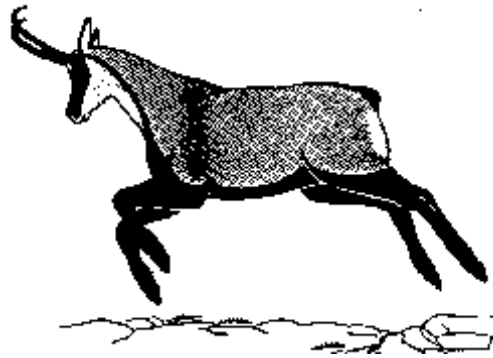


Molekulargenetische Variabilität und Differenzierung in der Gattung *Rupicapra* (Artiodactyla, Bovidae)



DIPLOMARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades
Magistra Rerum Naturalium
an der Formal- und Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Wien

DURCHFÜHRUNG

Sabine Hammer

ORT

Institut für Wildtierkunde und Ökologie,
Veterinärmedizinische Universität Wien

LEITUNG

Univ.Prof. Dr. Günther B. Hartl

Wien, im Januar 1996

Was ihr nicht faßt, das fehlt euch ganz und gar,
Was ihr nicht rechnet, glaubt ihr, sei nicht wahr.
Was ihr nicht wägt, hat für euch kein Gewicht;
Was ihr nicht münzt, das, glaubt ihr, gelte nicht.

J.W. von Goethe

Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei meinen Eltern für die langjährige und geduldige Unterstützung meines Lebenswandels bedanken.

Ich danke meinem Betreuer, Univ.Prof.Dr. Günther B. Hartl (Institut für Haustierrkunde, Universität Kiel), für die Überlassung der Fragestellung sowie die Durchsicht und Korrektur des Manuskripts und die zahlreichen wichtigen wie auch lehrreichen Anregungen.

Ebenso Univ.Prof.Dr. Kurt Onderscheka, der mir die Durchführung dieser Diplomarbeit am Institut für Wildtierkunde und Ökologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien ermöglichte.

Anita Haiden und Dr. Karl Nadlinger danke ich für ihre herzliche Aufnahme in die Abteilung sowie die Anleitungen für die praktischen Arbeiten und ihr Verständnis für meinen Lebens- und Arbeitsrhythmus.

Bei Univ.Doiz.Dr. Wilhelm Pinsker (Institut für Allgemeine Biologie, Universität Wien) und Dr. Franz Suchentrunk (Institut für Wildtierkunde und Ökologie, Vet.Med. Universität Wien) möchte ich mich ebenfalls für ihr Interesse an meiner Arbeit, die vielen anregenden Diskussionen und Hilfestellungen bedanken.

Weiters gilt mein Dank allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Wildtierkunde und Ökologie für ihre freundliche Unterstützung.

Dr. Rita Lorenzini (Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Teramo), Dr. P. G. Meneguz (Universität Turin) und Dr. I. Marco Sanchez (Universität Barcelona) danke ich zusammen mit Dr. Barbara Chovancova (Tatra National Park), Dr. Peider Ratti (Forstinspektorat Graubünden), den MitarbeiterInnen des FUST Achenkirch sowie der Universität Laibach für die großzügige Hilfe bei der Beschaffung von Organproben.

Nicht zuletzt danke ich allen meinen Freundinnen und Freunden einfach dafür, daß es sie gibt.

Diese Arbeit wurde unterstützt vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF), Österreich und trägt die Projektnummer P09660-BIO, bewilligt für Dr. Günther B. Hartl.

SUMMARY

Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) of mitochondrial DNA were used to investigate genetic differentiation among chamois (genus *Rupicapra*). A total of 58 individuals from six different geographic areas (High Tatra, Achenkirch, Graubünden, Slovenia, Val di Susa and Catalunya) were examined. In each chamois complete mtDNA was isolated from frozen liver, digested with 16 six-base cutting restriction endonucleases and screened by agarose gel electrophoresis. Fragment lengths were determined by using Lambda phage DNA digested with HindIII as a size standard.

