durch das Verrutschen der Taq-Polymerase am DNA-Template während der Amplifikation verursacht (Taberlet *et al.*, 1996). Dabei entstehen Amplifikationsartefakte, welche sich in ihrer Länge vom Original-Template unterscheiden (Shinde *et al.*, 2003) und fälschlich als Allele interpretiert werden. Ein homozygotes Individuum könnte somit irrtümlich als heterozygot angesehen werden. Dieser Fehler wird erkannt, wenn dies gleichzeitig bei einem heterozygoten Genotypen auftritt (Goossens *et al.*, 1998). Hinweise auf Stotterbanden gab es lediglich bei einem einzigen Locus innerhalb einer Population.

Das Auftreten von Nullallelen kann verschiedene Gründe haben. Zum einen werden kurze Allele häufig effizienter amplifiziert als große, sodass bei einem heterozygoten Individuum nur das kleine Allel detektiert wird (Dakin & Avise, 2004). Dieses „Large Allel Dropout“ konnte an keinem der hier analysierten Loci nachgewiesen werden. Des Weiteren können Nullallele durch eine geringe Qualität und Quantität des DNA-Templates verursacht werden. Ein qualitativ schlechtes DNA-Template kann an einem bestimmten Locus in manchen Individuen homozygot, in anderen Individuen jedoch heterozygot Genotypen hervorbringen (Dakin & Avise, 2004). Von den sieben hier untersuchten Mikrosatelliten gab es bei fünf Loci in vier Unterarten Hinweise auf Nullallele und Homozygoten Exzesse. Es waren zumeist Loci betroffen, die auch eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium aufwiesen. Diese Abweichungen können als Nullallele fehlinterpretiert (Chakraborty *et al.*,

1992) und die Rate der Nullallele somit erheblich überschätzt worden sein (van Oosterhout *et al.*, 2006). Da eine geringe Rate an Nullallelen viele Analysen jedoch nur unwesentlich beeinflusst (Dakin & Avise, 2004), konnten alle betroffenen Loci in der Auswertung berücksichtigt werden.

4.5.4 Beurteilung des Hardy-Weinberg-Equilibriums und des Linkage Disequilibriums

Bei dem Test des Hardy-Weinberg-Equilibriums (HWE) wird die tatsächlich beobachtete Heterozygotie mit der erwarteten Heterozygotie verglichen. Fünf Unterarten wurden an jeweils sieben Loci untersucht. Dabei konnten in vier Unterarten Abweichungen beobachtet werden. Alle Abweichungen vom HWE waren charakterisiert durch ein Heterozygotiedefizit.

Eine Ursache für Abweichungen kann die Paarung von nah verwandten Individuen sein. Durch Inzucht innerhalb einer Population wird ein Homozygoten-Exzess verursacht. Der Nachwuchs enthält jeweils ein Allel der beiden Elterntiere für jeden Locus (Webster & Reichart, 2005). Wenn die Elterntiere bereits verwandt sind, sind ihre Allele häufig identisch und der Nachwuchs zeigt einen homozygoten Genotyp. Zudem waren die Populationsgrößen in dieser Studie sehr klein. Von *G. c. tippelskirchi* konnte nur ein Individuum, von den übrigen Unterarten nur zwischen vier und 13 Individuen beprobt werden. Daher ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass zufällig Tiere beprobt wurden, die an mehreren Loci homozygote Genotypen aufwiesen. Es ist zu vermuten, dass bei einer größeren Probenmenge die Verteilung der Homozygoten und Heterozygoten ausgeglichener ist.

Die hier gefundenen Abweichungen wurden auch bereits in früheren Studien beschrieben. Zur Etablierung der Mikrosatelliten wurden 25 Individuen von *G. c. tippelskirchi* untersucht. Die durchschnittliche erwartete Heterozygotie für 16 Loci lag bei 0,535, die beobachtete Heterozygotie wich mit einem Wert von 0,36 davon ab, wobei Inzucht die wahrscheinlichste Ursache dafür war (Huebinger *et al.*, 2002). Auch in einer weiteren Studie mit 14 Loci konnten Abweichungen vom HWE festgestellt werden, wobei es sich auch hier hauptsächlich um Heterozygotie-Defizite handelte (Brown *et al.*, 2007). Hier wich die durchschnittlich beobachtete Heterozygotie mit einem Wert von 0,431 von der erwarteten Heterozygotie mit einem Durchschnitt von 0,717 ab.

Das Linkage Disequilibrium zeigt an, ob zwei oder mehr Loci gemeinsam vererbt werden. Dies tritt auf, wenn die Loci im Genom sehr nah beieinander liegen. Zwar konnten miteinander verlinkte Loci gefunden werden, es zeigte sich aber kein durchgehendes Muster für einzelne Loci innerhalb verschiedener Unterarten. Aus diesem Grund konnten alle Marker für die weiteren Untersuchungen verwendet werden.

4.7 Untersuchungen zur Populationsdifferenzierung

Zur Beurteilung der genetischen Differenzierung der Unterarten wurden F_{ST} -Werte berechnet. Dabei trat die geringste Differenzierung mit einem Wert von 0,17430 zwischen den Unterarten *G. c. reticulata* und *G. c. rothschildi* auf, sowie jeweils zwischen *G. c. antiquorum* und den zwei bereits genannten Unterarten. Werden die Verbreitungsgebiete dieser drei Unterarten in Afrika betrachtet (Einleitung, S. 5), so ist erkennbar, dass diese nah beieinander liegen. Da zudem keine geographische Barrieren bestehen (Brown *et al.*, 2007), könnte der Grad der Differenzierung gering sein. Dies sollte ebenso für die Differenzierung zwischen *G. c. tippelskirchi* und *G. c. reticulata* bzw. *G. c. rothschildi* zutreffen. Die F_{ST} -Werte zeigten dies auch an, sie waren jedoch nicht signifikant. Die Differenzierung zwischen den übrigen Unterarten war deutlich stärker, wobei diese zwischen den südlich verbreiteten Giraffen *G. c. giraffa* und der nördlich verbreiteten Unterart *G. c. antiquorum* mit einem F_{ST} -Wert von 0,57626 am größten war. Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus einer populationsgenetischen Studie, welche wildlebende Individuen von sechs Unterarten in Afrika untersucht hat (Brown *et al.*, 2007). Die F_{ST} -Werte lagen in einem Bereich von 0,113 bis 0,466, wobei die geringste Differenzierung zwischen den nördlichen lebenden Unterarten und die größte Differenzierung zwischen den nördlich und südlich verbreiteten Unterarten festgestellt werden konnte.

Mit einer Principal Component Analyse (PCA) können multidimensionale Daten auf wenige Variablen reduziert und anschließend graphisch dargestellt werden. Die Analyse ergab für die einzelnen Populationen ein ähnliches Bild wie auf dem Niveau aller Einzelindividuen. Die Unterarten *G. c. angolensis* und *G. c. giraffa* wurden zusammengefasst und entfernt von den anderen Unterarten gruppiert. Auch dies deckt sich mit den Verbreitungsgebieten in Afrika, bei der diese zwei Unterarten deutlich weiter südlich lokalisiert sind als die übrigen. Die Tiere unbekannter Unterart wurden zu den drei Unterarten *G. c. antiquorum*, *G. c. reticulata* sowie *G. c. rothschildi* gruppiert, wobei die letztgenannte die deutlichste Überschneidung aufwies. Die PCA lieferte bereits erste Hinweise über die Zuordnung der unbekannteren Tiere zu den Unterarten. Für eine korrekte Zuordnung ist jedoch eine Clusteranalyse erforderlich.

4.8 Differenzierung der sechs bekannten Unterarten durch Clusteranalysen

Bayessche Clustermethoden nutzen genetische Informationen, um die Zugehörigkeit von Individuen zu Populationen zu ermitteln. Basierend auf dem Multilocus-Genotyp werden entweder einzelne Individuen oder nur Fraktionen ihres Genoms zu einer Anzahl von Clustern zugeordnet (Chen *et al.*, 2007). Zunächst wurden ausschließlich Tiere von sechs bekannten Unterarten untersucht, bei denen zudem die Genotypisierung an allen sieben

Mikrosatellitenloci vollständig erfolgreich war. Das Programm STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) kalkulierte vier Cluster, das Programm TESS (Chen *et al.*, 2007) hingegen interpretierte zwölf Cluster als wahrscheinlichste Anzahl. Die Analyse mit TESS war somit deutlich sensitiver als die Analyse mit STRUCTURE. Jedoch konnten nur sieben der zwölf Cluster zur Differenzierung der Individuen genutzt werden. Die übrigen fünf Cluster waren zu wenig informativ, da ihr prozentualer Anteil sehr niedrig war. Die große Differenz in der Clusteranzahl wird wahrscheinlich dadurch bedingt, dass beide Programme verschiedene bayessche Algorithmen nutzen.

Bei dem Vergleich der Barplots konnte festgestellt werden, dass beide Programme trotz der verschiedenen Anzahl an Clustern eine übereinstimmende Populationsstruktur fanden. So unterschieden beide Programme die vier Großgruppen 1. *G. c. angolensis* / *G. c. giraffa*, 2. *G. c. antiquorum*, 3. *G. c. rothschildi* sowie 4. *G. c. reticulata* / *G. c. tippelskirchi*. Allerdings war die Differenzierung der Großgruppen durch die höhere Anzahl der Cluster bei TESS besser möglich. So sahen die Unterarten *G. c. angolensis* und *G. c. giraffa* in STRUCTURE vollkommen identisch aus, bei TESS hingegen waren geringfügige Unterschiede sichtbar (Abb. 4.1). Da diese beiden Unterarten im Süden des afrikanischen Kontinents verbreitet sind, ist anzunehmen, dass sie sich genetisch ähnlich sind, von den übrigen Unterarten aber gut unterschieden werden können. Diese Annahme konnte anhand der Analyse bestätigt werden.

Auch die Unterscheidung von zwei weiteren Unterarten konnte mittels TESS detaillierter erfolgen als mit STRUCTURE (Abb. 4.1). Anhand der Ergebnisse von STRUCTURE zeigten einige Tiere von *G. c. reticulata* (GCE 1 - 6) anteilig dasselbe Cluster wie die Unterart *G. c. rothschildi*. Würde ausschließlich dieser Barplot berücksichtigt, könnte auch eine Hybridisierung angenommen werden. Die Ergebnisse von TESS hingegen waren höher auflösend und zeigten, dass die fraglichen Tiere zusätzlich ein Cluster aufwiesen, welches bei der Rothschildi-Gruppe nur zu einem geringen prozentualen Anteil vertreten war. Eine Hybridisierung konnte somit ausgeschlossen werden. Es ist wahrscheinlicher, dass die Unterschiede innerhalb von *G. c. reticulata* auf verschiedene geographische Verbreitungsgebiete in Afrika zurückzuführen sind. Diese Unterart ist in mehreren Regionen verbreitet und die einzelnen Populationen lassen sich genetisch voneinander unterscheiden (Brown *et al.*, 2007).

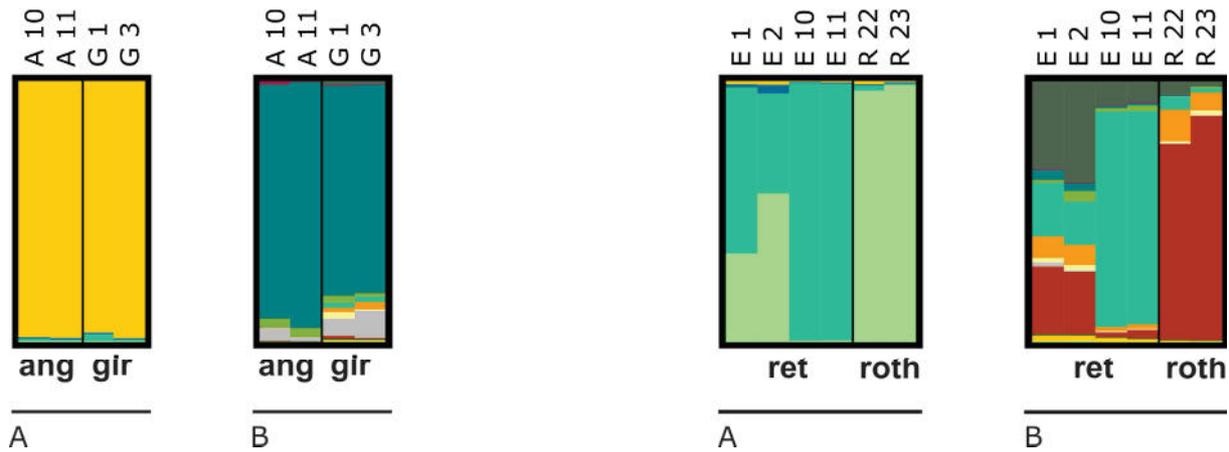


Abbildung 4.1: Vergleich von Barplots der Analysen mit A STRUCTURE und B TESS. Verschiedene Farben stellen unterschiedliche Cluster dar. Die vertikale Achse definiert die prozentuale Zugehörigkeit zu den Clustern. Angegeben werden die Probenamen der Individuen und die Unterarten

Die Unterart *G. c. tippelskirchi* zeigte ein ähnliches Muster der Cluster wie *G. c. reticulata*. Auch diese beiden Unterarten sind in Afrika in geographisch benachbarten Gebieten verbreitet. Somit könnte die genetische Differenzierung zwischen den beiden Gruppen nur gering sein. Da allerdings nur ein Tier von *G. c. tippelskirchi* beprobt wurde, kann über das genetische Muster der ganzen Unterart keine Aussage getroffen werden. Es ist denkbar, dass das beprobte Tier ein Hybride aus diesen beiden Unterarten war und die Clusteranalyse daher die große Übereinstimmung gefunden hat.

Dass die Unterarten *G. c. angolensis* und *G. c. giraffa* sowie *G. c. reticulata* und *G. c. tippelskirchi* in STRUCTURE nicht und in TESS nur geringfügig unterschieden werden können, hat mehrere Gründe. Zum einen war die Probenanzahl hier sehr gering, sodass unterartenspezifische Unterschiede nicht deutlich genug dargestellt werden können. Die Anzahl der Proben wurde begrenzt durch ihre Verfügbarkeit innerhalb der europäischen Zoos. Die Probe der Unterart *G. c. tippelskirchi* stammte beispielsweise von dem letzten in europäischen Institutionen gehaltenen Individuum dieser Unterart. Von dem bereits verstorbenen Tier wurde eine Gewebeprobe konserviert, die für diese Studie zur Verfügung gestellt werden konnte.

Die hier erzielten Ergebnisse können mit einer Studie verglichen werden, welche 381 wildlebende Giraffen aus sechs Unterarten untersucht hat (Brown *et al.*, 2007). Fünf der Unterarten waren mit den hier untersuchten identisch, allerdings wurde statt *G. c. angolensis* dort *G. c. peralta* analysiert. Die Genotypisierung erfolgte anhand von 14 Mikrosatelliten, von denen sieben mit den sieben hier verwendeten identisch waren. In dieser Studie konnten sowohl alle sechs Unterarten mithilfe der 14 Loci aufgelöst werden als auch die Unterarten *G. c. rothschildi* und *G. c. tippelskirchi* jeweils in zwei, *G. c. reticulata* in drei separate

Populationen unterteilt werden. Dies zeigt, dass genetische Differenzen detaillierter dargestellt werden können, wenn die Anzahl der untersuchten Individuen sowie die Anzahl der analysierten Mikrosatelliten erhöht werden.

In der vorliegenden Studie waren jedoch sowohl die Probenanzahl als auch die Menge der Mikrosatellitenloci durch die Rahmenbedingungen limitiert. Aus diesem Grund musste evaluiert werden, wie die Zuordnung der Tiere unbekannter Unterart zuverlässig erfolgen kann. Die kombinierte Analyse von STRUCTURE und TESS erwies sich für diese Fragestellung als sehr geeignet. Die Clusteranalyse mit TESS war deutlich sensitiver als die mit STRUCTURE, wodurch geringfügige genetische Unterschiede besser dargestellt werden konnten. Für die Zuordnung der Tiere mit unbekanntem Unterartstatus war die Analyse mit STRUCTURE besser geeignet, da sich die Großgruppen homogener charakterisieren ließen.

4.9 Zuordnung von Tieren unbekannter Unterart durch Clusteranalysen

Die Zuordnung der unbekannteren Tiere erfolgte ebenfalls anhand einer Clusteranalyse. 27 Tiere mit unbekanntem Unterartstatus konnten gegen 51 Referenzproben abgeglichen werden. Zudem wurden die Informationen aus dem Zuchtbuch über die Abstammung der Giraffen mit einbezogen.

Den Unterarten *G. c. angolensis* und *G. c. giraffa* wurden keine Individuen zugeordnet. Dies deckt sich mit den Daten aus dem Zuchtbuch, denn bei keinem der unbekannteren Tiere fanden sich diese Unterarten in der Abstammungslinie. Zudem sind bei einem Gesamtbestand von 890 Giraffen die Unterarten *G. c. angolensis* (21 Tiere, 2,4 %) und *G. c. giraffa* (52 Tiere, 5,8 %) am seltensten in europäischen Zoos vertreten (Jebram, 2014). Demnach wurden auch zu Beginn der Haltung von Giraffen in Zoos deutlich weniger Tiere dieser Unterarten eingefangen.

Alle 27 Tiere wurden den Clustern der drei am häufigsten in europäischen Zoos vorkommenden Unterarten *G. c. antiquorum* (86 Tiere, 9,6 %), *G. c. reticulata* (162 Tiere, 18,2 %) und *G. c. rothschildi* (402 Tiere, 45,2 %) zugeordnet (Jebram, 2014). Die Clusteranalyse ordnete 14 Giraffen eindeutig nur einer Unterart zu. Beim Abgleich mit den Zuchtbuchdaten konnte jedoch festgestellt werden, dass nur bei elf Tieren die analysierte Unterart mit denen übereinstimmte, die auch in der Abstammungslinie dieser Tiere zu finden war. Zwei Tiere, bei denen die Unterart *G. c. antiquorum* erwartet wurde, erschienen in der Analyse als *G. c. rothschildi* (GCU 26) und *G. c. reticulata* (GCU 25). Ein weiteres Tier (GCU 3) hätte der Rothschildi-Gruppe zugeordnet werden müssen, die Analyse ergab jedoch eine Zugehörigkeit zu *G. c. reticulata*. Demnach muss bei diesen drei Individuen von einer

Hybridisierung ausgegangen werden. Bei 13 Tieren war bereits anhand der Barplots erkennbar, dass eine Hybridisierung stattgefunden haben muss.

Die erzielten Resultate wurden schließlich unter Berücksichtigung der bei manchen Proben aufgetretenen Datenausfälle erneut betrachtet. Bei fehlenden Daten kann die Zuordnung zu den Clustern ungenau oder fehlerhaft sein. Fehlende Daten lagen jedoch hauptsächlich bei Tieren vor, die zweifelsfrei als Hybride klassifiziert werden konnten. Es ist davon auszugehen, dass ein Vorhandensein dieser Daten keinerlei Einfluss auf diese eindeutigen Resultate gehabt hätte.

4.10 Einsichten der phylogenetischen Stammbäume

Die Sequenzanalyse wurde mit dem mitochondrialen Marker D-loop durchgeführt. Dieser Marker wurde bereits erfolgreich für Fragestellungen zur Populationsstruktur von Giraffen genutzt und war variabel genug, um die Unterarten voneinander zu differenzieren (Bock *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2007; Fennessy *et al.*, 2013; Hassanin *et al.*, 2007). Dies konnte mit den aus NCBI extrahierten Sequenzen bestätigt werden. Alle Unterarten konnten anhand ihrer D-loop Sequenz eindeutig identifiziert werden. Ein mitochondrialer Marker wird bei nahezu allen Organismen ausschließlich in der mütterlichen Linie vererbt (Stoneking *et al.*, 1991). Daher wurden für die Analyse die neun Tiere ausgewählt, bei denen die Abstammung der maternalen Linie unbekannt war. Die Amplifikation des D-loop gelang bei drei Proben, wobei es sich um zwei Blutproben und eine Kotprobe handelte. Die Sequenz wies eine Länge von 690 bp auf. Da die DNA aus Kotproben meist fragmentiert vorliegt, kann die Amplifikation von langen Sequenzen schwierig sein (Frantzen *et al.*, 1998). Es ist davon auszugehen, dass in den Kotproben, welche keine Resultate lieferten, die DNA bereits zu stark degradiert war, um eine Sequenz dieser Länge erfolgreich zu amplifizieren.

Mit einer Länge von 690 bp war die Sequenz länger als die des D-loop, welche 429 Nukleotide umfasst (Brown *et al.*, 2007). Die Alignierung mit dem Mitogenom der Giraffe zeigte, dass die Sequenz auch das tRNA-Tyr Gen sowie einen Teil des Cytochrom B Gens beinhaltete. Zur Untersuchung des D-loop wurde die Sequenz daher auf die entsprechende Länge gekürzt. Die drei erfolgreich sequenzierten Proben wiesen vollständig identische Sequenzen auf. Bei der Zuordnung zu einer der Unterarten traten jedoch Widersprüche auf. Beim Abgleich der Sequenz mittels BLAST wurde eine 100 % Übereinstimmung mit einer Sequenz gefunden, bei welcher keine Information zur Unterart angegeben war. Es konnte recherchiert werden, dass diese Sequenz auf ein im Zoo Amsterdam beprobtes Tier zurückgeht, bei welchem es sich ausschließlich um die Unterart *G. c. reticulata* handeln konnte. Im phylogenetischen Stammbaum wurden die drei untersuchten Sequenzen jedoch

eindeutig zu der Unterart *G. c. rothschildi* gruppiert. Um diese Unstimmigkeit detaillierter zu untersuchen, wurde erneut ein Stammbaum erstellt, bei dem ausschließlich die Unterarten *G. c. reticulata* und *G. c. rothschildi* berücksichtigt wurden. Außerdem wurde auch die Referenz der Giraffe aus Amsterdam in die Analyse mit eingeschlossen. Im phylogenetischen Stammbaum wurde dieses Tier gemeinsam mit den drei untersuchten Tieren gruppiert, was den Erwartungen aufgrund der 100 % Übereinstimmung entsprach. Diese vier Tiere wurden erneut nah bei *G. c. rothschildi* platziert und waren deutlich von der Unterart *G. c. reticulata* zu differenzieren. Damit konnte das Ergebnis der ersten Analyse verifiziert werden. Da auch das Tier aus Amsterdam der Rothschildi-Gruppe zugehörig war, ist eine Hybridisierung als Ursache wahrscheinlich. Bei einer Hybridisierung kann ein Individuum zwar aufgrund seiner charakteristischen Fellzeichnung einer Unterart zugeordnet werden, die mitochondriale DNA hingegen ist spezifisch für eine andere Unterart (Groves & Grubb, 2011). Es ist daher nicht auszuschließen, dass das fragliche Tier als *G. c. reticulata* eingefangen und im Zuchtbuch dokumentiert wurde, es sich jedoch um einen *G. c. reticulata-rothschildi*-Hybriden handelte. Da die Verbreitungsgebiete dieser beiden Unterarten sehr nah beieinander liegen, ist eine Hybridisierung möglich und konnte bereits nachgewiesen werden (Brown *et al.*, 2007).

Dieses Phänomen könnte auch die Ursache für die isolierte Platzierung der drei Tiere *G. c. reticulata* 7 sowie *G. c. rothschildi* 11 und 12 im phylogenetischen Stammbaum sein. Der Abgleich mit BLAST ergab für die beiden letztgenannten eine 100 % Übereinstimmung mit *G. c. tippelskirchi*. Da die charakteristischen Fellmuster dieser beiden Unterarten sich sehr gut unterscheiden lassen, wird nicht von einer Verwechslung bei der Beprobung ausgegangen. Wahrscheinlicher ist eine Hybridisierung, bei der die Tiere die Fellzeichnung von *G. c. rothschildi* aber die mitochondriale DNA von *G. c. tippelskirchi* trugen. Auch für diese Unterarten konnte bereits eine Hybridisierung beschrieben werden (Brown *et al.*, 2007). Für die Sequenz von *G. c. reticulata* 7 konnte in der NCBI-Datenbank keine Referenz mit 100 % Übereinstimmung gefunden werden, bei der Informationen über die Unterart hinterlegt waren. Mit einer 98 % Übereinstimmung war *G. c. antiquorum* der Sequenz genetisch am nächsten. Für diese Unstimmigkeit sind zwei mögliche Ursachen denkbar. Zum einen könnte dieses Tier, sofern es der Unterart *G. c. reticulata* angehört, aus einem anderen geographischen Gebiet kommen als die übrigen hinterlegten Referenzen. Dann wäre jedoch eine größere Ähnlichkeit zu diesen Tieren zu erwarten. Zum anderen wäre denkbar, dass dieses Tier der Unterart *G. c. camelopardalis* angehört, bzw. ein Hybride aus diesen beiden Unterarten ist und aufgrund der Fellzeichnung *G. c. reticulata* zugeordnet wurde. Auch diese beiden Unterarten sind geographisch nah beieinander verbreitet. Für *G. c. camelopardalis* gibt es in der Datenbank von NCBI allerdings keine Sequenzen, wodurch ein Abgleich mit dieser Unterart nicht möglich war.

Anhand der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die drei untersuchten Tiere GCU 3, GCU 19 und GCU 20 die mitochondriale DNA von *G. c. rothschildi* aufwiesen. Demnach lassen sich auch Rückschlüsse auf die mitochondriale DNA in der maternalen Abstammungslinie dieser Tiere ziehen. Da die Vererbung der Mitochondrien allerdings ausschließlich maternal erfolgt, kann nicht unterschieden werden, ob es sich bei den fraglichen Muttertieren um die Unterart *G. c. rothschildi* oder um Rothschildi-Hybride handelt. Aus diesem Grund wurden nochmals die Stammbäume der Tiere sowie die Clusteranalyse betrachtet. In den Abstammungslinien dieser Tiere war neben der unbekannten maternalen Linie ausschließlich die Unterart *G. c. rothschildi* in der paternalen Linie vertreten. Demnach wäre eine Zuordnung zu dieser Unterart auch bei der Clusteranalyse zu erwarten gewesen. Alle drei Tiere zeigten jedoch deutlich unterschiedliche Ergebnisse. Das Tier GCU 19 wurde *G. c. rothschildi*, das Tier GCU 3 wurde *G. c. reticulata* und das Tier GCU 20 zu jeweils 50 % *G. c. antiquorum* und *G. c. rothschildi* zugeordnet. Die beiden letztgenannten Tiere stammen von denselben Elterntieren ab, wobei das Muttertier (0-1263) unbekannter Unterart war. Hinzu kommt, dass keinerlei Informationen über die Elterntiere dieses Tieres bekannt waren. Demnach muss davon ausgegangen werden, dass eine Hybridisierung stattgefunden hat und bereits das Muttertier (0-1263) ein Rothschildi-Hybride war. Dies konnte durch die Analysen eindeutig verifiziert werden.

Für das Tier GCU 19 konnte in beiden Analysen die Unterart *G. c. rothschildi* ermittelt werden. Dieses Tier stammt, ebenso wie das Tier GCU 8, von demselben Muttertier (0-2403) ab. Die Giraffe GCU 8 konnte als Antiquorum-Rothschildi-Hybrid definiert werden. Demnach kann bereits das Muttertier, über dessen Abstammung keine Informationen vorliegen, ein Hybride dieser beiden Unterarten gewesen sein. Denkbar wäre aber auch, dass der genetische Anteil der Unterart *G. c. antiquorum* bei dem Tier GCU 8 aus der paternalen Linie stammt. Eine eindeutige Aussage über den Status des Muttertieres kann somit nicht getroffen werden.

4.11 Konsequenzen für das Zuchtmanagement

Von den 27 untersuchten Tieren unbekannter Unterart konnten elf Tiere einer spezifischen Unterart zugeordnet werden. Obwohl teilweise Hybridisierungen in den Abstammungslinien dieser Tiere nachgewiesen werden konnten, gibt es aufgrund der Clusteranalyse keine Hinweise auf Hybridisierungen im Genom. Es ist davon auszugehen, dass die Gene der nicht erwünschten Unterart durch Rückkreuzungen verschwunden sind. Anhand dieser Ergebnisse kann eine Zucht mit diesen Tieren empfohlen werden. Es handelt sich um die Tiere, GCU 2, GCU 4, GCU 5, GCU 9, GCU 10, GCU 11, GCU 19 und GCU 21 der Unterart

G. c. rothschildi, wobei das Tier GCU 19 bereits verstorben ist, sowie um die Tiere GCU 12, GCU 16 und GCU 18 der Unterart *G. c. reticulata*. Bei den übrigen 16 Tieren konnten Hybridisierungen eindeutig nachgewiesen werden. Demnach sollten diese Tiere und alle ihre Nachkommen von der Zucht ausgeschlossen werden. Ebenso sollte der Unterartstatus der Giraffen GCE 12 als *G. c. reticulata* und GCR 28 als *G. c. rothschildi* überdacht werden. Beide Tiere zeigten deutlich andere Cluster als die übrigen Tiere der jeweiligen Unterart.

Die hier ausgesprochenen Empfehlungen wurden ausschließlich anhand der erzielten Resultate getroffen. Ihre Umsetzung wird durch den Koordinator des Zuchtbuches, Dipl. Biol. Herrn Jörg Jebram, sowie das Species Committee entschieden.

4.12 Fazit

In der vorliegenden Studie wurden sechs verschiedene biologische Materialien als Quelle für die DNA evaluiert. Blut und Gewebe enthalten große Mengen an hochqualitativer DNA, waren jedoch aufgrund der invasiven Beprobung nur in Ausnahmefällen verfügbar. Haare mit Haarwurzel sowie flüssige Speichelproben liefern zuverlässige Ergebnisse. Die Beprobung war jedoch bei Giraffen nur schwer möglich. Abstriche der Maulschleimhaut konnten ebenfalls nur bei zahmen Tieren entnommen werden. Zudem konnte nicht sichergestellt werden, dass die Menge der DNA für die weiteren Untersuchungen ausreichend ist. Kotproben können ohne Kontakt zum Tier eingesammelt werden und sind in großen Mengen verfügbar. Diese nichtinvasive Beprobung erfordert lediglich, dass das Absetzen der Faeces beobachtet werden muss, um die Probe dem richtigen Tier zuordnen zu können. Daher erwiesen sich Kotproben als geeignetstes Ausgangsmaterial.

Bei nichtinvasiven Proben sind bei der PCR höhere Fehlerraten zu erwarten als bei hochqualitativen Proben wie beispielsweise Blut oder Gewebe. Ursache dafür sind die verminderte Quantität sowie Qualität der extrahierten DNA (Morin *et al.*, 2009). Dies kann dazu führen, dass eine PCR keine Resultate liefert und sie mehrfach wiederholt werden muss, um eine zuverlässige Genotypisierung zu ermöglichen (Wehausen *et al.*, 2004). Aufgrund dieser bekannten Problematiken wurden drei verschiedene Extraktionsmethoden getestet und verglichen. Dabei erzielte das AquaGenomic™ Kit die besten Ergebnisse. Zudem wurde die DNA zweimal gefällt, um ihren Reinheitsgrad zu erhöhen, was sehr gute Resultate lieferte. Schließlich wurden die PCR-Protokolle optimiert und BSA eingesetzt, um die Wirkung von PCR-Inhibitoren zu vermindern. Auch das erhöhte die Zuverlässigkeit der Amplifikationen.

Trotz der Maßnahmen zur Optimierung der PCR-Protokolle können die PCR-Konditionen für verschiedene Loci variieren und kein PCR-Protokoll wird alle Mikrosatellitenloci gleichermaßen optimieren können (Webster & Reichart, 2005). Von den 17 hier untersuchten Mikrosatelliten erzielten sieben Loci gute Resultate bei der Genotypisierung. Mit dieser Anzahl an Loci konnte bereits in früheren Studien eine angemessene Zuordnung von Individuen in einer Clusteranalyse erfolgen (Pritchard *et al.*, 2000). Auch in dieser Arbeit war die Anzahl an Loci ausreichend, um die Unterarten der Giraffen zu differenzieren. Die Clusteranalysen mit STRUCTURE und TESS lieferten übereinstimmende Resultate für die Differenzierung der Unterarten.

Das Ziel dieser Arbeit war die Zuordnung von 27 Giraffen mit unbekanntem Unterartstatus zu den bekannten Unterarten. In dieser Studie konnten insgesamt 78 Giraffen aus 26 europäischen Zoos untersucht werden, wobei 51 Tiere sechs verschiedene Unterarten repräsentierten. Elf der 27 unbekannteren Tiere konnten eindeutig einer Unterart zugeordnet werden, bei 16 Tieren wurde eine Hybridisierung nachgewiesen.

Bei wildlebenden Giraffen konnten bereits Hybridisierungen zwischen mehreren Unterarten beschrieben werden (Kingdon, 1988). Obwohl die Verbreitungsgebiete der Giraffen nah beieinander liegen oder sich teilweise überlappen, sind Hybridisierungen ein seltenes Phänomen. Eine Studie fand 0,8 % Hybride in 381 wild lebenden Individuen aus sechs verschiedenen Unterarten. Dies deutet auf eine reproduktive Isolation der Giraffen in ihrem natürlichen Habitat hin (Brown *et al.*, 2007). In zoologischen Instituten sind Hybridisierungen mit einem Anteil von 13,6 % deutlich häufiger (Jebram, 2014).

Die Haltung von Giraffen in europäischen Zoos wird durch das European Endangered Species Programme (EEP) koordiniert. Dies beinhaltet die Überwachung und Dokumentation der Abstammung aller Individuen der gesamten Zootierpopulation in einem Zuchtbuch. Den Zielen des Zuchtprogrammes folgend, soll die genetische Diversität der Population erhalten sowie Inzucht und Hybridisierungen zwischen den verschiedenen Unterarten vermieden werden (EAZA, 2013). Aus diesem Grund ist die sorgfältige Datenerhebung bereits für Gründerindividuen notwendig. Bei Gründerindividuen handelt es sich um Tiere, die in ihrem natürlichen Habitat eingefangen werden und in einer zoologischen Institution zur Nachzucht eingesetzt werden. Bei diesen Tieren ist keine Information über die vorherige Abstammung bekannt (Lacy, 1995).

Bei der taxonomischen Bestimmung der Giraffen erfolgt die Zuordnung zu den Unterarten meist anhand der charakteristischen Fellzeichnung sowie der geographischen Verbreitung. Dies birgt zwei mögliche Fehlerquellen. Zum einen sind Giraffen eine hoch mobile Art und zur großflächigen Ausbreitung fähig (Bohonak, 1999). Zudem überlappen sich die

Verbreitungsgebiete der Unterarten. So kommen in Kenia die drei Unterarten *G. c. reticulata*, *G. c. rothschildi* und *G. c. tippelskirchi* vor (Kingdon, 1988). Zum anderen konnte durch die Analyse mitochondrialer Marker nachgewiesen werden, dass das Fellmuster und die mitochondriale DNA eines Tieres von zwei verschiedenen Unterarten stammen können. Demzufolge muss eine Hybridisierung stattgefunden haben. Daher ist nicht auszuschließen, dass Hybridisierungen beim Einfangen von Gründerindividuen zur Haltung in zoologischen Institutionen übersehen wurden. Besonders, wenn das Einfangen in Hybridzonen erfolgt war, in denen mehrere Unterarten verbreitet sind, ist dies ein wahrscheinliches Szenario. Ein fehlerhaft zugeordnetes Tier, welches in den zoologischen Gärten zur Zucht eingesetzt wird, würde diese Hybridisierung an seine Nachkommen weitergeben. Es ist denkbar, dass dies bei dem Tier GCE 12 der Unterart *G. c. reticulata* geschehen ist, welches anhand der Clusteranalyse eindeutig der Rothschildi-Gruppe zugeordnet wurde. Auch für das Tier aus Amsterdam, von welchem die Referenz des D-loop für die Stammbaumanalyse genutzt wurde, ist dies wahrscheinlich.

4.13 Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war, die Stammbäume der Tiere mit unbekanntem Unterartstatus für das Giraffenzuchtbuch zu vervollständigen und somit das genetische Management der Giraffen zu erleichtern. Anhand von sieben Mikrosatelliten ist es gelungen, die Unterarten voneinander zu differenzieren und die Tiere unbekannter Unterart diesen zuzuordnen. Die Genauigkeit einer solchen Analyse kann durch die Untersuchung einer größeren Anzahl an Mikrosatelliten erhöht werden. Um die Aussagekraft der bisherigen Resultate zu verstärken, könnte der hier erstellte Datensatz durch die Untersuchungen weiterer Mikrosatelliten ergänzt werden. Vier weitere Loci aus Huebinger *et al.* (2002) könnten dazu genutzt werden, da die übrigen Loci aus dieser Publikation gute Ergebnisse bei der Genotypisierung erzielten. Ebenso würde der Einsatz von mehr Referenzproben die Exaktheit der Zuordnung verbessern und diese somit erleichtern.

Die Nutzung von Kotproben erwies sich als optimale Beprobungsmethode, da sie einfach durchzuführen war. Allerdings erforderte dieses Probenmaterial viele Optimierungen der molekularbiologischen Arbeitsschritte. Durch die Notwendigkeit, PCRs aufgrund von Datenausfällen zu wiederholen, sind jedoch größere Kosten entstanden als bei der Nutzung von Blut- oder Gewebeproben angefallen wären. Demnach sollte evaluiert werden, wie die Qualität und Quantität der DNA bei der Nutzung von Kotproben erhöht werden kann. Um die Proben so frisch wie möglich präparieren zu können, empfiehlt sich für den Versand auf dem Postweg ein Express-Versand. Des Weiteren könnten die Proben mit Silicagel getrocknet

werden (Wasser *et al.*, 1997). Diese Methode ist im Vergleich zu anderen Konservierungsmethoden gut für den Postversand anwendbar. Die dadurch erhöhten Kosten könnten, sofern diese Methode bessere Resultate bei der Amplifikation liefert, die Kosten für die Laborarbeit verringern. Weiterhin wäre denkbar, eine einzige Kotprobe großflächiger zu präparieren und mehrere DNA-Extraktionen durchzuführen. Da die Menge der extrahierten DNA in verschiedenen Proben stark variieren kann (Taberlet *et al.*, 1996) ist anzunehmen, dass dies auch für die DNA-Menge innerhalb der Probe eines Tieres gilt. Demnach könnte der DNA-Gehalt in manchen Extrakten höher sein als in anderen.

Um Fehler bei der Genotypisierung von Kotproben auszuschließen, kann ein „Multiple Tubes Approach“ durchgeführt werden. Diese Methode ermöglicht es, auch bei einer geringen Menge an DNA verlässliche Genotypen zu ermitteln. Dabei wird die DNA-Amplifikation jeder Probe mehrmals und unabhängig voneinander wiederholt. Der Genotyp wird schließlich aus dem Set aller ermittelten Genotypen abgeleitet (Navidi *et al.*, 1992; Taberlet *et al.*, 1996). Hierbei können die Kosten für die Laborarbeit allerdings drastisch ansteigen (Taberlet *et al.*, 1999). Aus diesem Grund ist die Methode nur dann geeignet, wenn die PCR-Protokolle optimal eingestellt wurden und die benötigten Reagenzien günstig verfügbar sind. Dies betrifft vor allem die Taq-Polymerase, welche die Loci sehr zuverlässig amplifizieren sollte.

Für das Populationsmanagement der Giraffen in europäischen Zoos wird empfohlen, zukünftig alle verbleibenden Tiere mit unbekanntem Unterartstatus zu untersuchen. So könnten fehlende Daten rekonstruiert werden und die Zucht kann noch gezielter erfolgen. Zudem sollte erwogen werden, auch weitere Tiere der bekannten Unterarten zu untersuchen. So könnten mögliche Fehler bei der taxonomischen Bestimmung von Gründerindividuen identifiziert werden. Hierfür empfiehlt sich sowohl eine Untersuchung mit Mikrosatelliten als auch eine Sequenzanalyse mit mitochondrialen Markern. Diese Analyse kann sowohl für den D-loop als auch für das bei Giraffen gut etablierte Cytochrom B Gen durchgeführt werden. Von den hier untersuchten Tieren empfiehlt sich eine Sequenzanalyse für die Tiere GCE 12 und GCR 28, um mögliche Hybridisierungen verifizieren zu können.

Die vorliegende Arbeit soll das genetische Management zur Konservierung der Unterarten in der Zootierpopulation der Giraffen unterstützen. Die Evaluation der Methoden dieser Studie sowie der generierte Datensatz können für weitere Untersuchungen wegbereitend sein.

5 Quellenverzeichnis

5.1 Literaturquellen

Ballou, J. D., Lees, C., Faust, L. J., Long, S., Lynch, C., Lackey, L. B. & Foose, T. J. (2010). Demographic and genetic management of captive populations. *Wild mammals in captivity: principles and techniques for zoo management* **219**.

Bock, F., Fennessy, J., Bidon, T., Tutchings, A., Marais, A., Deacon, F. & Janke, A. (2014). Mitochondrial sequences reveal a clear separation between Angolan and South African giraffe along a cryptic rift valley. *Bmc Evolutionary Biology* **14**.