The digestion of mtDNA yielded a total of 67 restriction sites and based on the presence and absence of these restriction sites 8 different haplotypes could be defined. Six haplotypes were found in 4 local populations of *R. rupicapra rupicapra* and the nucleotide divergence ranged from 0.05% to 0.25%.

From the area of the High Tatra (subspecies *R. rupicapra tatica*) the mtDNA of only one chamois could be examined and showed the standard haplotype found in *R. rupicapra rupicapra*. However, to refuse the presumed subspecies status of this protected population, more individuals from the High Tatra need to be investigated.

MtDNA in the specimens from Catalunya (Pyrenées), belonging to the presumed species *Rupicapra pyrenaica*, was polymorphic for two haplotypes not found in any population of *Rupicapra rupicapra*.

Mean nucleotide divergence among haplotypes found in *R. rupicapra* and *R. pyrenaica* was 0.56%, and based on this value an estimated divergence time of about 280 000 years supports the hypothesis of a colonization of Europe by two different forms of *Rupicapra* (*R. rupicapra* and *R. pyrenaica*), having separated during the Riss glacial in the late Pleistocene.

Pairwise net nucleotide diversity of about 1.1% between chamois populations of the Alps and of the Pyrenées is in agreement with separate species status of *R. rupicapra* and *R. pyrenaica* as proposed on the basis of morphological, behavioural, and electrophoretic data.

The Cytochrome b gene of 16 specimens from seven different populations of *Rupicapra* (Abruzzo mountains, Val di Susa, High Tatra, Achenkirch, Graubünden, Slovenia and Catalunya) was amplified using PCR. The digestion of this 1.2kb fragment with four- and five-base cutting restriction enzymes yielded 4 different haplotypes.

Two haplotypes (1 and 2) were found among the samples of *R. rupicapra*. The specimens from Catalunya (*R. pyrenaica pyrenaica*) showed one haplotype (3) not found among any other

population, just like the chamois from the Abruzzo mountains (*R. pyrenaica ornata*) showing the separate haplotype 4.

Nucleotide divergence between haplotypes 1 and 3 was 0.58%, and between haplo-types 1 and 4 a divergence of 1.89% was observed. Based on these values divergence times of about 290 000 and 945 000 years were estimated. These data correspond with the results obtained by RFLP-analysis of the complete mitochondrial genome.

Genetic variation in 95 chamois (*R. rupicapra rupicapra*) from three Slovenian populations (Triglav, Kamnik and Maribor) was investigated by horizontal starch gel electrophoresis. A total of 25 enzymes were examined in liver or kidney tissues, and of 40 scorable loci, only Pgm-2 (Phosphoglucomutase) was polymorphic with two alleles. Observed heterozygosity was 0.8%, and the proportion of polymorphic loci measured 2.6%. In addition the genetic divergence values between the three populations ranged from 0.6 to 1.5%.

INHALT

SUMMARY	I
INHALT	III
I. EINLEITUNG	
1. Das genetische System der Vertebraten-Mitochondrien	1
1.1. Die mitochondriale DNA von Säugetieren	1
1.2. RFLP-Analyse mitochondrialer DNA	4
1.2.1. Vererbung und Mutabilität der mitochondrialen DNA	4
1.2.2. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLPs)	5
1.2.3. Cytochrom b-System	5
1.2.4. Eignung für populationsgenetische Studien	7
1.2.5. Einsatzgebiete der RFLP-Analyse mitochondrialer DNA	8
2. Enzymelektrophorese	9
3. Die Gemen (Gattung <i>Rupicapra</i>)	10
3.1. Systematische Stellung und Stammesgeschichte	10
3.2. Verbreitungsgebiete und Bestandsgrößen	13
4. Zielsetzung dieser Arbeit	17
II. MATERIAL UND METHODEN	
1. Untersuchte Tiere	18
2. RFLP-Analyse der mitochondrialen DNA	21
2.1. Isolierung der mtDNA mittels CsCl/EtBr-Gradienten	21
2.2. mtDNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	24
2.3. mtDNA-Fragmenttrennung mittels Agarosegelelektrophorese	26
2.4. Berechnung der Fragmentlängen	28