Bohonak, A. J. (1999). Dispersal, gene flow, and population structure. *Quarterly Review of Biology* **74**, 21-45.

Brenneman, R. A., Louis, E. E. & Fennessy, J. (2009). Genetic structure of two populations of the Namibian giraffe, *Giraffa camelopardalis angolensis*. *African Journal of Ecology* **47**, 720-728.

Brown, D. M., Brenneman, R. A., Koepfli, K. P. & other authors (2007). Extensive population genetic structure in the giraffe. *Bmc Biology* **5**, 13.

Carter, K. D., Seddon, J. M., Carter, J. K., Goldizen, A. W. & Hereward, J. P. (2012). Development of 11 microsatellite markers for *Giraffa camelopardalis* through 454 pyrosequencing, with primer options for an additional 458 microsatellites. *Conservation Genetics Resources* **4**, 943-945.

Chakraborty, R., Deandrade, M., Daiger, S. P. & Budowle, B. (1992). Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Annals of Human Genetics* **56**, 45-57.

Chapuis, M.-P. & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 621-631.

Chen, C., Durand, E., Forbes, F. & Francois, O. (2007). Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes* **7**, 747-756.

Chomczynski, P., Mackey, K., Drews, R. & Wilfinger, W. (1997). DNAzol(R): A reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques* **22**, 550-553.

Comstock, K. E., Georgiadis, N., Pecon-Slattery, J., Roca, A. L., Ostrander, E. A., O'Brien, S. J. & Wasser, S. K. (2002). Patterns of molecular genetic variation among African elephant populations. *Molecular Ecology* **11**, 2489-2498.

- Confalone, E., Beintema, J. J., Sasso, M. P., Carsana, A., Palmieri, M., Vento, M. T. & Furia, A. (1995).** Molecular evolution of genes encoding ribonucleases in ruminant species. *Journal of Molecular Evolution* **41**, 850-858.
- Crowhurst, R. S. (2012).** Landscape Features Affecting Genetic Diversity and Structure in East African Ungulate Species. Unpublished Master Thesis: Oregon State University.
- Crowhurst, R. S., Mullins, T. D., Mutayoba, B. M. & Epps, C. W. (2013).** Characterization of eight polymorphic loci for Maasai giraffe (*Giraffa camelopardalis tippelskirchi*) using non-invasive genetic samples. *Conservation Genetics Resources* **5**, 85-87.
- Dagg, A. I. (1962).** The subspeciation of the giraffe. *Journal of Mammalogy* **43 (4)**, 550-552.
- Dagg, A. I. (1968).** External features of giraffe, pp. 657-669: Mammalia.
- Dagg, A. I. & Foster, J. B. (1976).** The giraffe. Its biology, behaviour, and ecology. New York: Van Nostrand Reinhold Company.
- Dakin, E. E. & Avise, J. C. (2004).** Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* **93**, 504-509.
- Earl, D. A. & vonHoldt, B. M. (2012).** STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**, 359-361.
- East, R. (1999).** African antelope database 1998: IUCN.
- EAZA (2013).** The Modern Zoo: Foundations for Management and development. Amsterdam, the Netherlands: EAZA Executive Office.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005).** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.
- Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. (2010).** Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**, 564-567.
- Fennessy, J. (2009).** Home range and seasonal movements of *Giraffa camelopardalis angolensis* in the northern Namib Desert. *African Journal of Ecology* **47**, 318-327.
- Fennessy, J., Bock, F., Tutchings, A., Brenneman, R. & Janke, A. (2013).** Mitochondrial DNA analyses show that Zambia's South Luangwa Valley giraffe (*Giraffa camelopardalis thornicrofti*) are genetically isolated. *African Journal of Ecology* **51**, 635-640.

- Fernando, P., Vidya, T. N. C., Rajapakse, C., Dangolla, A. & Melnick, D. J. (2003).** Reliable noninvasive genotyping: Fantasy or reality? *Journal of Heredity* **94**, 115-123.
- Flagstad, O., Roed, K., Stacy, J. E. & Jakobsen, K. S. (1999).** Reliable noninvasive genotyping based on excremental PCR of nuclear DNA purified with a magnetic bead protocol. *Molecular Ecology* **8**, 879-883.
- Fowler, M. E. & Miller, R. E. (2008).** Zoo and wild animal medicine: current therapy: Elsevier Health Sciences.
- Frantzen, M. A. J., Silk, J. B., Ferguson, J. W. H., Wayne, R. K. & Kohn, M. H. (1998).** Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology* **7**, 1423-1428.
- Goossens, B., Waits, L. P. & Taberlet, P. (1998).** Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. *Molecular Ecology* **7**, 1237-1241.
- Goudet, J. (1999).** PCA-Gen version 1.2. *Institute of Ecology, Biology Building, University of Lausanne (UNIL), Lausanne, Switzerland.*
- Groves, C. & Grubb, P. (2011).** Ungulate taxonomy: JHU Press.
- Grubb, P. (2005).** Artiodactyla. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* Edited by: Wilson DE, Reeder DM, 637–722.
- Gyllenstein, U., Wharton, D., Josefsson, A. & Wilson, A. C. (1991).** Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice.
- Haig, S. M., Ballou, J. D. & Casna, N. J. (1994).** Identification of kin structure among Guam rail founders: a comparison of pedigrees and DNA profiles. *Molecular Ecology* **3**, 109-119.
- Hassanin, A., Ropiquet, A., Gourmand, A.-L., Chardonnet, B. & Rigoulet, J. (2007).** Mitochondrial DNA variability in *Giraffa camelopardalis*: consequences for taxonomy, phylogeography and conservation of giraffes in West and central Africa. *Comptes Rendus Biologies* **330**, 265-274.
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., Kuch, M. & Paabo, S. (2001).** Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics* **2**, 353-359.
- Huebinger, R. M., Pierson, D. J., De Maar, T. W., Brown, D. M., Brenneman, R. A. & Louis, E. E. (2002).** Characterization of 16 microsatellite marker loci in the Maasai giraffe (*Giraffa camelopardalis tippelskirchi*). *Molecular Ecology Notes* **2**, 531-533.
- Höss, M., Kohn, M., Pääbo, S., Knauer, F. & Schröder, W. (1992).** Excrement analysis by PCR. *Nature* **359**, 199-199.

- Jakobsson, M. & Rosenberg, N. A. (2007).** CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**, 1801-1806.
- Jebram, J. (2014).** European Studbook for the Giraffe EEP, Edition 7, Update No. 1. Data current through 31st December 2013 edn.
- Kingdon, J. (1988).** East African Mammals: An Atlas of Evolution in Africa, Volume 3B: University of Chicago Press.
- Kingdon, J. (1997).** The Kingdon Field Guide to African Mammals. San Diego: Academic Press.
- Krumbiegel, I. (1971).** Die Giraffe. Wittenberg (Germany): A: Ziemsen Verlag.
- Lacy, R. C. (1995).** Clarification of genetic terms and their use in the management of captive populations. *Zoo Biology* **14**, 565-577.
- Lydekker, R. (1904).** On the Subspecies of *Giraffa camelopardalis*, pp. 202-229. Proceedings of the Zoological Society of London: Blackwell Publishing Ltd.
- Mayr, E., et al. (1963).** Animal species and evolution. Cambridge, Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press.
- Morin, P. A. & Ryder, O. A. (1991).** Founder contribution and pedigree inference in a captive breeding colony of lion-tailed macaques, using mitochondrial DNA and DNA fingerprint analyses. *Zoo Biology* **10**, 341-352.
- Morin, P. A. & Woodruff, D. S. (1996).** Noninvasive genotyping for vertebrate conservation. *Molecular genetic approaches in conservation*, 298-313.
- Morin, P. A., Chambers, K. E., Boesch, C. & Vigilant, L. (2001).** Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology* **10**, 1835-1844.
- Morin, P. A., Leduc, R. G., Archer, F. I., Martien, K. K., Huebinger, R., Bickham, J. W. & Taylor, B. L. (2009).** Significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium caused by low levels of microsatellite genotyping errors. *Molecular Ecology Resources* **9**, 498-504.
- Murphy, M. A., Waits, L. P., Kendall, K. C., Wasser, S. K., Higbee, J. A. & Bogden, R. (2002).** An evaluation of long-term preservation methods for brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA samples. *Conservation Genetics* **3**, 435-440.

Murphy, M. A., Kendall, K. C., Robinson, A. & Waits, L. P. (2007). The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification. *Conservation Genetics* **8**, 1219-1224.

Mülhardt, C. (2009). Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics: Springer.

Navidi, W., Arnheim, N. & Waterman, M. S. (1992). A Multiple-Tubes Approach for Accurate Genotyping of Very Small DNA Samples by Using PCR - Statistical Considerations. *American Journal of Human Genetics* **50**, 347-359.

Nsubuga, A. M., Robbins, M. M., Roeder, A. D., Morin, P. A., Boesch, C. & Vigilant, L. (2004). Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Molecular Ecology* **13**, 2089-2094.

Paetkau, D. & Strobeck, C. (1995). The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Molecular Ecology* **4**, 519-520.

Pakendorf, B. & Stoneking, M. (2005). Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**, 165-183.

Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.

Quinque, D., Kittler, R., Kayser, M., Stoneking, M. & Nasidze, I. (2006). Evaluation of saliva as a source of human DNA for population and association studies. *Analytical Biochemistry* **353**, 272-277.

Robin, E. D. & Wong, R. (1988). Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of cellular physiology* **136**, 507-513.

Rosenberg, N. A. (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* **4**, 137-138.

Schweinsberg, M. (2010). Populationsdifferenzierung und Genfluss von *Acropora humilis*. Unveröffentlichte Diplomarbeit: Ruhr-Universität Bochum.

Selkoe, K. A. & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* **9**, 615-629.

Shinde, D., Lai, Y., Sun, F. & Arnheim, N. (2003). Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis:(CA/GT) n and (A/T) n microsatellites. *Nucleic Acids Research* **31**, 974-980.

Sidransky, D., Tokino, T., Hamilton, S. R., Kinzler, K. W., Levin, B., Frost, P. & Vogelstein, B. (1992). Identification of ras Oncogene Mutations in the Stool of Patients with Curable Colorectal Tumors. *Science* **256**, 102-105.

- Stoneking, M., Hedgecock, D., Higuchi, R. G., Vigilant, L. & Erlich, H. A. (1991).** Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *American journal of human genetics* **48**, 370.
- Stoneking, M. (1993).** DNA and recent human evolution. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews* **2**, 60-73.
- Stott, K. (1959).** Giraffe intergradation in Kenya. *Journal of Mammalogy* **40(2)**, 251-251.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L. P. & Bouvet, J. (1996).** Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* **24**, 3189-3194.
- Taberlet, P., Waits, L. P. & Luikart, G. (1999).** Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology & Evolution* **14**, 323-327.
- van Hooft, W. F., Groen, A. F. & Prins, H. H. T. (2000).** Microsatellite analysis of genetic diversity in African buffalo (*Syncerus caffer*) populations throughout Africa. *Molecular Ecology* **9**, 2017-2025.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. & Shipley, P. (2004).** MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.
- van Oosterhout, C., Weetman, D. & Hutchinson, W. F. (2006).** Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Molecular Ecology Notes* **6**, 255-256.
- Wasser, S. K., Houston, C. S., Koehler, G. M., Cadd, G. G. & Fain, S. R. (1997).** Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular Ecology* **6**, 1091-1097.
- Webster, M. S. & Reichart, L. (2005).** Use of microsatellites for parentage and kinship analyses in animals. *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data, Part B* **395**, 222-238.
- Wehausen, J. D., Ramey, R. R. & Epps, C. W. (2004).** Experiments in DNA extraction and PCR amplification from bighorn sheep feces: the importance of DNA extraction method. *Journal of Heredity* **95**, 503-509.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. (2002).** Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* **11**, 1-16.

5.2 Bildquellen

Abb. 1.1	Charakteristische Fellzeichnungen der Giraffe	4
A	http://blog.kohan-studio.com/tag/メガテリウム ; Zugriff am 07.09.2015	4
B	http://www.leszoosdanslemonde.com/gal2data/albums/mammiferes/artiodactyla/giraffidae/giraffa_camelopardalis/giraffa_camelopardalis_antiquorum/antwerpen_giraffa_camelopardalis_antiquorum_2007_2.jpg ; Zugriff am 07.09.2015	4
C	http://www.giraffepotter.org/Learn/Nubian ; Zugriff am 07.09.2015	4
D	http://giraffepotter.org/Learn/SouthAfrican ; Zugriff am 07.09.2015	4
E	Dominique Mignard, http://mammiferesafricains.org/2012/02/girafedafrique-de-louest/ ; Zugriff am 07.09.2015	4
F	http://www.infobarrel.com/media/image/69562_max.jpg ; Zugriff am 07.09.2015	4
G	http://imgarcade.com/1/rothschild-giraffe-pattern/ ; Zugriff am 07.09.2015	4
H	http://pixgood.com/nigerian-giraffe.html ; Zugriff am 07.09.2015	4
I	Rob Weaver, 04.11.2012, https://www.flickr.com/photos/robwildlife2/8391288169/ ; Zugriff am 07.09.2015	4
Abb. 1.2	Verbreitungsgebiete der Giraffen in Afrika verändert nach http://www.giraffeconservation.org/posters.php ; Zugriff am 15.09.2015	5

6 Anhang

6.1 Sampling Manual für die Beprobung der Giraffen

IMPORTANT NOTES

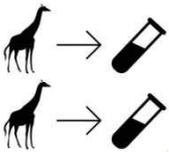


If possible, take multiple samples of each animal



Multiple samples should be different from each other

blood / tissue / buccal swabs / faeces



Please store each sample in a separate tube



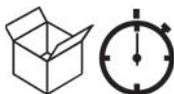
If there are samples of dead animals left, please add them to the parcel



If more than one giraffe is requested, please take all samples at the same day



A parcel is prepared for your shipment



Ship parcel as fast as possible to keep samples fresh



Enjoy the sweets 😊

1 BLOOD SAMPLES



Stored sample



A blood sample (frozen EDTA or fixed in ethanol) is left from a medical examination



Label the sample with date, name and studbook-number of the giraffe



Ship the sample (no cooling necessary)



Fresh sample



Ask the veterinarian to take an EDTA blood sample



Sample can be taken with a needle...



...or with a predatory bug if this method is used in your zoo



Label the sample with date, name and studbook-number of the giraffe



Ship the sample on the same day

2 TISSUE SAMPLES



Stored sample fixed in ethanol



A tissue sample fixed in ethanol is left from a medical examination



Label the sample with date, name and studbook-number of the giraffe



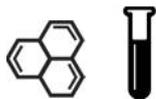
Ship the sample



Stored frozen sample



A frozen tissue sample is left from a medical examination



Add ethanol (minimum 70 %) until the sample is covered to fix the sample



Label the sample with date, name and studbook-number of the giraffe



Ship the sample (no cooling necessary)

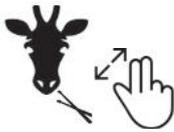
3 BUCCAL SWABS



Put on gloves to avoid contamination with human DNA



Take the cotton swabs out of the tube



Scrub both swabs approximately 20 times along the oral mucosa at the inside of the cheek to receive buccal cells



Store the swab in the open tube



Air-dry the swab for 10-15 minutes at room temperature
Avoid any contact with the environment



Close the tube



Label the sample with date, name and studbook-number of the giraffe



Ship the sample on the same day

4 FECAL SAMPLES



Observe the defecation of the requested giraffe



Put on gloves to avoid contamination with human DNA



Collect approximately 5 pieces of dung

IMPORTANT

dung should be as clean as possible without soil or straw, but please do not attempt to clean the dung yourself



Store the dung in the tube

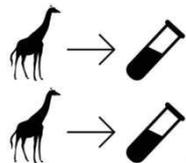


Leave the tube open for approximately 1 hour to air-dry the sample



IMPORTANT

If more than one giraffe is requested, take all samples on the same day



IMPORTANT

Each sample must be stored in a separate tube



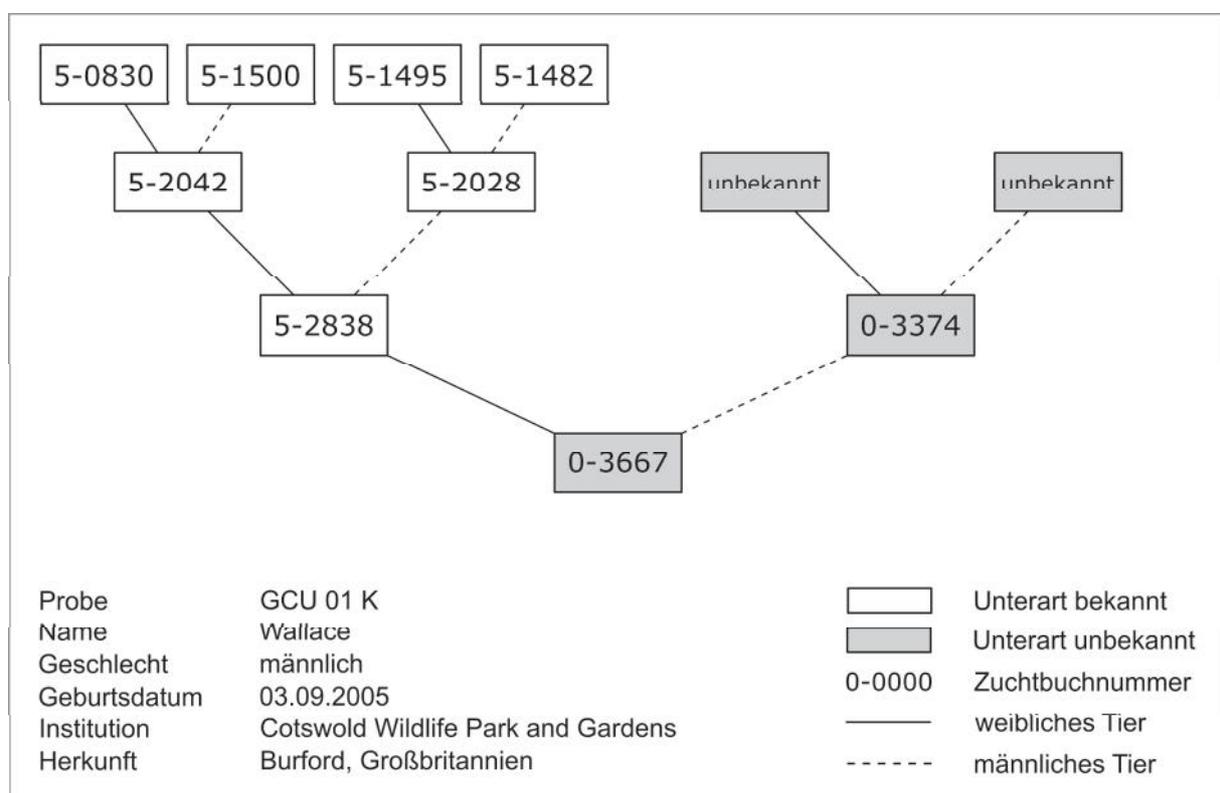
Label the sample with date, name and studbook-number of the giraffe