3. RFLP-Analyse des Cytochrom b-Gens	29
3.1. Amplifizierung des Cytochrom b-Gens mit PCR	29
3.2. Spaltung des Cytochrom b mit Restriktionsenzymen	32
3.3. Cytochrom b-Fragmenttrennung mittels Agarosegelelektrophorese	33
3.4. Berechnung der Fragmentlängen	34
4. Enzymelektrophorese	35
4.1. Untersuchte Enzyme	35
4.2. Isolierung der Enzyme aus Organproben	35
4.3. Horizontale Stärkegelelektrophorese	37
4.4. Herkunft und Anzahl der untersuchten Tiere	39
5. Phylogenetische Interpretation	40
5.1. Genetische Divergenz	40
5.1.1. Codierung der Schnittstellen	40
5.1.2. Genetische Distanz	41
5.1.3. Genetische Divergenzzeit	42
5.2. Fitch-Margoliash Algorithmus	42
5.3. Maximum-Parsimony-Methode	44
5.4. Haplotypen- und Nukleotiddiversität	46
5.4.1. Haplotypendiversität	46
5.4.2. Haplotypenfrequenz	46
5.4.3. Nukleotiddiversität	46
5.5. Auswertung der Enzymelektrophorese	48
6. Verwendete Chemikalien und Enzyme	49
III. ERGEBNISSE	
1. RFLP-Analyse der mitochondrialen DNA	50
1.1. Fragmentlängen der Restriktionstypen	50
1.2. Gefundene mtDNA-Haplotypen	52
1.3. Geographische Verteilung der mtDNA-Haplotypen, Haplotypendiversität	55
1.4. Codierung der Schnittstellen	57
1.5. Genetische Divergenz und Divergenzzeiten	58

1.6. Dendrogramme	59
1.7. Codierung der Fragmente	62
1.8. Nukleotiddiversität	63
2. RFLP-Analyse des Cytochrom b-Gens	64
2.1. Fragmentlängen der Restriktionstypen	64
2.2. Gefundene Cytochrom b-Haplotypen	66
2.3. Geographische Verteilung der Cytochrom b-Haplotypen	68
2.4. Codierung der Schnittstellen	68
2.5. Genetische Divergenz und Divergenzzeiten	69
2.6. Dendrogramme	69
3. Enzymelektrophorese	71
IV. DISKUSSION	
1. Genetische Differenzierung bei <i>Rupicapra rupicapra</i>	72
1.1. Verteilung und Häufigkeit der mtDNA-Haplotypen	72
1.2. Genetische Variabilität	76
1.3. Genetische Divergenz	78
1.4. Zusammenfassung	79
2. Genetische Differenzierung bei <i>Rupicapra pyrenaica</i>	80
3. Genetische Differenzierung zwischen <i>R. rupicapra</i> und <i>R. pyrenaica</i>	81
3.1. RFLP-Analyse der gesamten mtDNA	81
3.2. RFLP-Analyse des Cytochrom b-Gens	84
3.3. Unterschiede in Morphologie und Verhalten	85
3.4. Zusammenfassung	86
V. ANHANG	
1. Abkürzungen	88
2. Literaturverzeichnis	90
3. Publikationen	96
4. Persönliche Daten	97

I. EINLEITUNG

1. DAS GENETISCHE SYSTEM DER VERTEBRATEN-MITOCHONDRIEN

1.1. DIE MITOCHONDRIALE DNA VON SÄUGETIEREN

Mitochondrien sind Zellorganellen, deren äußere Membran für kleine Moleküle und Ionen durchlässig ist, deren innere Membran hingegen stark gefaltet und für Ionen sowie polare Moleküle nahezu undurchlässig ist. Die Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) durch oxidative Phosphorylierung an der membrangebundenen ATPase der inneren Membran ist einer der Schlüsselprozesse der Atmungskette. Hierbei werden von den Coenzymen NADH und FADH_2 Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen, wodurch die Mitochondrien mit ihren Stoffwechselfvorgängen einen wichtigen Beitrag zur Energiegewinnung der Zelle liefern ("Kraftwerke der Zelle"). Weiters sind diese Zellorganellen fähig, energiereiche Kohlenstoffverbindungen über den Citratzyklus abzubauen, wie auch den Fettsäurestoffwechsel durchzuführen. Die Mitochondrien können einen Teil der dafür notwendigen Enzyme selbst synthetisieren, da einige Proteine in der mitochondrialen DNA (mtDNA) codiert sind. Die übrigen Proteine sind im Genom des Zellkerns codiert und werden bei Bedarf in die Mitochondrien eingeschleust.

Das Vorhandensein der Doppelmembran, die Existenz und die Struktur einer eigenen Desoxyribonukleinsäure (DNA) sowie die Stoffwechselaktivitäten der Mitochondrien unterstützen die sogenannte Endosymbiontenhypothese. Danach könnte es sich bei den Mitochondrien um Nachkommen der Purpurbakterien handeln, die ihre Fähigkeit zur Photosynthese zwar verloren haben, aber in einem sehr frühen Stadium in der Evolution eine Symbiose mit eukaryotischen Zellen eingegangen sind. Für diese Hypothese spricht auch die Tatsache, daß jene Gene des Zellkerns, die mitochondriale Proteine codieren, eine nicht zu übersehende Ähnlichkeit mit der Struktur von Bakteriengenomen aufweisen. Die Mehrzahl der Proteine (mindestens 90) werden im Zellkern codiert, sodaß hier ein früher, heftiger Gentransfer von mitochondrialen Genen in den Zellkern angenommen werden kann. Die Vermehrung der Mitochondrien ist unabhängig vom Zellzyklus. Es werden aber auf jede der Tochterzellen nach erfolgter Zellteilung genügend Mitochondrien aufgeteilt, sodaß in Leberzellen 1000-2000 Organellen ca. ein Fünftel des Zellvolumens einnehmen.

Bei Säugetieren umfaßt die mitochondriale DNA mit 16-18 Kilobasenpaaren (kb) ca. 0.001% der in einer Zelle vorhandenen Gesamt-DNA (Anderson et al., 1981; Avise, 1991; Bibb et al., 1981; Biju-Duval et al., 1991).

Insgesamt 94% der mtDNA codieren funktionale Ribonukleinsäuren (RNA). Die mitochondriale DNA ist ringförmig und doppelsträngig, wobei zwischen dem leichten L-Strang und dem schweren H-Strang unterschieden wird. Der H-Strang beinhaltet gegenüber dem leichteren Strang die 2.2fache Menge an Guanin sowie die 1.2fache Menge an Thymin. Auf

dem L-Strang sind 8 Transfer-RNAs (tRNAs) für 7 Aminosäuren und ein nicht identifizierter offener Leserahmen (URF6 = unidentified open reading frame) codiert, über dessen Funktion bislang wenig bekannt ist.