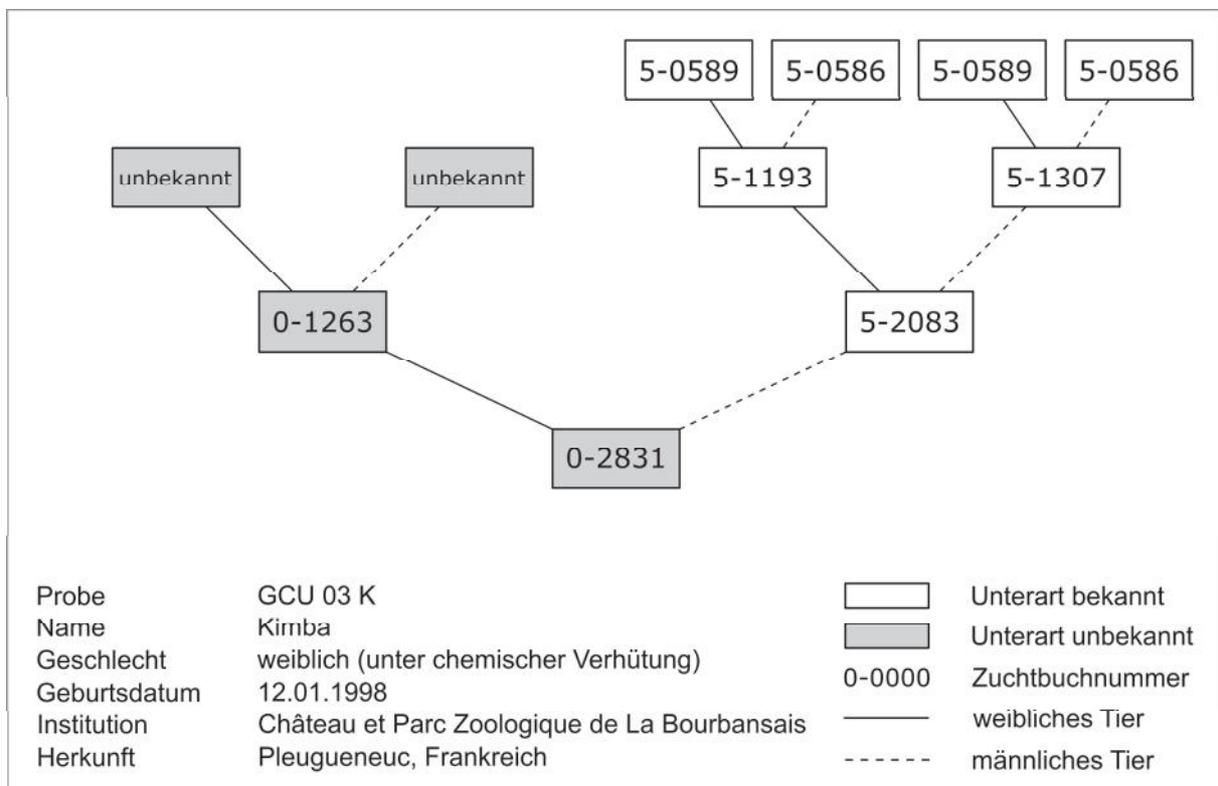
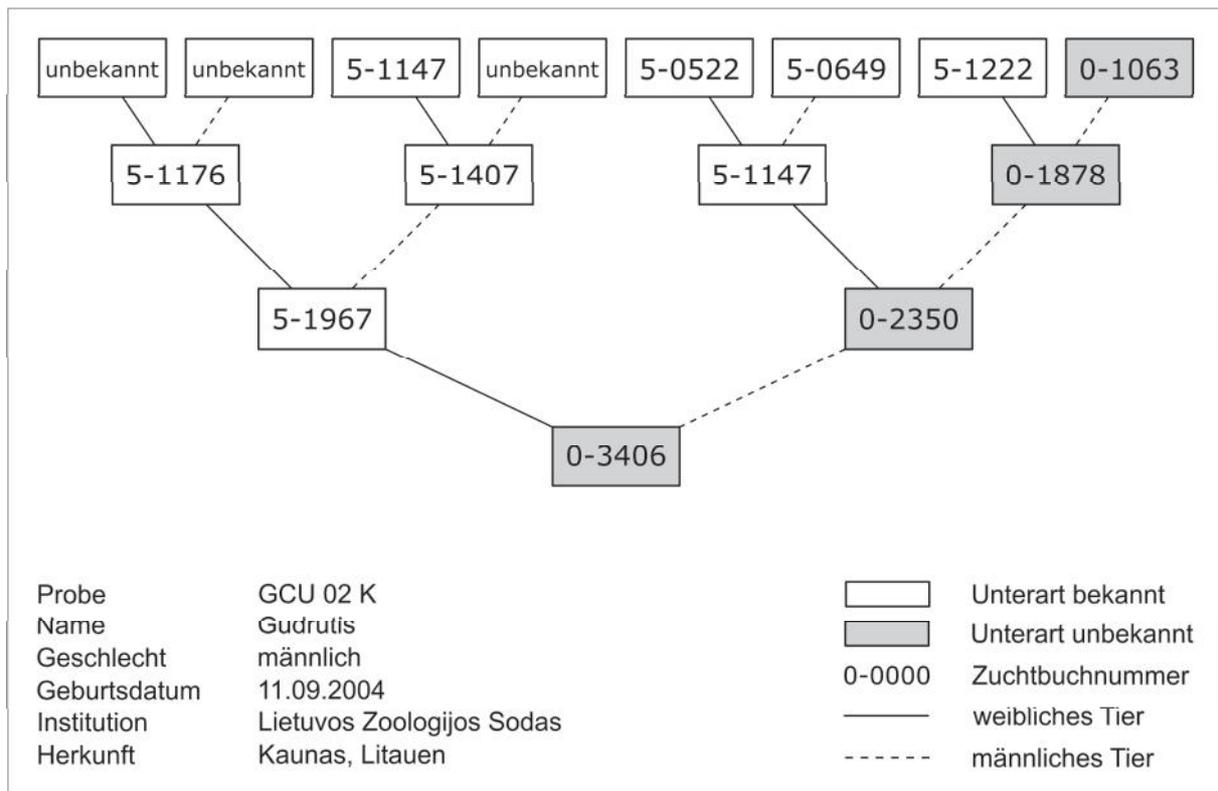


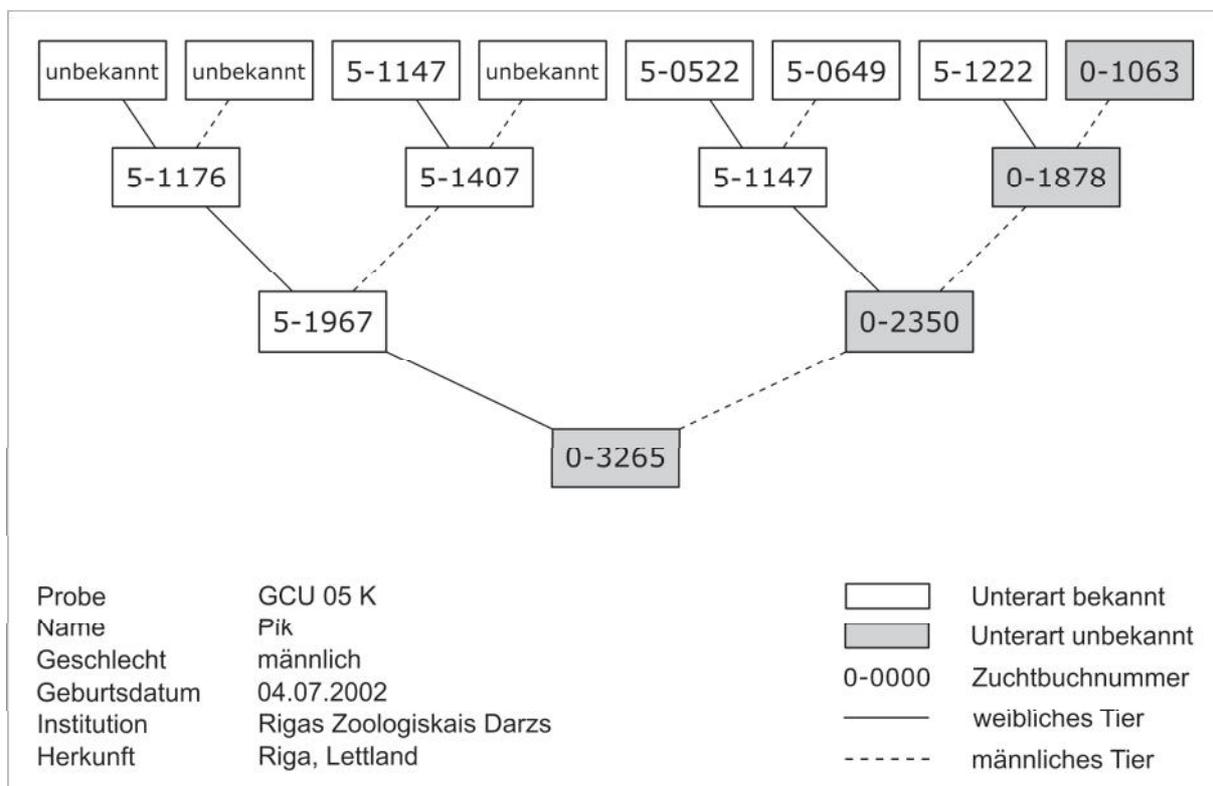
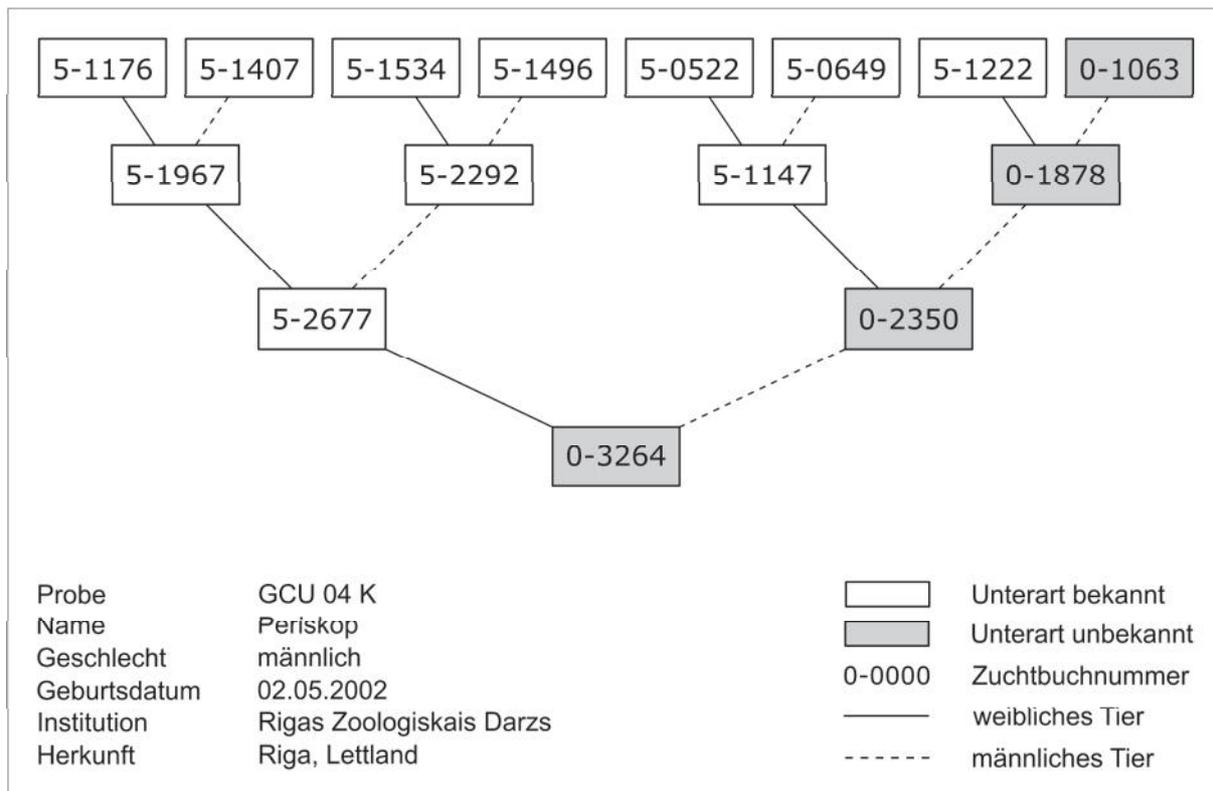
Ship the sample on the same day

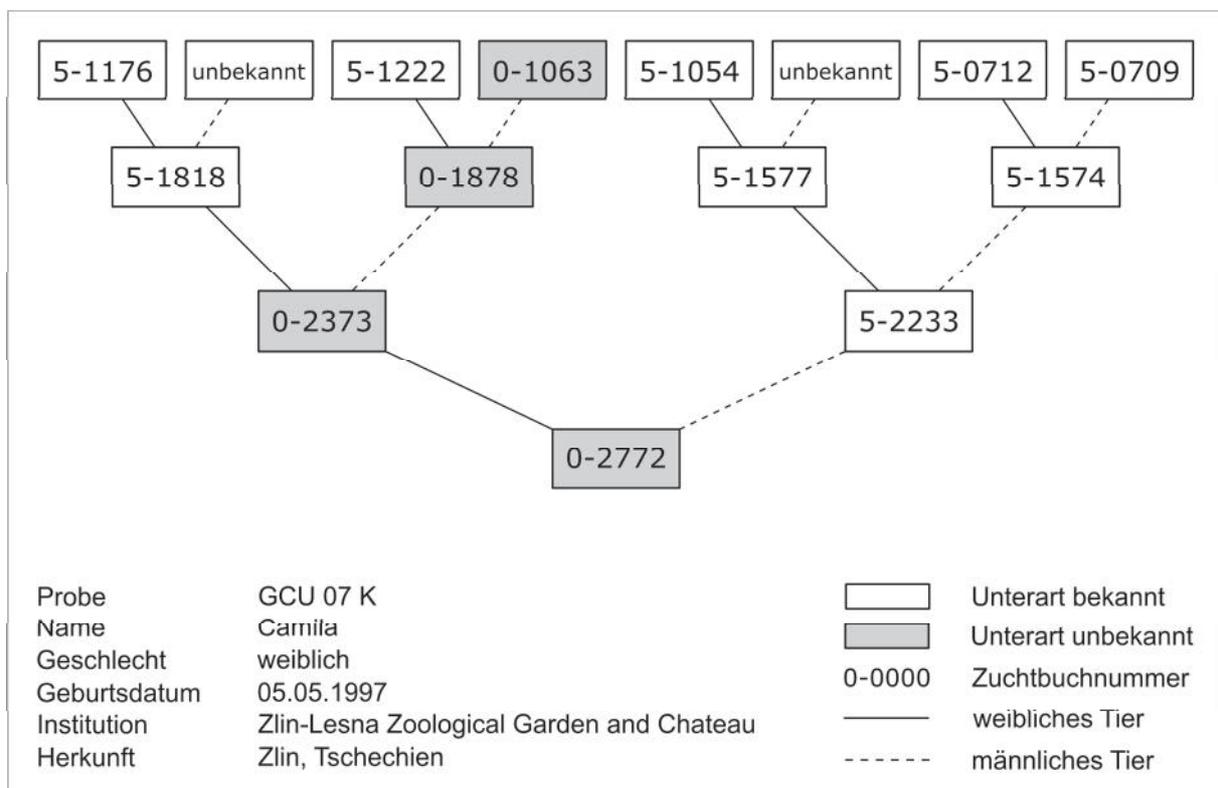
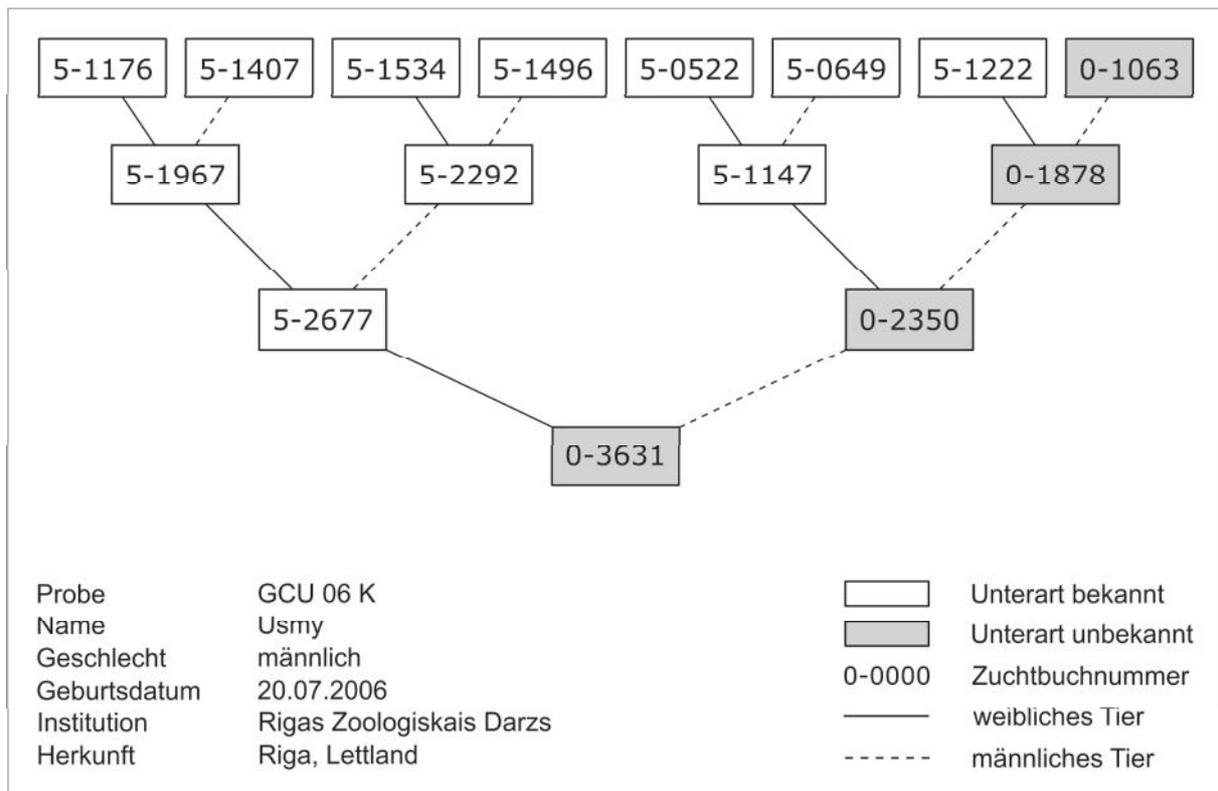
6.2 Stammbäume der 27 Giraffen mit unbekanntem Unterartstatus

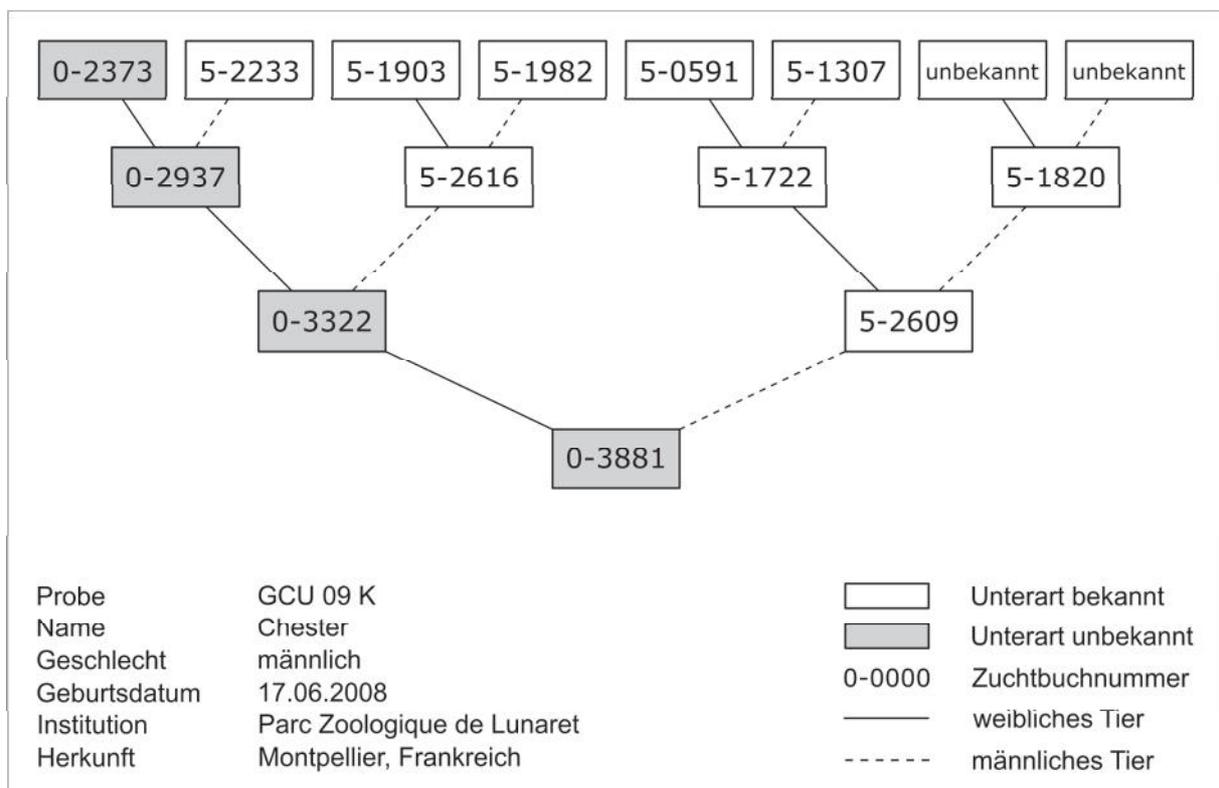
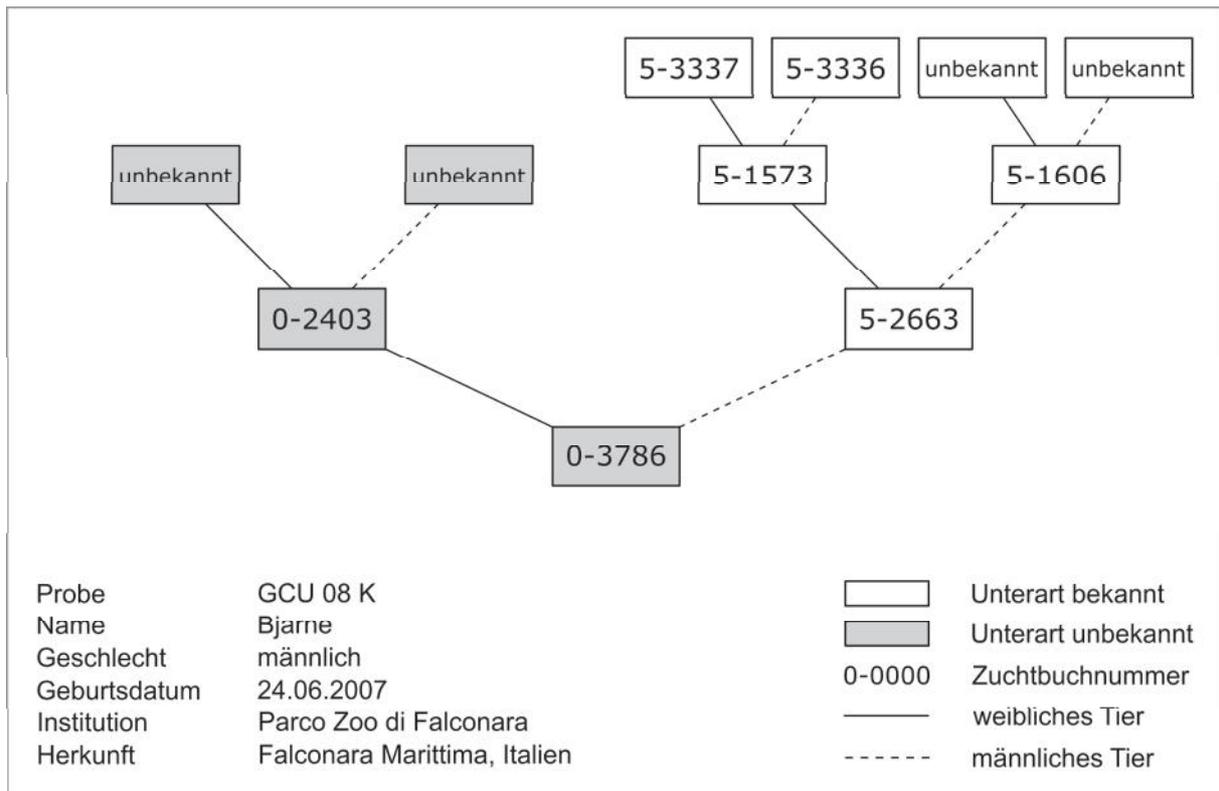
Im Stammbaum befindet sich das untersuchte Tier an der untersten Position. Tiere mit unbekanntem Unterartstatus werden grau hinterlegt dargestellt. Die erste Zahl der fünfstelligen Zuchtbuchnummer gibt die Unterart des Tieres an: unbekannte Unterart (0), *G. c. antiquorum* (1), *G. c. reticulata* (4), *G. c. rothschildi* (5). Für das untersuchte Tier werden Probennummer, Name, Geschlecht, Geburtsdatum sowie die Institution seiner Herkunft angegeben. Die Daten stammen aus der Datenbank des Zuchtbuches der Giraffen (Jebram, 2014).

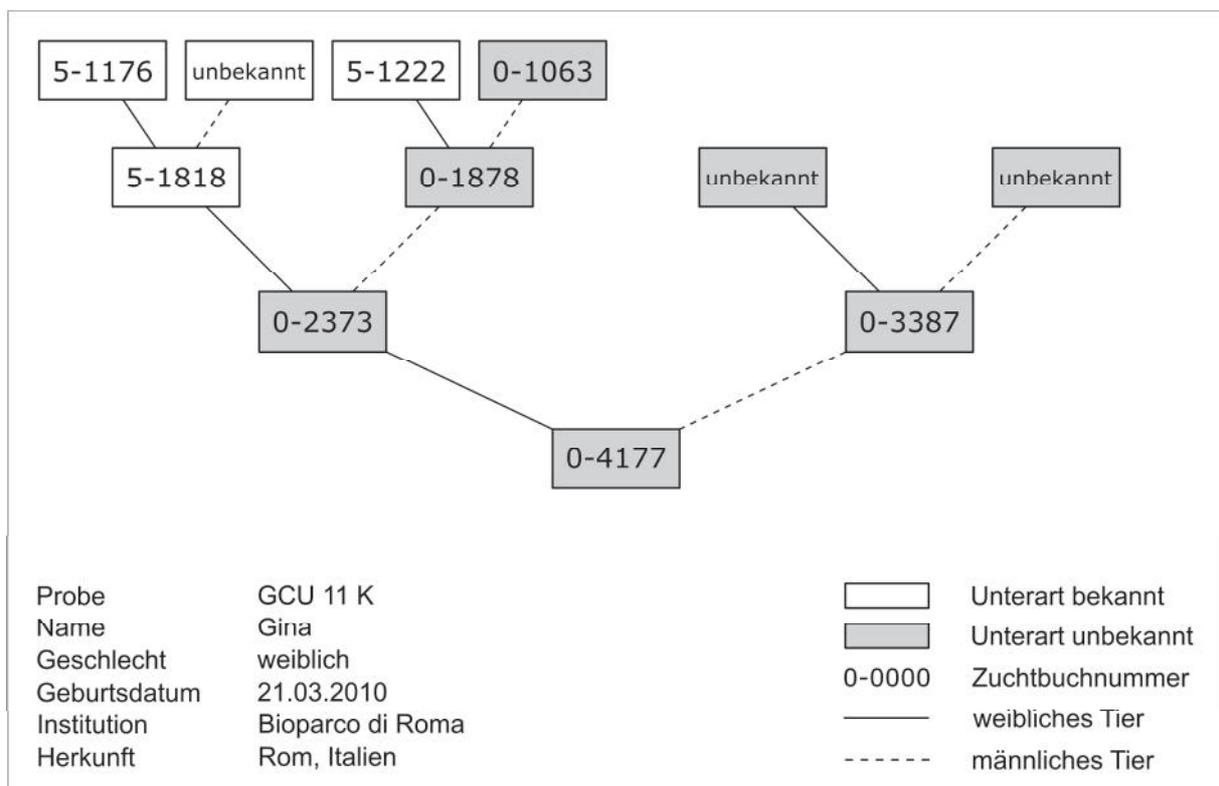
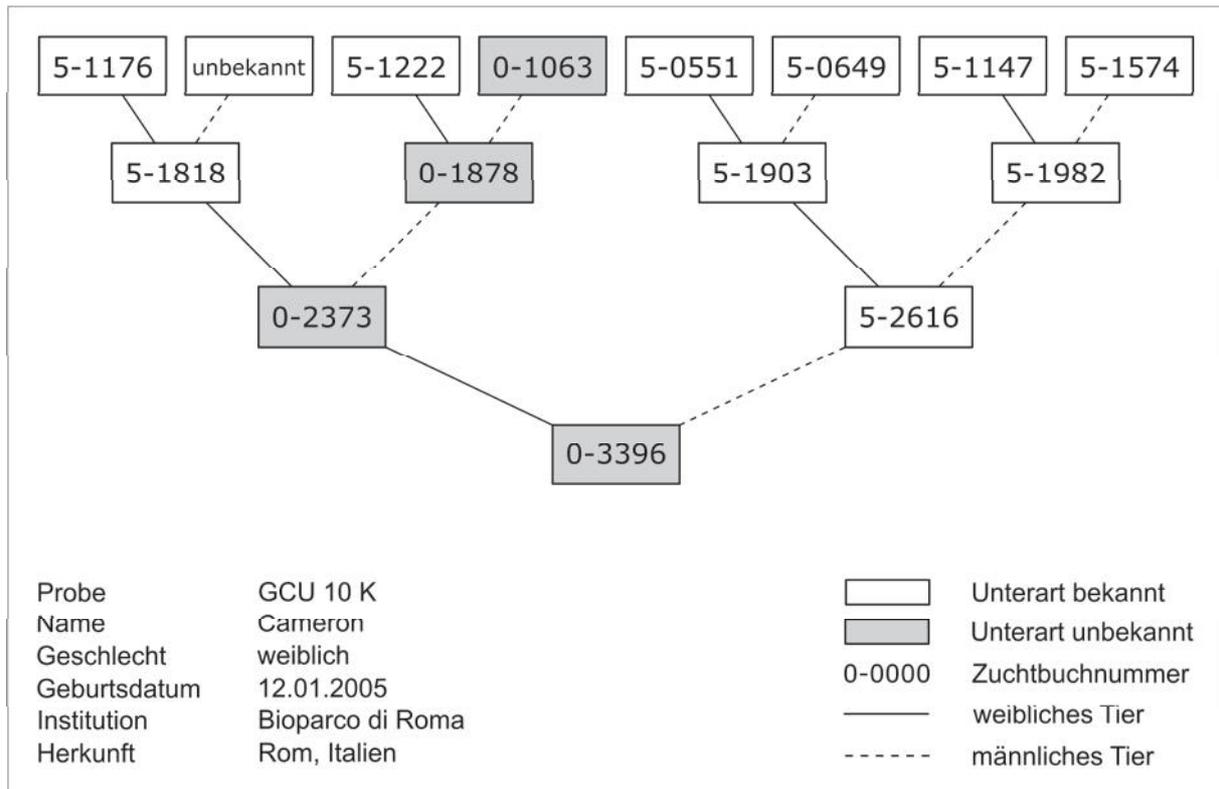


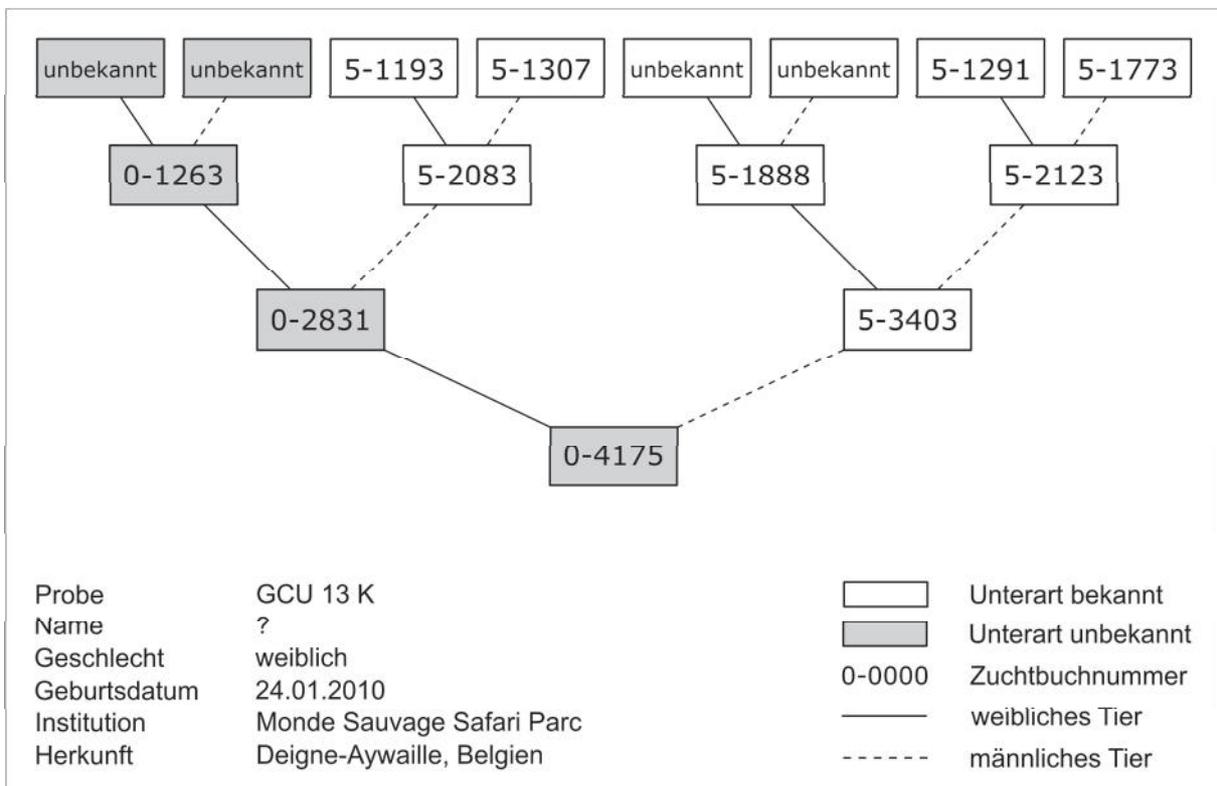
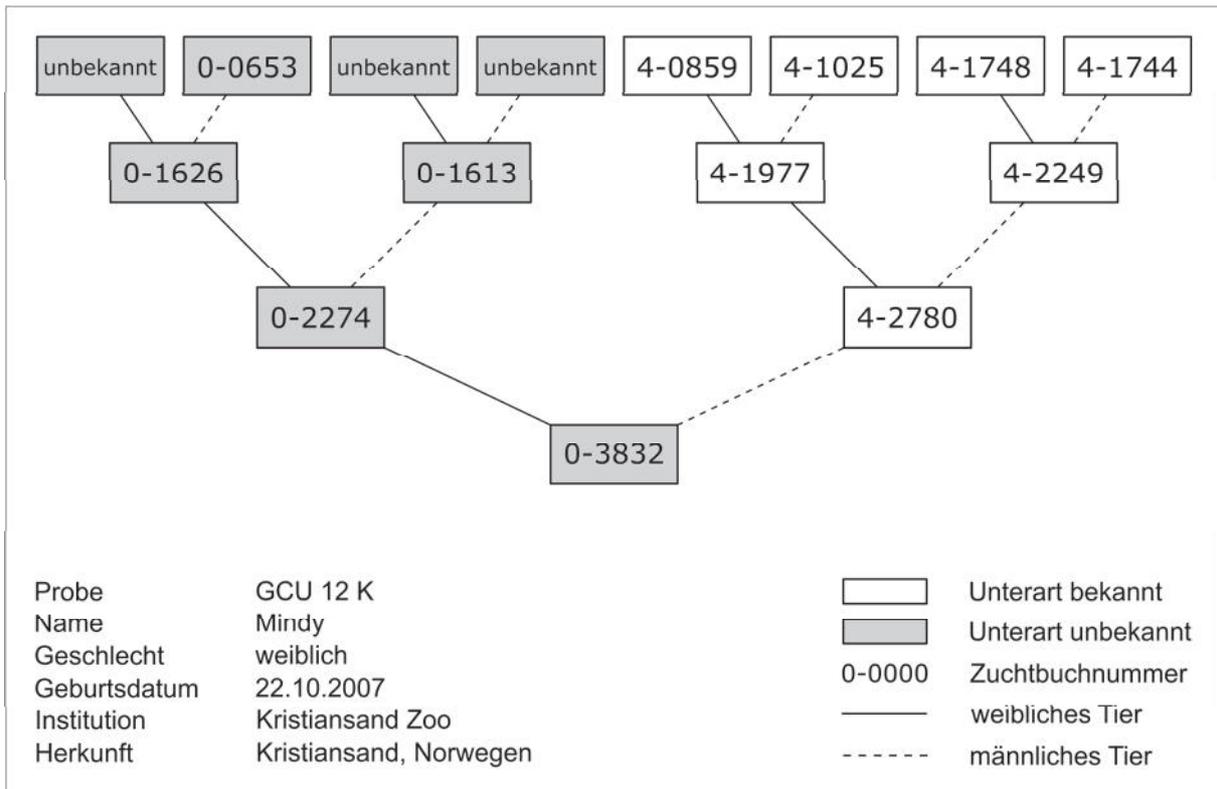


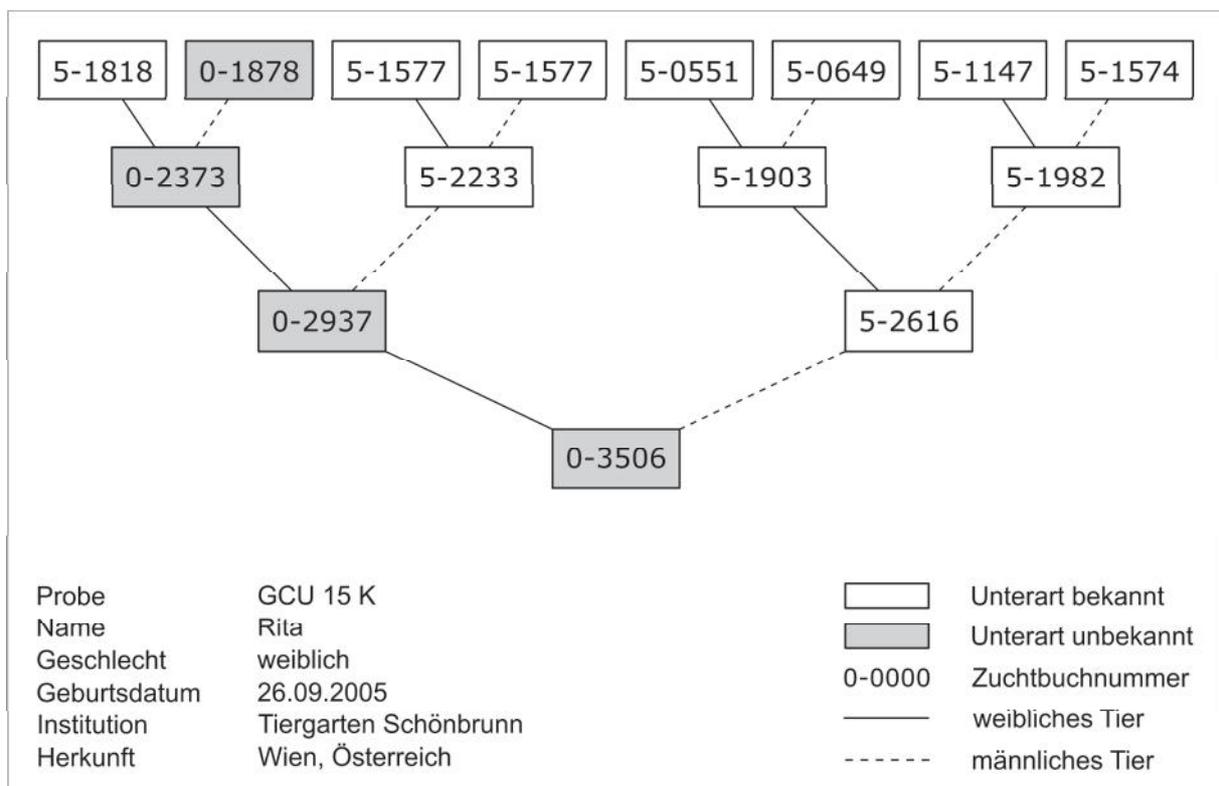
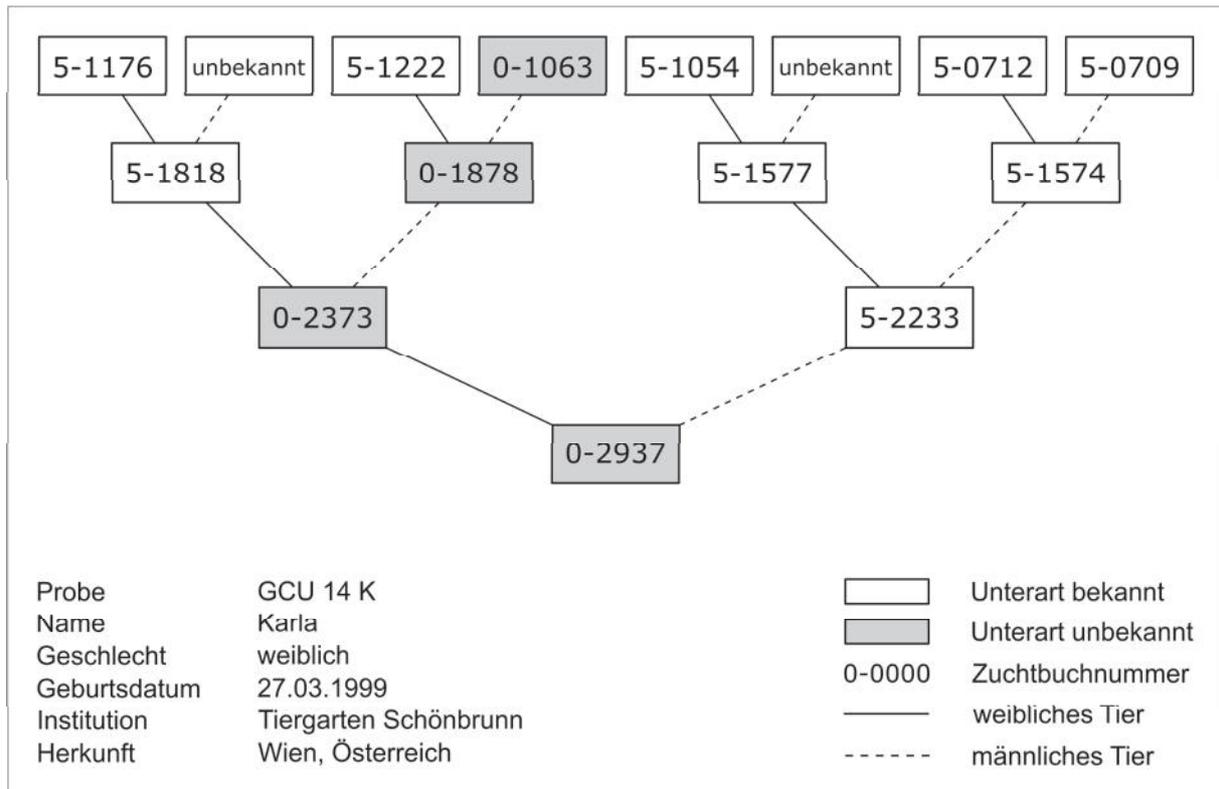