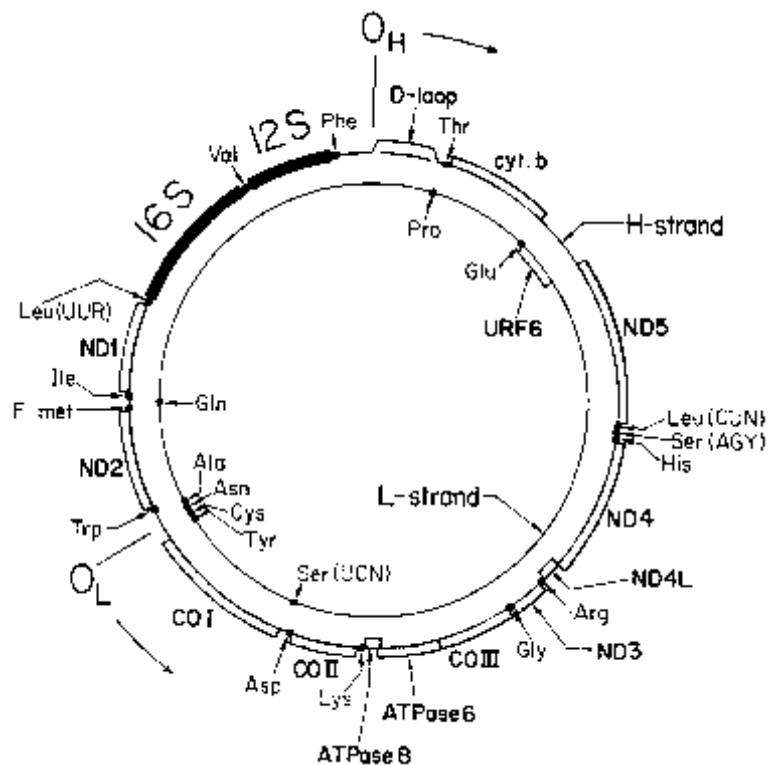


Abbildung I.1.: Das mitochondriale Genom der Säugetiere (aus Watson et al., 1987); Erläuterungen im Text; Y Pyrimidin-Base (C oder T); R Purin-Base (A oder G); N Pyrimidin- oder Purin-Base

Auf dem H-Strang finden sich 14 weitere tRNAs, alle funktionellen Proteine sowie die Gene der 12S und 16S rRNA (ribosomale RNA), die zwei Untereinheit der Ribosomen bilden. Die Enzyme umfassen Komponenten des ATPase-Komplexes (ATPase 6 und 8), drei Untereinheiten der Cytochrom-Oxidase (CO I-III), fünf Bestandteile der NADH-Dehydrogenase der Atmungskette (ND1-5) sowie das Cytochrom b-Gen (Cyt b). Abgesehen von zwei Regionen sind die meisten Gene nur durch 3 Basenpaare (bp) voneinander getrennt. Ein nichttranskribierter Abschnitt von 32bp Länge findet sich beim Ori_L (O_L, Replikationsstart des leichten L-Stranges), und ein weiterer zwischen dem Ori_H (O_H, Replikationsstart des schweren H-Stranges) und dem Cytochrom b-Gen. Letzterer wird als Kontrollregion beziehungsweise D-Loop (Displacement-Loop) bezeichnet, wobei die genaue Funktion dieses Abschnitts noch wenig bekannt ist. Die Länge dieser D-Loop Region kann von 200bp bis 4100bp zwischenartlich variieren (Brown, 1985).

Die mitochondriale DNA unterscheidet sich bezüglich ihrer Transkription und Translation in einigen wesentlichen Aspekten von der Kern-DNA. Die Boten-RNA (mRNA) der Mitochondrien besitzt weder eine Cap-Struktur noch eine 5'-leader Sequenz von bedeutender Länge. Das Stopcodon entsteht bei manchen Genen erst während der Polyadenylierung. Die tRNAs gehören Gruppen von 2 bis 4 Codons mit gleichem Informationsgehalt an (siehe Abbildung I.2.). Bei diesen sind möglicherweise nur 2bp an der Codon-Anticodon Wechsel-

wirkung beteiligt (Barrell, 1980). Bezüglich der Methylierung des Cytosins ist festzuhalten, daß der Methylierungsgehalt der mitochondrialen DNA weniger als 1% beträgt (Avisé & Lansman, 1983).