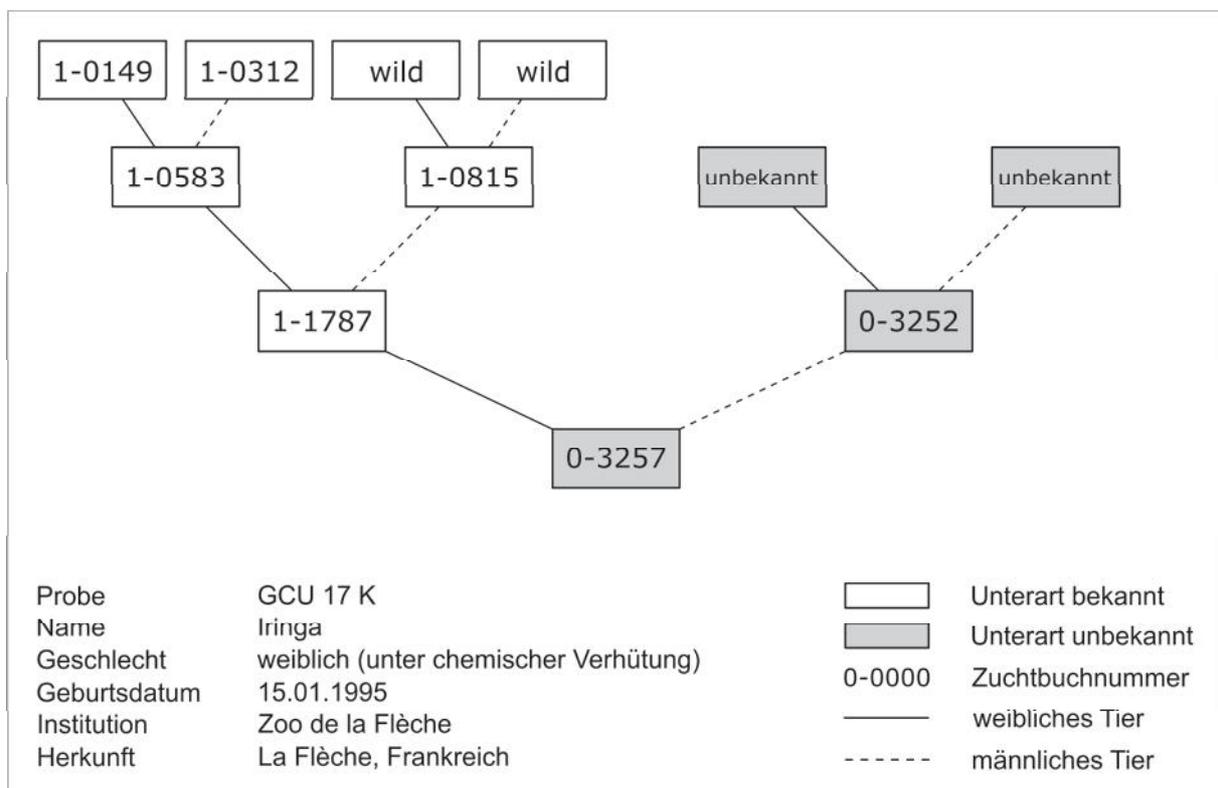
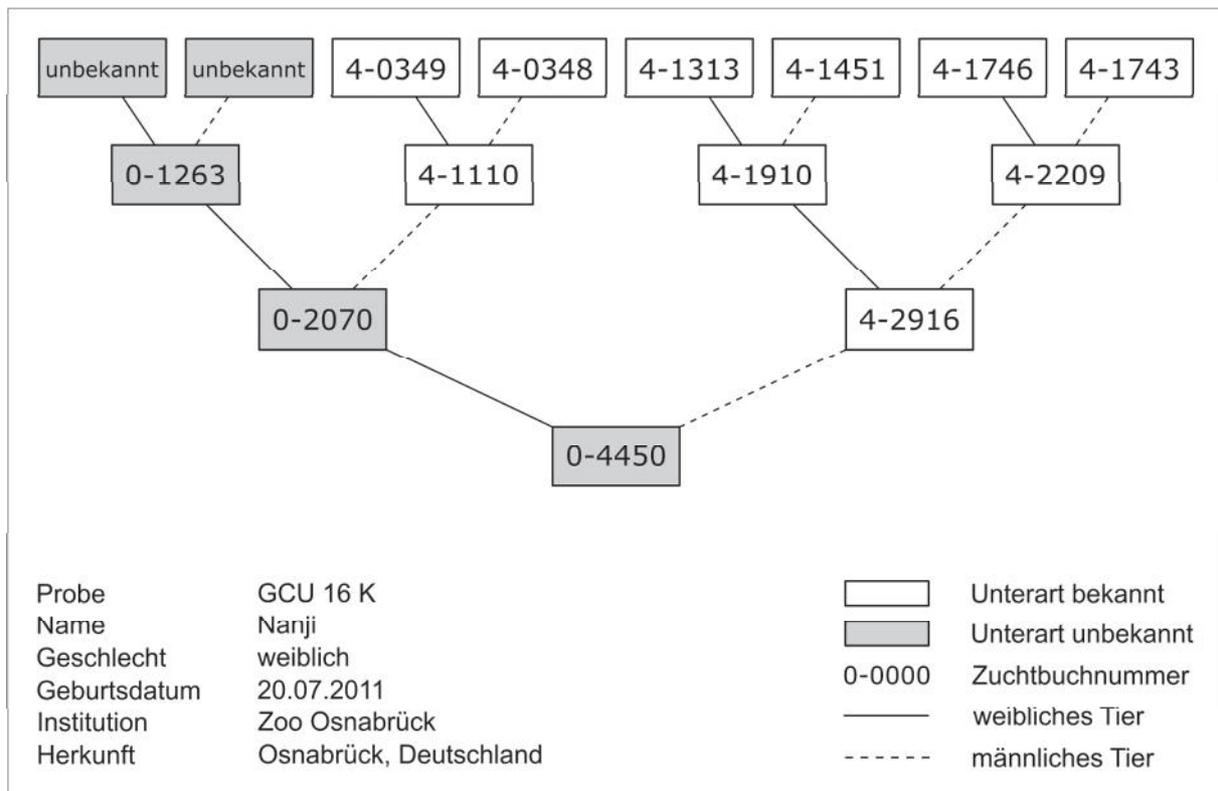


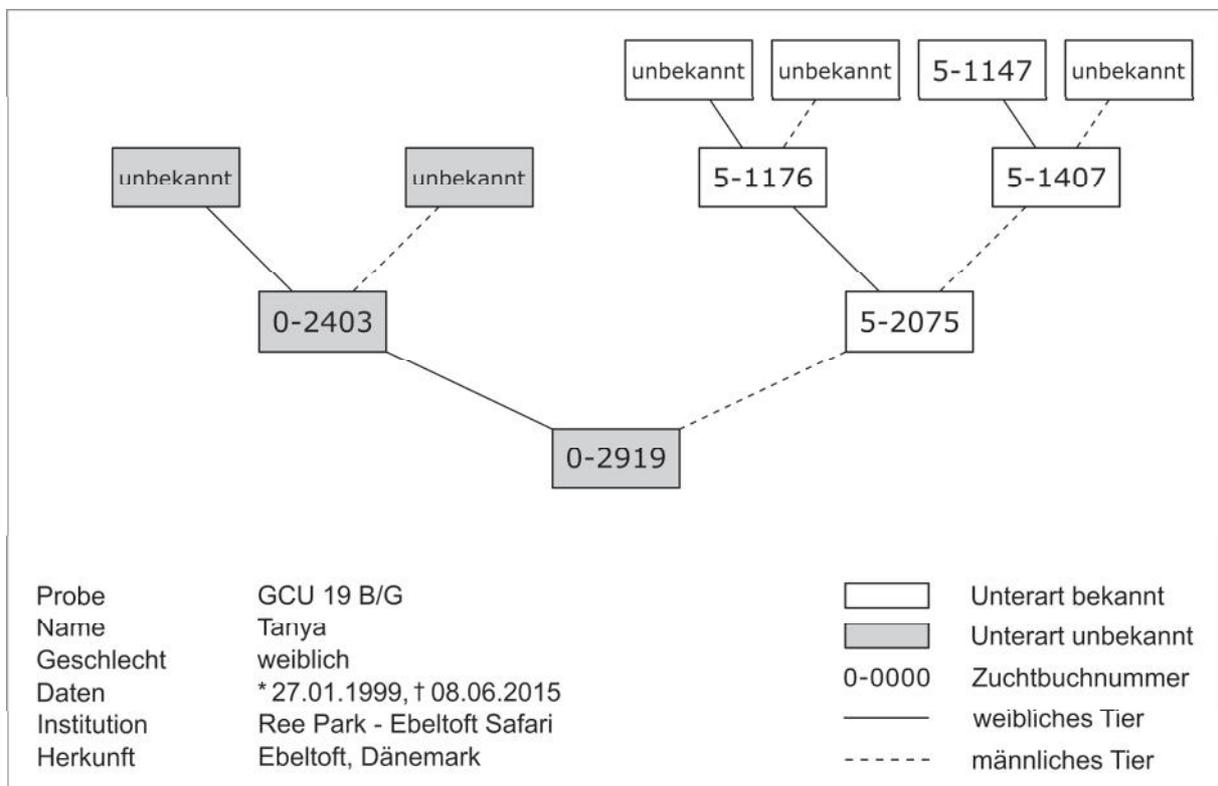
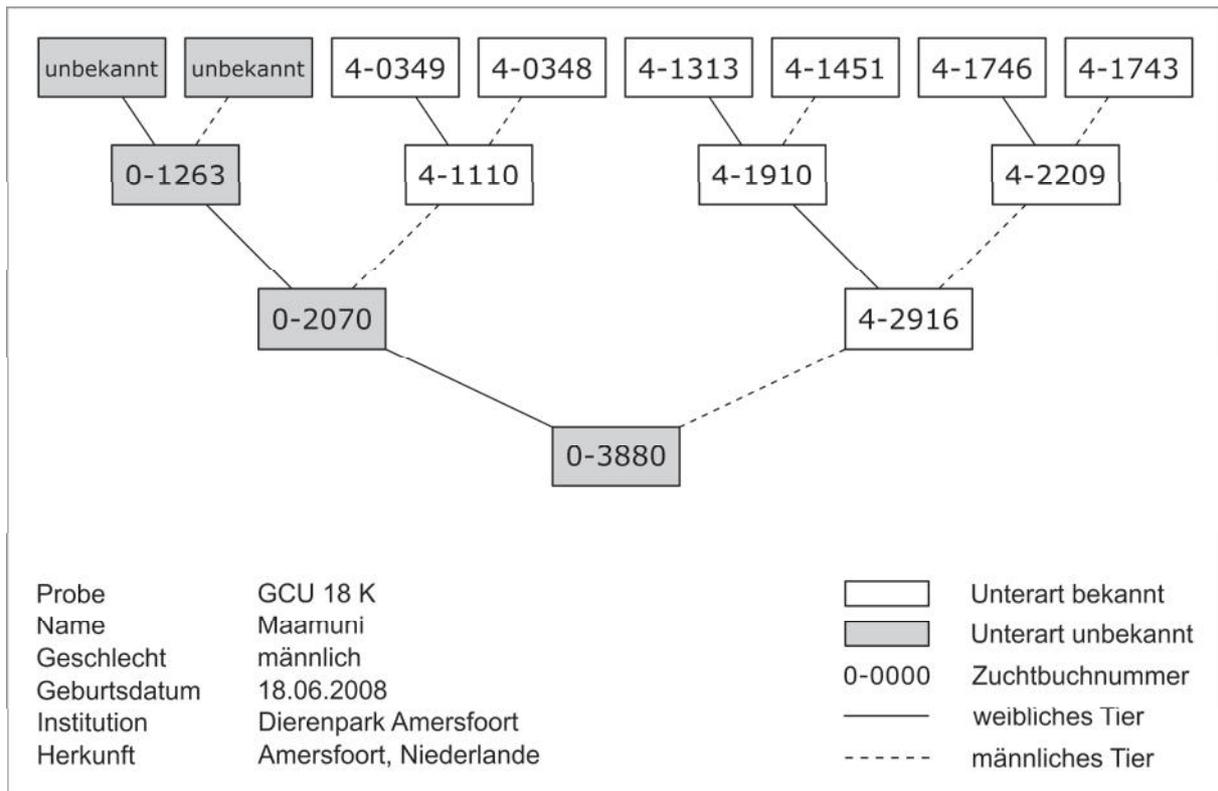


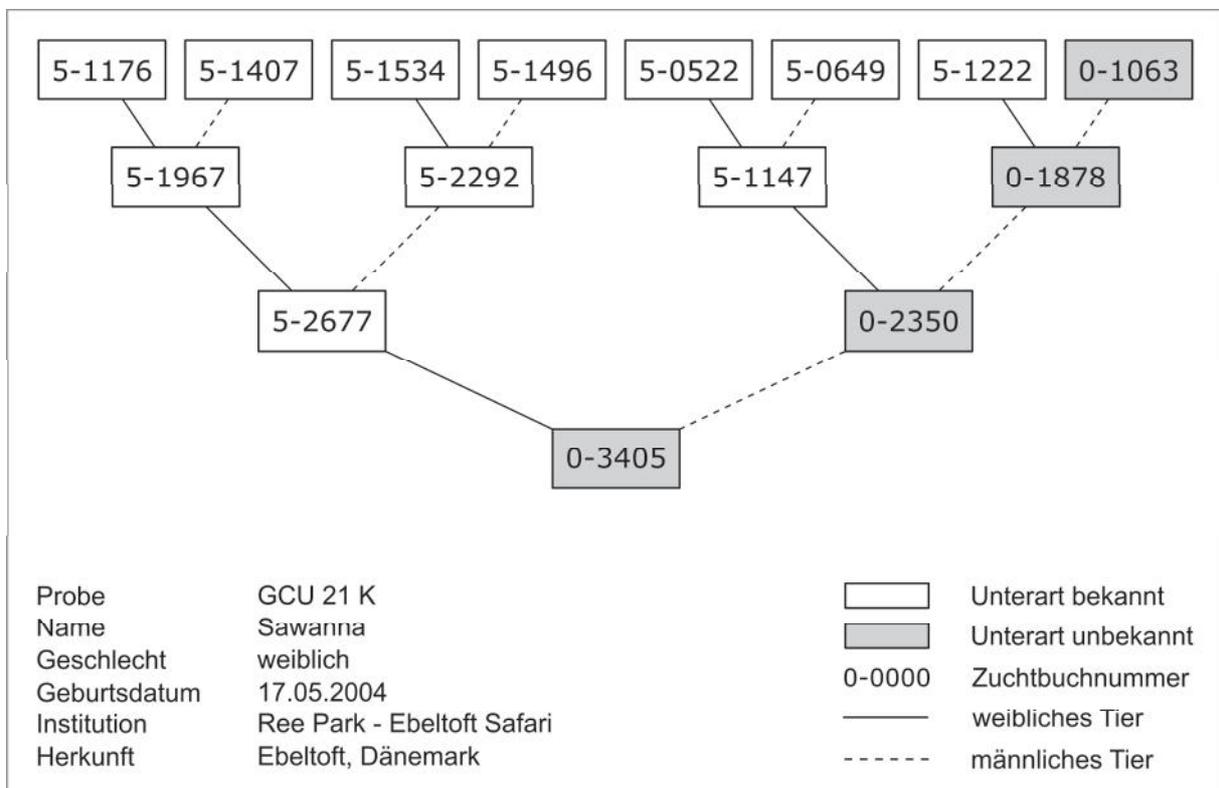
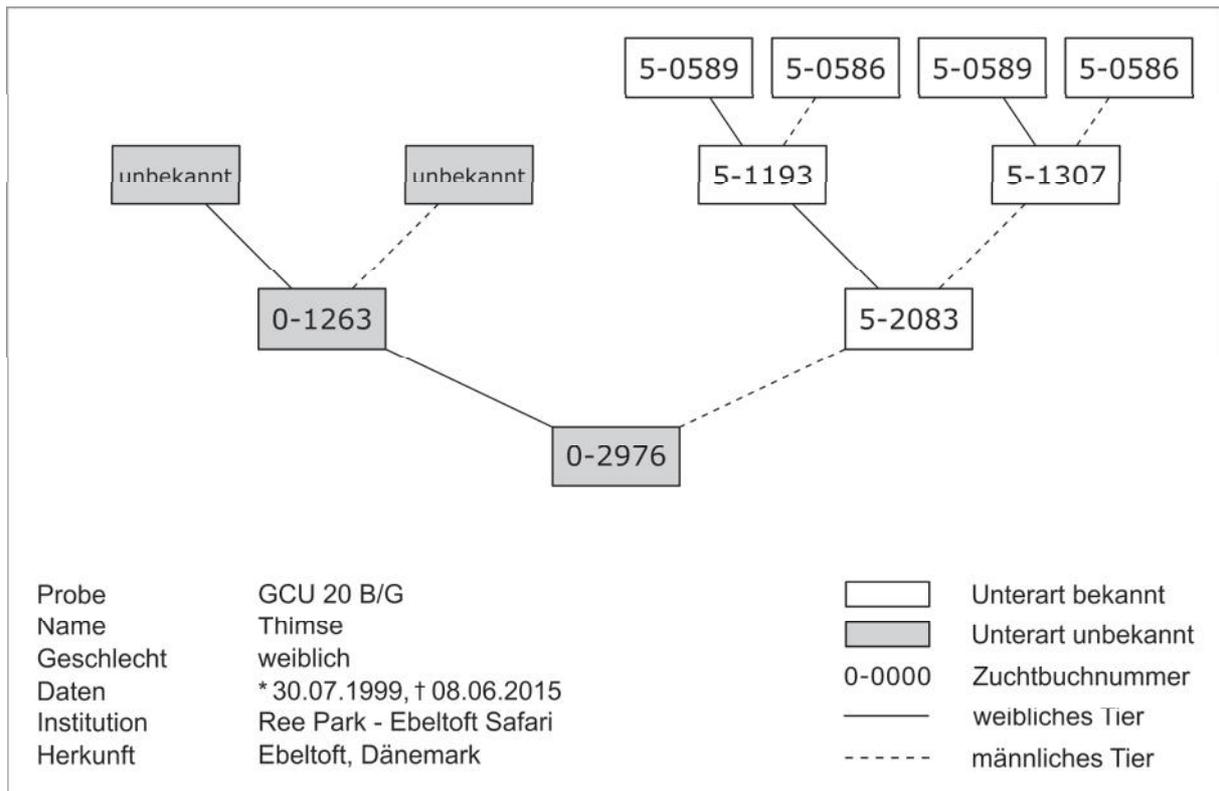