Genetischer Code

		Second Position					
		U	C	A	G		
First Position (5' End)	U	UUU } Phe (GAA) ⁺ UUC } UUA } Leu (UAA) UUG }	UCU } UCC } Ser (UGA) UCA } UCG }	UAU } Tyr (GUA) UAC } UAA } Stop UAG } Stop	UGU } Cys (GCA) UGC } <u>UGA</u> } Trp (UCA) UGG }	U C A G	
	C	CUU } CUC } Leu (UAG) CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro (UGC) CCA } CCG }	CAU } His (GUG) CAC } CAA } Gln (UUG) CAG }	CGU } CGC } Arg (UCG) CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } Ile (GAU) AUC } <u>AUA</u> } Met (CAU) [†] AUG }	ACU } ACC } Thr (UGU) ACA } ACG }	AAU } Asn (GUU) AAC } AAA } Lys (UUU) AAG }	AGU } Ser (GCU) AGC } <u>AGA</u> } Stop <u>AGG</u> } Stop	U C A G	
	G	GUU } GUC } Val (UAC) GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala (UGC) GCA } GCG }	GAU } Asp (GUC) GAC } GAA } Glu (UUC) GAG }	GGU } GGC } Gly (UCC) GGA } GGG }	U C A G	

I.2.: Der Genetische Code in den Mitochondrien von Säugetieren (aus Watson et al., 1987); Unterschiede zwischen dem "universellen" und dem mitochondrialen genetischen Code sind unterstrichen; ⁺ jede Gruppe von Codons in Klammern benötigt nur eine tRNA; [†] C in der ersten Position des Anticodons ermöglicht eine unübliche Paarung.

Die Replikation der mitochondrialen DNA beginnt am Ori_H und bewegt sich in eine Richtung bis der neue Strang den Ori_L erreicht hat.

Anschließend wird vom Ori_L aus der leichte L-Strang repliziert. Der vorhin erwähnte D-Loop könnte die Funktion haben, bei manchen Tieren die für die Replikation notwendigen RNA-Primer jederzeit bereitzustellen. Möglicherweise kann so aus einer Art "Warteposition" heraus mit der Replikation jederzeit begonnen werden, denn nach der Replikation finden sich 0.1-0.2% der Ribonukleotide des D-Loops zufällig über die neu synthetisierte mtDNA verteilt (Brown, 1983).

1.2. RFLP-ANALYSE MITOCHONDRIALER DNA

1.2.1. Vererbung und Mutabilität der mitochondrialen DNA

Vererbung der Mitochondrien

Die Vermehrung der Mitochondrien erfolgt semiautonom, da auch nukleäre Genprodukte an deren Zellteilung beteiligt sind, mittels Teilung in zwei Tochterorganellen und eigenständiger Replikation des gesamten Genoms (Kuroiwa et al., 1994). Die Vererbung wird als klonal bezeichnet, da sie fast ausschließlich maternal erfolgt und es zu keiner Rekombination zwischen mtDNA-Molekülen kommt (Giles et al., 1980). Abgesehen von Mutanten sind somit alle Nachfahren eines mtDNA-Moleküls identisch (Brown, 1985). Der maternale Erbgang ermöglicht die Aufdeckung von Introgression, da die mitochondriale DNA des Spenders im Empfängerorganismus erhalten bleibt (Ferris et al., 1983). In Vertebraten hingegen konnte eine Rekombination von mitochondrialer DNA auch in Hybridzonen nicht beobachtet werden (Awise, 1991). Da jede Population aus einer Reihe von Mutterlinien besteht, wird die mitochondriale DNA zur Aufklärung der Differenzierung innerhalb und zwischen Populationen herangezogen. Es handelt sich hierbei um phylogenetische Untersuchungen auf populationsgenetischer Ebene, die zu sogenannten phylogeographischen Mustern führen (Awise et al., 1987).

Mutabilität der mitochondrialen DNA

Die Replikation der mtDNA erfolgt durch eine gamma-Polymerase, die jedoch nicht über eine 5' → 3' Reparaturfunktion verfügt (Brown, 1983; Awise, 1991). Dadurch wäre die Höhe der Mutationsrate von 4.7×10^{-8} (Awise, 1991) bis 5.7×10^{-8} (Brown, 1983) zu erklären, die jene von nukleären Single Copy Genen um das fünf- bis zehnfache übersteigt.