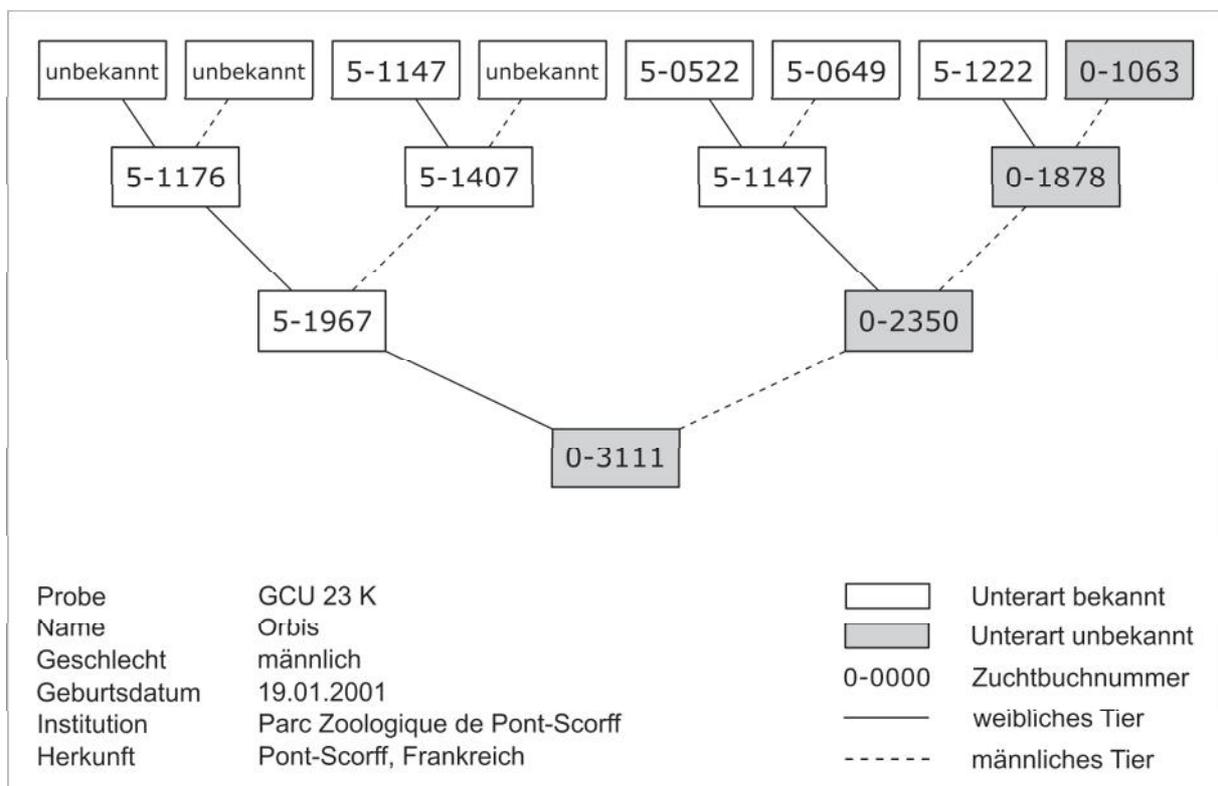
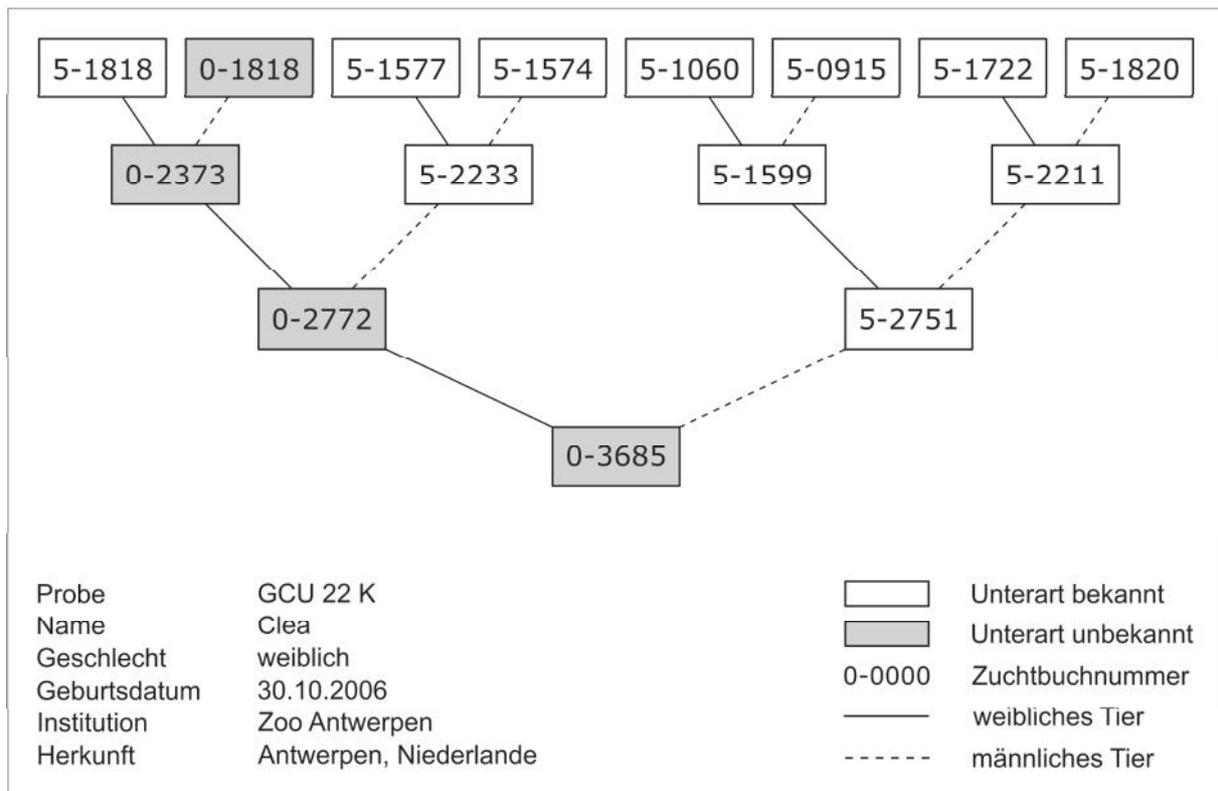


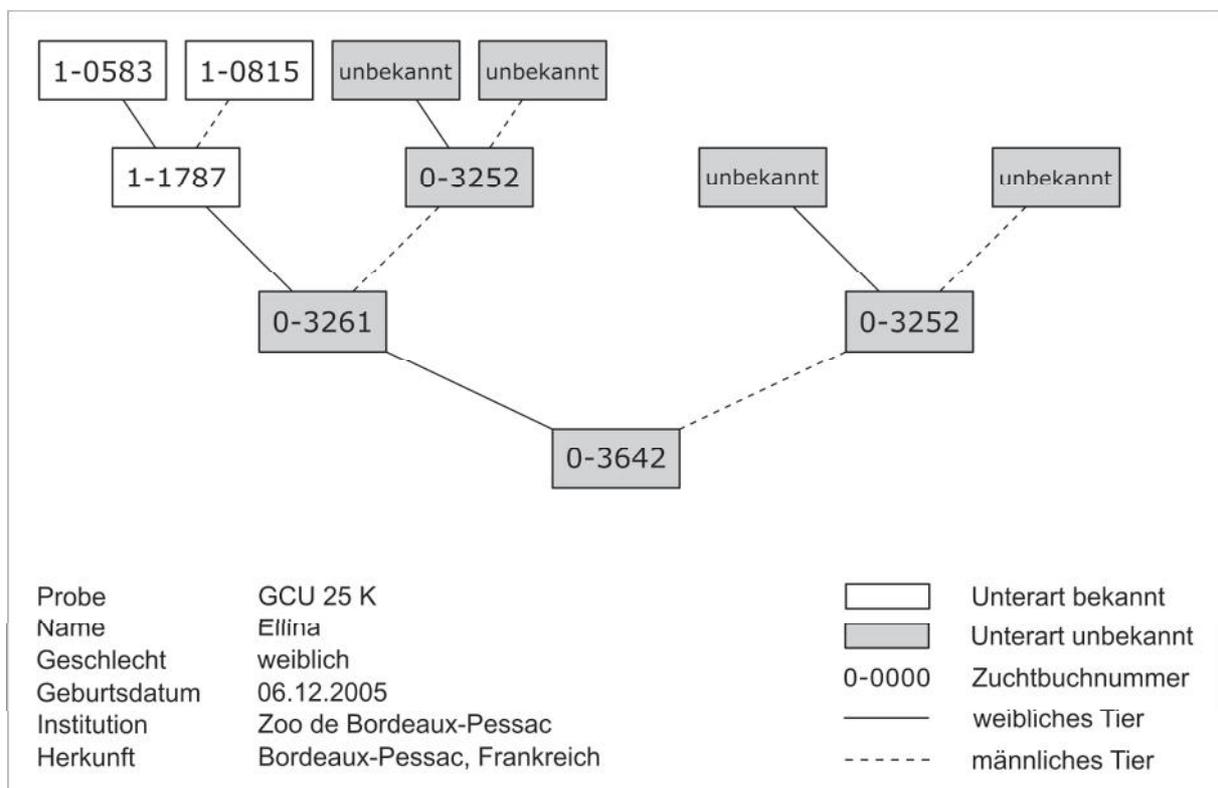
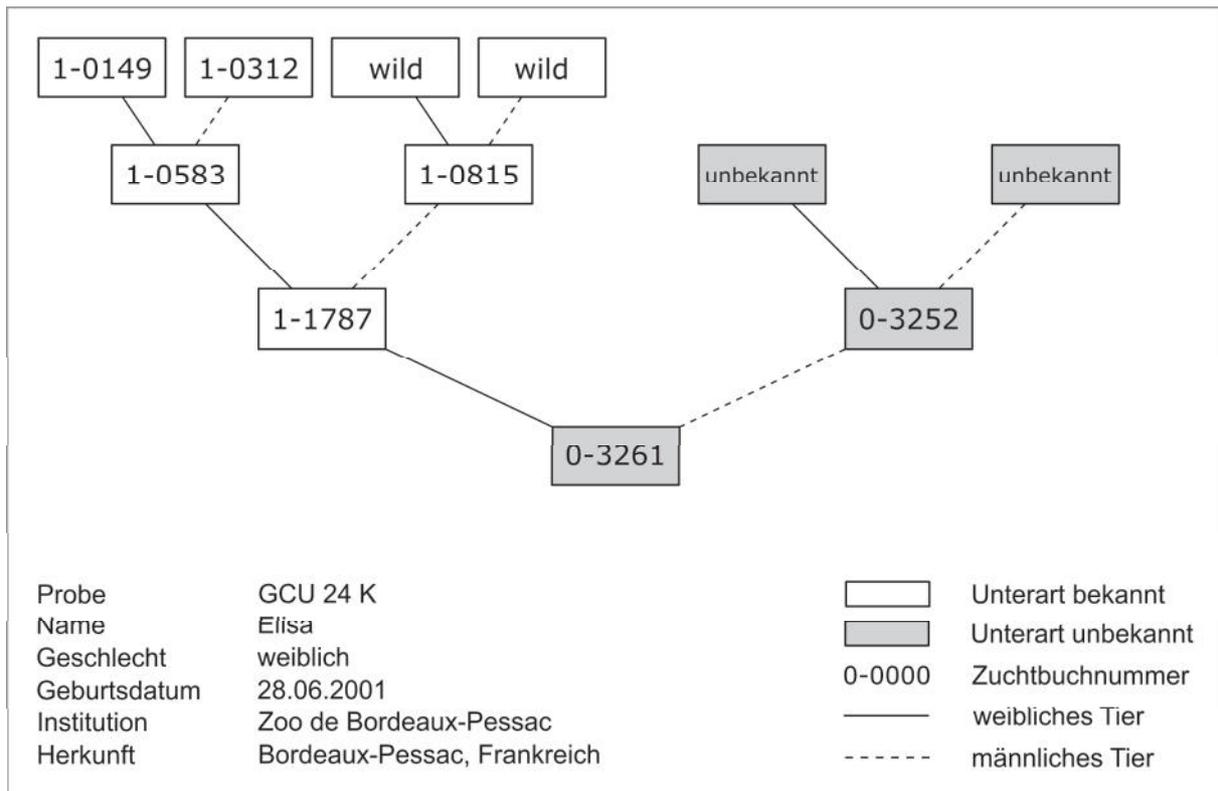


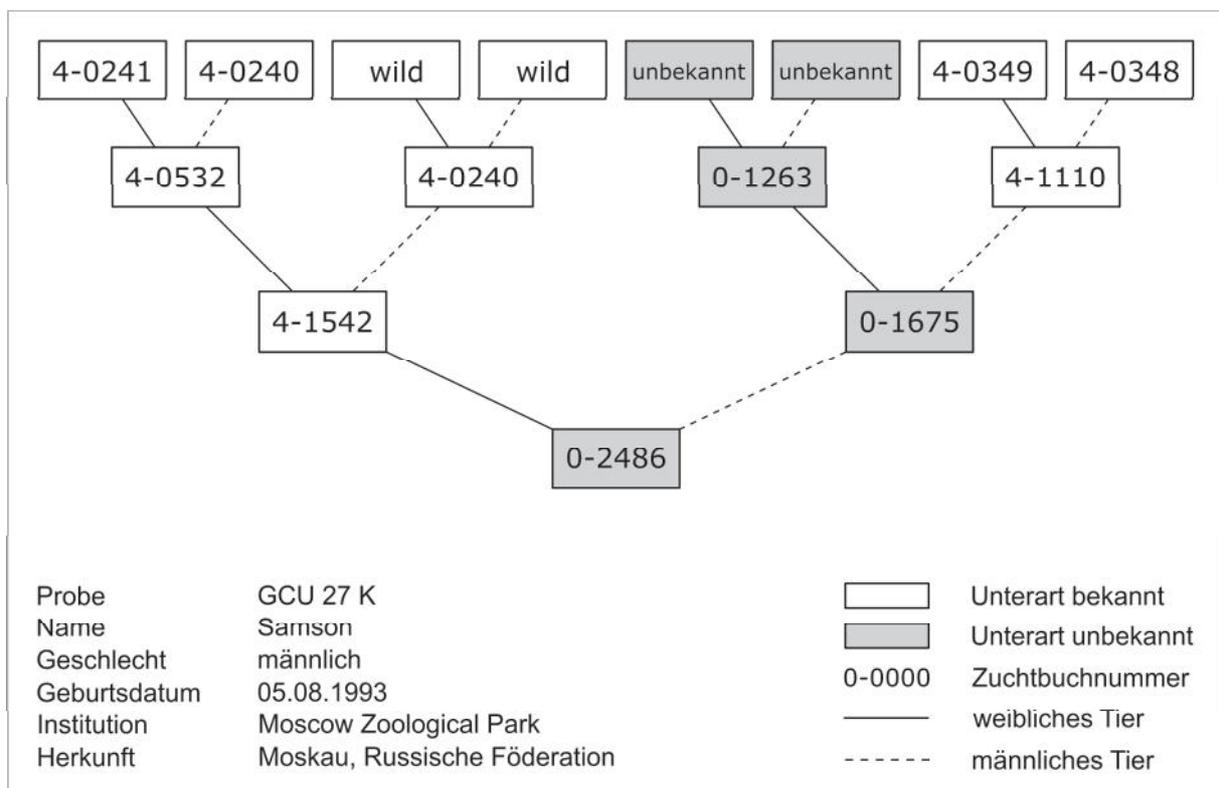
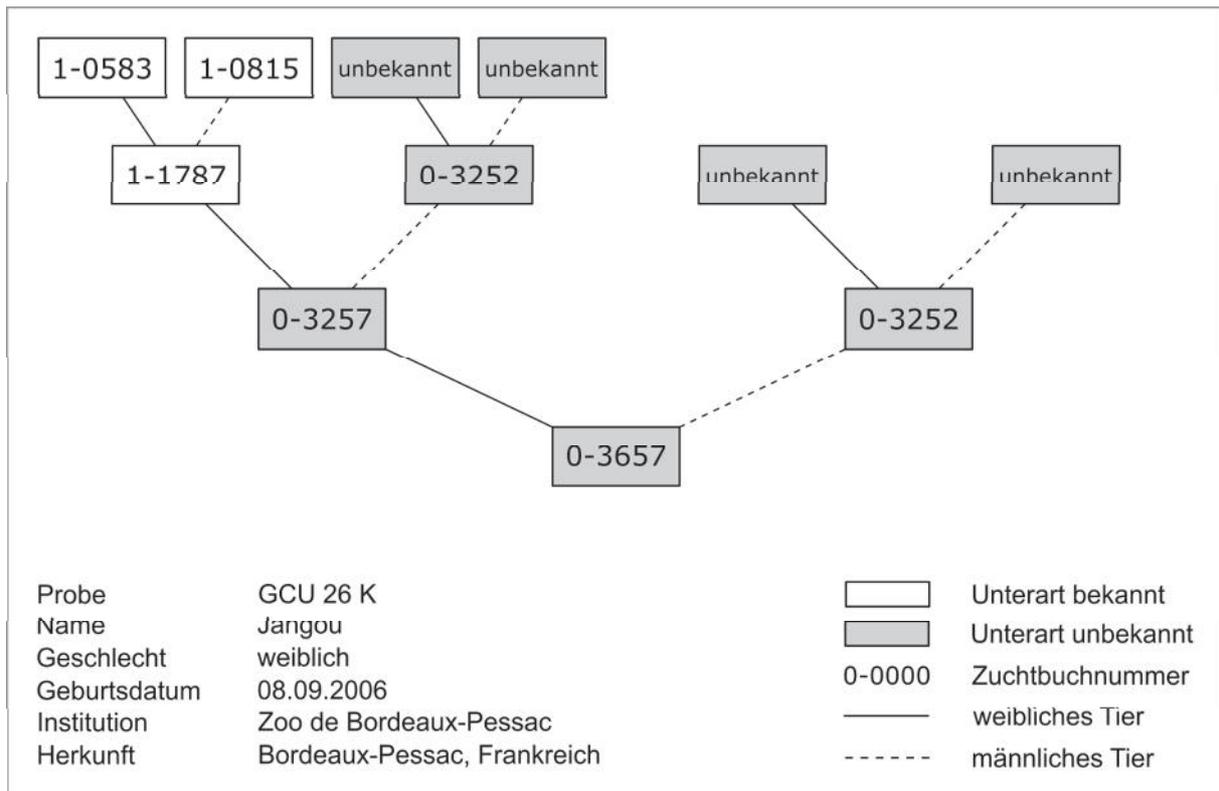












6.3 Tabellen

Tabelle 6.1: Genotypen der sieben Mikrosatelliten-Loci aller Proben. Probenamen geben die Unterarten an: GCA = *G. c. angolensis*, GCQ = *G. c. antiquorum*, GCG = *G. c. giraffa*, GCE = *G. c. reticulata*, GCR = *G. c. rothschildi*, GCT = *G. c. tippelskirchi* und GCU = unbekannter Unterartstatus. Fehlende Daten werden durch „-1“ dargestellt

Probe	11HDZ 443		11HDZ 665		11HDZ 102		11HDZ 480		11HDZ 562		11HDZ 567		11HDZ 1004	
GCA 1 B	158	158	232	232	216	216	137	137	163	163	202	202	178	178
GCA 2 K	158	158	230	232	216	216	139	139	161	163	202	202	178	178
GCA 3 K	156	158	232	232	214	214	137	137	161	163	202	202	178	178
GCA 4 K	156	158	232	232	216	216	137	139	161	163	202	202	178	180
GCA 5 K	156	158	-1	-1	216	216	139	139	161	161	202	202	178	178
GCA 6 K	158	158	230	230	216	216	139	139	163	163	-1	-1	178	178
GCA 7 K	158	158	216	216	216	216	137	137	163	163	202	202	170	170
GCA 8 K	158	158	-1	-1	216	216	137	137	155	161	202	202	178	178
GCA 9 K	158	158	-1	-1	216	216	-1	-1	151	161	202	202	-1	-1
GCA 10 K	158	166	236	238	216	216	137	137	161	161	202	202	178	178
GCA 11 K	156	156	232	232	216	216	135	139	161	163	202	202	178	178
GCA 12 K	156	158	232	232	216	216	137	137	163	165	202	202	178	178
GCQ 1 K	-1	-1	232	232	214	214	151	151	-1	-1	202	202	178	178
GCQ 2 K	160	160	236	236	200	200	153	153	145	145	190	202	178	178
GCQ 3 K	-1	-1	226	226	214	214	153	153	193	193	-1	-1	-1	-1
GCQ 4 K	158	158	-1	-1	202	202	153	153	145	145	-1	-1	176	176
GCQ 5 K	148	148	226	226	214	214	151	151	145	149	202	202	176	176
GCQ 6 K	148	148	232	232	214	216	153	153	145	145	202	202	178	178
GCQ 7 K	148	148	226	226	214	214	151	153	145	149	228	228	178	178
GCQ 8 B	148	160	232	232	214	216	153	153	145	145	202	202	176	178
GCQ 9 K	148	148	232	232	214	214	151	153	145	145	202	202	178	178
GCG 1 K	156	156	232	232	216	216	133	137	159	163	202	202	162	190
GCG 2 K	168	168	-1	-1	216	216	137	137	159	159	202	202	178	190
GCG 3 K	156	168	232	232	216	216	137	137	159	159	198	198	190	190
GCG 4 K	156	156	232	232	216	216	137	137	159	159	202	202	190	190
GCE 1 G	148	160	228	228	214	214	139	149	159	161	202	212	178	180
GCE 2 K	148	160	222	240	214	214	139	149	157	161	202	202	178	178
GCE 3 K	148	160	226	238	214	214	139	149	157	159	202	234	162	178
GCE 4 K	148	158	226	228	214	214	137	139	145	157	212	212	178	178
GCE 5 K	160	160	226	240	214	214	139	149	155	157	202	234	162	178
GCE 6 K	148	156	226	226	214	214	139	149	145	159	202	212	180	180
GCE 7 K	148	162	226	226	214	214	137	137	157	157	212	212	180	180
GCE 8 K	156	156	226	226	214	214	147	151	161	161	234	234	162	162
GCE 9 K	148	156	216	218	214	214	137	139	145	157	234	234	162	180
GCE 10 K	156	162	218	226	214	214	139	147	161	161	212	212	162	180
GCE 11 K	158	162	226	226	214	214	139	147	161	161	212	212	162	180
GCE 12 B	160	160	222	228	214	214	149	151	161	163	202	232	178	180