Die durchschnittliche Rate fixierter Punktmutationen innerhalb des mitochondrialen Genoms wird bei Vertebraten mit ca. 2% pro Basenpaar pro 1 Million Jahre angenommen (Brown et al., 1979). Die niedrigste Evolutionsrate ist in den rRNA-Genen, im Cytochrom b-Gen sowie in einem die Replikation steuernden Abschnitt der Kontrollregion zu finden. Einer rascheren Veränderung sind hingegen der übrige Teil der Kontrollregion sowie die Gene ND2 und ND4L unterworfen.

Am häufigsten sind Punktmutationen in Form des Austauschs Guanin ↔ Adenin und Cytosin ↔ Thymin (Transition) zu finden, seltener sind Insertionen, Deletionen, Transpositionen oder Transversionen (Pyrimidin-Base ↔ Purin-Base). Die Rate fixierter Punktmutationen in Proteingenen an der dritten Codonposition ist in Übereinstimmung mit der neutralen Theorie der molekularen Evolution (Kimura, 1983) am höchsten. Mutationen an dieser Position haben aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes nur selten einen Aminosäureaustausch und somit phänotypische Veränderungen zur Folge.

1.2.2. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLPs)

Mitochondrien liegen in einer hohen Kopienzahl in Zellen vor, ihr Genom hat eine überschaubare Größe (16-18kb) und sie sind außerhalb des Zellkerns im Cytoplasma lokalisiert. Daher können sie, beziehungsweise ihre DNA mit geringem Aufwand aus einer größeren Anzahl von Tieren in guter Qualität und in ausreichender Quantität gewonnen werden. Wird die mitochondriale DNA anschließend mit Restriktionsendonukleasen gespalten, so können Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLPs) beobachtet werden, die für die Beantwortung einer Reihe von phylogenetischen Fragen dienen. Da eine Substitutionsrate von ca. 2% pro 1 Million Jahre angenommen werden kann, eignen sich RFLP-Analysen der mitochondrialen DNA besonders zum Vergleich verwandter Arten, die innerhalb der letzten 5 Millionen Jahre entstanden sind (Brown et al., 1982) sowie zur Abgrenzung verschiedener Populationen einer Art.

Für den Vergleich der Sequenzdivergenz aufgrund verschiedener Muster von Restriktionschnittstellen müssen die folgenden Bedingungen erfüllt sein (Nadlinger, 1994):

- jeder der gefundenen Unterschiede muß auf einzelnen Basensubstitutionen beruhen (keine Deletionen, Umordnungen, Duplikationen),
- es darf kein Wechsel in der Methylierung von Cytosin auftreten, alle Positionen müssen die gleiche Substitutionsrate besitzen,
- die Verteilung und Frequenz der Schnittstellen muß genauso zufällig sein wie alle anderen Basenabfolgen,
- die homologen Schnittstellen werden korrekt bestimmt, alle Restriktionsfragmente werden detektiert.

1.2.3. Cytochrom b-System

Neben der Verwendung der gesamten mitochondrialen DNA als populationsgenetisches Markersystem wird auch das Cytochrom b-Gen immer häufiger als zusätzlicher Marker eingesetzt. Nach Amplifizierung des Cytochrom b-Gens mittels Polymerasekettenreaktion (Irwin et al., 1991; Kocher et al., 1989; Saiki et al., 1988) können RFLP-Analysen wie auch Sequenzierungen dieses Abschnittes des mtDNA- Genoms durchgeführt werden.