Tabelle 6.1: Genotypen der sieben Mikrosatelliten-Loci aller Proben. Probenamen geben die Unterarten an: GCA = *G. c. angolensis*, GCQ = *G. c. antiquorum*, GCG = *G. c. giraffa*, GCE = *G. c. reticulata*, GCR = *G. c. rothschildi*, GCT = *G. c. tippelskirchi* und GCU = unbekannter Unterartstatus. Fehlende Daten werden durch „-1“ dargestellt

Probe	11HDZ 443		11HDZ 665		11HDZ 102		11HDZ 480		11HDZ 562		11HDZ 567		11HDZ 1004	
GCR 21 K	156	158	222	226	214	214	149	149	145	163	202	212	178	178
GCR 22 B	156	158	222	238	214	214	149	149	161	163	212	212	176	178
GCR 23 K	156	160	222	228	214	214	149	149	143	163	202	202	176	176
GCR 24 K	156	160	238	266	214	214	149	149	145	163	212	212	176	176
GCR 25 K	148	160	222	228	214	214	149	151	143	163	202	202	176	176
GCR 26 K	158	164	228	232	214	214	149	149	145	163	202	212	176	178
GCR 27 K	156	164	240	266	214	214	149	151	145	163	202	202	168	178
GCR 28 K	158	160	226	232	214	214	149	153	145	163	202	202	168	178
GCR 29 K	148	160	240	266	214	214	151	151	143	145	212	212	176	176
GCR 30 K	160	164	228	228	214	214	149	149	145	145	202	202	168	176
GCR 31 K	148	160	-1	-1	214	214	137	137	145	163	202	202	176	176
GCR 32 K	156	156	228	240	214	214	149	153	145	163	212	212	176	176
GCR 33 K	158	158	-1	-1	214	214	137	137	145	145	212	212	178	178
GCT 1	162	164	216	234	214	214	137	137	159	161	226	242	162	176
GCU 1 K	158	158	234	234	214	214	149	151	161	163	202	212	192	192
GCU 2 K	148	156	222	228	214	214	149	151	145	163	202	212	176	178
GCU 3 K	-1	-1	240	240	214	214	149	151	145	161	234	234	162	174
GCU 4 K	148	156	222	222	214	214	149	149	163	163	212	212	178	178
GCU 5 K	148	160	228	228	214	214	149	151	143	147	202	212	176	176
GCU 6 K	160	164	228	236	214	214	149	153	145	155	202	212	176	178
GCU 7 K	148	148	228	234	214	214	151	151	145	145	202	202	178	178
GCU 8 K	148	156	-1	-1	214	214	151	151	145	145	-1	-1	178	178
GCU 9 K	156	156	222	222	214	214	149	153	159	159	202	202	178	178
GCU 10 K	148	148	222	222	214	214	149	149	145	157	202	202	176	176
GCU 11 K	160	160	222	226	214	214	149	151	143	163	202	202	176	178
GCU 12 K	156	164	-1	-1	214	214	137	137	-1	-1	212	212	162	178
GCU 13 K	156	158	-1	-1	214	214	153	153	145	145	202	202	168	176
GCU 14 K	148	160	-1	-1	214	214	-1	-1	145	145	-1	-1	168	168
GCU 15 K	148	148	-1	-1	214	214	137	137	155	155	202	202	178	178
GCU 16 K	162	162	-1	-1	214	214	-1	-1	157	157	202	202	168	180
GCU 17 K	158	160	232	234	216	216	137	137	145	145	202	202	176	184
GCU 18 K	148	156	218	226	214	214	149	149	145	161	202	232	168	180
GCU 19 B	148	160	222	240	214	214	149	149	143	143	202	212	176	178
GCU 20 B	158	158	228	238	214	214	149	153	145	145	202	202	178	178
GCU 21 K	156	164	222	222	214	214	149	149	145	163	202	202	178	178
GCU 22 K	156	158	228	232	214	216	149	151	145	145	202	202	178	178
GCU 23 K	148	156	-1	-1	214	214	149	149	145	145	202	202	178	178
GCU 24 K	154	156	-1	-1	214	214	137	137	-1	-1	202	202	-1	-1
GCU 25 k	148	148	-1	-1	214	214	139	139	-1	-1	226	242	-1	-1
GCU 26 K	148	160	228	228	214	214	149	149	145	145	202	202	178	178
GCU 27 K	160	164	226	226	214	214	149	153	145	161	202	212	168	180

Tabelle 6.2: Allelgrößen und Allelfrequenzen aller Proben der sieben Loci

Locus	Allel	Allelgröße	Allelfrequenz	Anzahl der Proben
11HDZ443	1	148	0,2400	75
	2	154	0,0067	
	3	156	0,2333	
	4	158	0,2267	
	5	160	0,1733	
	6	162	0,0400	
	7	164	0,0533	
	8	166	0,0067	
	9	168	0,0200	
11HDZ665	1	216	0,0323	62
	2	218	0,0242	
	3	222	0,1371	
	4	226	0,1935	
	5	228	0,1532	
	6	230	0,0242	
	7	232	0,2339	
	8	234	0,0403	
	9	236	0,0323	
	10	238	0,0403	
	11	240	0,0645	
	12	266	0,0242	
11HDZ102	1	200	0,0128	78
	2	202	0,0128	
	3	214	0,7500	
	4	216	0,2244	
11HDZ480	1	133	0,0067	75
	2	135	0,0067	
	3	137	0,2533	
	4	139	0,1267	
	5	147	0,0200	
	6	149	0,3067	
	7	151	0,1467	
	8	153	0,1333	

Tabelle 6.2: Allelgrößen und Allelfrequenzen aller Proben der sieben Loci

Locus	Allel	Allelgröße	Allelfrequenz	Anzahl der Proben
11HDZ562	1	143	0,0473	74
	2	145	0,3514	
	3	147	0,0068	
	4	149	0,0135	
	5	151	0,0068	
	6	155	0,0338	
	7	157	0,0676	
	8	159	0,0878	
	9	161	0,1689	
	10	163	0,1959	
	11	165	0,0068	
	12	193	0,0135	
11HDZ567	1	190	0,0068	73
	2	198	0,0137	
	3	202	0,6507	
	4	212	0,2192	
	5	226	0,0137	
	6	228	0,0137	
	7	232	0,0137	
	8	234	0,0548	
	9	242	0,0137	
11HDZ1004	1	162	0,0743	74
	2	168	0,0608	
	3	170	0,0135	
	4	174	0,0068	
	5	176	0,2095	
	6	178	0,4865	
	7	180	0,0878	
	8	184	0,0068	
	9	190	0,0405	
	10	192	0,0135	

Tabelle 6.4: Allelvariationen aller Loci für die sechs bekannten Unterarten

G. c. angolensis		G. c. antiquorum		G. c. giraffa		G. c. reticulata		G. c. rothschildi		G. c. tippelskirchi	
135	139	145	145	133	137	137	137	137	137	137	137
137	137	145	149	137	137	137	139	143	145	159	161
137	139	148	148	156	156	139	149	143	163	162	164
139	139	148	160	156	168	139	147	145	145	162	176
151	161	151	151	159	163	145	157	145	163	214	214
155	161	151	153	159	159	145	159	148	160	216	234
156	158	153	153	162	190	147	151	149	149	226	242
158	158	158	158	168	168	148	156	149	151		
158	166	160	160	178	190	148	158	149	153		
161	163	176	176	190	190	148	160	151	151		
163	163	176	178	198	198	148	162	156	156		
163	165	178	178	202	202	149	151	156	158		
170	170	190	202	216	216	155	157	156	160		
178	178	193	193	232	232	156	156	156	164		
178	180	200	200			156	162	158	158		
202	202	202	202			157	157	158	160		
214	214	214	214			157	159	158	164		
216	216	214	216			157	161	160	164		
230	230	226	226			158	162	161	163		
230	232	228	228			159	161	168	176		
232	232	232	232			160	160	168	178		
236	238	236	236			161	161	176	176		
						161	163	176	178		
						162	162	178	178		
						162	178	202	202		
						162	180	202	212		
						178	178	212	212		
						178	180	214	214		
						180	180	222	226		
						202	202	222	228		
						202	212	226	232		
						212	212	228	228		
						214	214	228	232		
						216	218	228	240		
						218	226	238	266		
						222	228	240	266		
						222	240				
						226	226				
						226	228				
						226	238				
						226	240				
						228	228				
						234	234				

Tabelle 6.5: Signifikanzwerte für die Populationsdifferenzierung F_{ST} . Signifikanzlevel $p = 0,05$

G. c.	angolensis	antiquorum	giraffa	reticulata	rothschildi	tippelskirchi
angolensis	*					
antiquorum	0.00000	*				
giraffa	0.00000	0.00000	*			
reticulata	0.00000	0.00000	0.00000	*		
rothschildi	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	*	
tippelskirchi	0.99099	0.99099	0.99099	0.99099	0.99099	*

Tabelle 6.6: Referenzen der NCBI-Datenbank für die Sequenzen in den phylogenetischen Stammbäumen

Name der Sequenz	Accession	Name der Sequenz	Accession
<i>G. c. angolensis 1</i>	HG975224.1	<i>G. c. reticulata 8</i>	EU088323.1
<i>G. c. angolensis 2</i>	HG975225.1	<i>G. c. reticulata 9</i>	EU088326.1
<i>G. c. angolensis 3</i>	HG975226.1	<i>G. c. reticulata 10</i>	EU088327.1
<i>G. c. angolensis 4</i>	HG975227.1		
<i>G. c. angolensis 5</i>	HG975228.1	<i>G. c. rothschildi 1</i>	HG975232.1
		<i>G. c. rothschildi 2</i>	HG975233.1
<i>G. c. antiquorum 1</i>	HG975231.1	<i>G. c. rothschildi 3</i>	HG975234.1
<i>G. c. antiquorum 2</i>	EF442265.1	<i>G. c. rothschildi 4</i>	HG975235.1
<i>G. c. antiquorum 3</i>	EF442266.1	<i>G. c. rothschildi 5</i>	HG975236.1
<i>G. c. antiquorum 4</i>	EF442267.1	<i>G. c. rothschildi 6</i>	HG975237.1
<i>G. c. antiquorum 5</i>	EF442268.1	<i>G. c. rothschildi 7</i>	HG975238.1
		<i>G. c. rothschildi 8</i>	HG975239.1
<i>G. c. giraffa 1</i>	HG975269.1	<i>G. c. rothschildi 9</i>	HG975240.1
<i>G. c. giraffa 2</i>	HG975270.1	<i>G. c. rothschildi 10</i>	EU088328.1
<i>G. c. giraffa 3</i>	HG975271.1	<i>G. c. rothschildi 11</i>	EU088329.1
<i>G. c. giraffa 4</i>	HG975272.1	<i>G. c. rothschildi 12</i>	EU088330.1
<i>G. c. giraffa 5</i>	HG975273.1	<i>G. c. rothschildi 13</i>	EF442273.1
<i>G. c. peralta 1</i>	HG975286.1	<i>G. c. thornicrofti 1</i>	HF571177.1
<i>G. c. peralta 2</i>	HG975287.1	<i>G. c. thornicrofti 2</i>	HF571178.1
<i>G. c. peralta 3</i>	HG975288.1	<i>G. c. thornicrofti 3</i>	HF571179.1
<i>G. c. peralta 4</i>	HG975289.1	<i>G. c. thornicrofti 4</i>	HF571180.1
<i>G. c. peralta 5</i>	HG975290.1	<i>G. c. thornicrofti 5</i>	HF571181.1
<i>G. c. reticulata 1</i>	EF442272.1	<i>G. c. tippelskirchi 1</i>	HG975261.1
<i>G. c. reticulata 2</i>	EU088325.1	<i>G. c. tippelskirchi 2</i>	HG975262.1
<i>G. c. reticulata 3</i>	EU088320.1	<i>G. c. tippelskirchi 3</i>	HG975263.1
<i>G. c. reticulata 4</i>	EU088324.1	<i>G. c. tippelskirchi 4</i>	HG975264.1
<i>G. c. reticulata 5</i>	EU088322.1	<i>G. c. tippelskirchi 5</i>	HG975163.1
<i>G. c. reticulata 6</i>	EU088319.1		
<i>G. c. reticulata 7</i>	EU088321.1	<i>Okapia johnstoni</i>	HF571214.1

6.4 Abbildungen

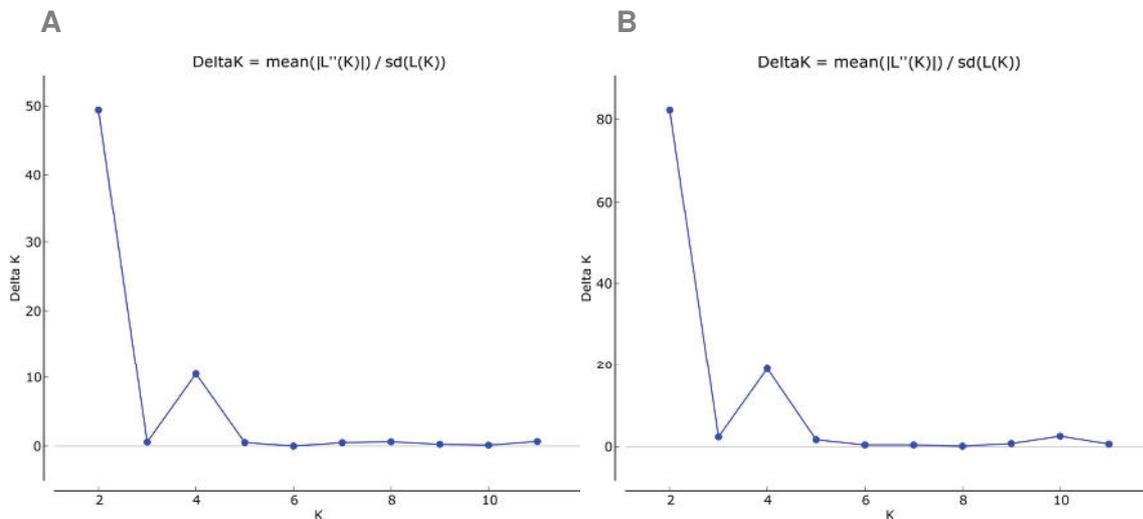


Abbildung 6.1: Ergebnis aus STRUCTURE HARVESTER: Delta K in Abhängigkeit von der Clusteranzahl K.
 A 6 Populationen der bekannten Unterarten, 41 Individuen, ohne Missing Data, K = 4
 B 7 Populationen, 78 Individuen, K = 4 ermittelt aus 100 Berechnungen

6.5 Extraktionsprotokolle

DNA-Extraktion mit dem DNeasy® Blood & Tissue Kit

- 1a. 25 mg Gewebe wurde zerkleinert und in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. 180 µl ATL Puffer und 20 µl Proteinase K wurden hinzugefügt. Nach dem Vortexen wurden die Proben ca. drei Stunden bis zur vollständigen Lyse des Gewebes bei 56 °C auf einem Thermoblock mit 300 rpm inkubiert.
- 1b. 20 µl Proteinase K wurden in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. 5-10 µl Blut, welches zuvor mit einem Antikoagulans versetzt worden war (EDTA), wurde hinzugefügt und das Reagens bis zu einem Volumen von 220 µl mit PBS aufgefüllt.
- 2a. Die Gewebeprobe wurde für 15 Sekunden gevortext. 200 µl AL Puffer wurden zu den Proben gegeben und diese erneut gevortext.
- 2b. Zu den Blutproben wurden 200 µl AL Puffer hinzugefügt und diese für zehn Minuten bei 56 °C inkubiert.
3. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol (96-100 %) wurde erneut gevortext.
4. Die Proben wurden vollständig auf eine DNeasy Mini Spin-Säule aufgetragen und für eine Minute zentrifugiert (8000 rpm). Der Überstand wurde verworfen.
5. Die Spin-Säule wurde in einem neuen Auffanggefäß platziert. Nach Hinzufügen von 500 µl AW1 Puffer wurde die Probe für eine Minute zentrifugiert (8000 rpm) und der Überstand verworfen.

6. Die Spin-Säule wurde erneut in ein neues Auffanggefäß überführt und 500 µl AW2 Puffer hinzugefügt. Nach Zentrifugation für drei Minuten (14.000 rpm) wurde der Überstand verworfen.
7. Die Spin-Säule wurde in ein neues Auffanggefäß überführt.
8. Zur Elution der DNA wurden 200 µl AE Puffer auf das Zentrum der Spin-Säule aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute folgte eine Zentrifugation für eine Minute (8000 rpm).
9. Die DNA wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Spin-Säule wurde verworfen.

Modifiziertes Protokoll für die DNA-Extraktion mit DNAzol® (Schweinsberg, 2010)

1. Zu jeder Probe wurde 600 µL DNAzol® und 12 µL Polyacryl Carrier pipettiert.
2. Die Probe wurde zur Lyse des Gewebes für 45 Minuten inkubiert.
3. Die Flüssigkeit wurde ohne die Proben in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 300 µL Ethanol (100 %) versetzt und invertiert.
4. Nach einer Inkubationszeit von drei Minuten wurden die Proben für fünf Minuten zentrifugiert (5000 rpm).
5. Der Überstand wurde verworfen und 300 µL Ethanol (95 %) zum Pellet hinzugefügt.
6. Die Probe wurde für jeweils eine Minute inkubiert und zentrifugiert (5000 rpm).
7. Schritt fünf und sechs wurden mit 70 % Ethanol wiederholt.
8. Das Pellet wurde auf einem Heizblock bei 36 °C getrocknet und anschließend in 50 µL TE-Minimum-Puffer gelöst.

Danksagung

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meiner Betreuerin und Referentin Frau PD Dr. Kathrin Lampert für die umfassende Betreuung und die Möglichkeit, diese Masterarbeit anzufertigen, aussprechen. Vor allem danke ich Dir für das mir entgegengebrachte Vertrauen, ein derartiges Projekt mit vielen Unwägbarkeiten und organisatorischem Aufwand schaffen zu können. Gerade in den schweren Zeiten hast Du mir immer die Hoffnung auf ein gutes Ende gegeben und so schöpfte ich mit jedem Gang in Dein Büro nicht nur Motivation sondern gelangte auch einen Schritt näher an mein Ziel.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Dominik Begerow zudem für die Bereitschaft zum Korreferat und dem damit verbundenen Aufwand danken.

Herrn Prof. Dr. Ralph Tollrian danke ich für die Rahmenbedingungen, die er kontinuierlich am Lehrstuhl für uns Studenten schafft und somit diese Arbeit für mich ermöglichte.

Ein besonderer Dank geht an Alex, Arne und Max, die mir in unzähligen Situationen ihre Hilfe nicht verwehrt und mir auch darüber hinaus die eine oder andere Türe geöffnet haben. Basel, Hannah, Jan, Jana, Lisa, Martina, Nina, Sandra, Wiebke und dem gesamten Lehrstuhl danke ich für das gemeinsame Lachen, zusammen Kaffee trinken und einfach für eine gute Zeit, die wir zusammen im Büro verbringen durften.

Herrn Dipl. Biol. Jörg Jebram, Herrn Dipl. Biol. Wolf-Dietrich Gürtler und Frau Wiebke Wolff aus der Zoom Erlebniswelt Gelsenkirchen sowie allen lieben Menschen aus all den zoologischen Gärten, die mich unterstützt haben, ein herzliches Dankeschön.

Abschließend gilt ein ganz besonderer Dank meinem Freund Christoph, der mich vom ersten Moment an dazu motiviert hat, dieses Projekt anzugehen und dessen herzliche Worte und unendliche Geduld mir Stütze, Inspiration und Mut gegeben haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die heute eingereichte Masterarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe. Bei der vorliegenden Masterarbeit handelt es sich um in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare.

Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Bochum, den

.....

(Unterschrift)