Cytochrom b ist jenes der 9-10 Proteine vom Komplex III des mitochondrialen oxidativen Phosphorylierungssystems, das zum einen am besten beschrieben und zum anderen als einziges in der mtDNA selbst codiert ist (Hatefi, 1985). Da die Durchführung einer RFLP-Analyse die Dynamik der evolutiven Vorgänge in der mitochondrialen DNA nicht vollständig wiederzugeben vermag, ging man dazu über, Sequenzvergleiche anzustellen (Irwin et al., 1991; Kocher et al., 1989; Randi et al., 1994). Der Sequenzvergleich von Cytochrom b-Genen ermöglicht systematische Studien bei Taxa, deren Aufspaltung vor weniger als 5 bis ca. 65 Millionen Jahren stattgefunden hat. Aus solchen Daten können Aussagen bezüglich stiller Mutationen, Transitionen, Transversionen und anderer Veränderungen in diesem Gen

abgeleitet werden (Irwin et al., 1991).

Die Divergenzrate von stillen Transversionen (Pyrimidin-Base \leftrightarrow Purin-Base) an der dritten Position des Codons ist durchschnittlich 2.5mal (0.5% pro 1 Million Jahre) höher als in ribosomalen RNA-Genen (Irwin et al., 1991). Berücksichtigt man nun auch das Verhältnis von stillen Transitionen zu Transversionen von 10:1 an der dritten Position, so erhält man eine Divergenzrate der stillen Mutationen von durchschnittlich 10% pro 1 Million Jahre (Irwin et al., 1991).

Eine Divergenzrate von "replacement substitutions" an der ersten und zweiten Codonposition von 0.4% pro 1 Million Jahre wurde beim Vergleich von Ziege und Schaf festgestellt (Irwin et al., 1991). Dabei ist die Substitutionsrate an der ersten Position gegenüber jener an der zweiten Stelle um das vierfache höher (Brown et al., 1982). Die Substitutionsrate an der zweiten Position ist am niedrigsten, da hier jede Veränderung zu einer Aminosäuresubstitution führt (Irwin et al., 1991). Generell treten bei der ersten Codonposition 5%, bei der zweiten Position nahezu 0% und der dritten Codonposition 72% Substitutionen auf.

In der vorliegenden Arbeit wurde das gesamte Cytochrom b-Gen mittels zweier flankierender tRNA-Primer (Irwin et al., 1991; Kocher et al., 1989) amplifiziert, wodurch das PCR-Produkt eine Länge von 1191bp umfaßte (siehe Abbildung I.3.). Anschließend erfolgte eine Restriktionsanalyse mit 4- und 5-Basenschneidern. Eine Sequenzierung von Cytochrom b-Genen der untersuchten Gamsen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

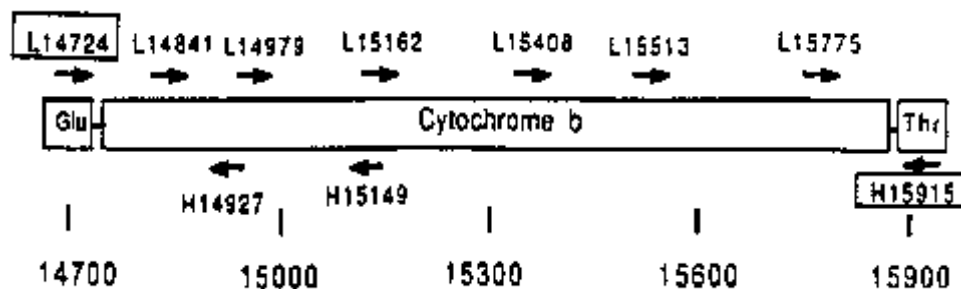


Abbildung I.3.: Cytochrom b-Gen auf dem schweren Strang des mt-Genoms von Säugetieren nach Irwin et al. (1991); Glu Glutaminsäure; Thr Threonin; L14714 und H15915 bezeichnen die Positionen (in bp) der für die PCR verwendeten Primer auf dem mt-Genom (Irwin et al., 1991)

1.2.4. Eignung für populationsgenetische Studien

Restriktionsenzyme spalten doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen, wodurch eine bestimmte Anzahl an Fragmenten entsteht, die von der Länge der Erkennungssequenz des Enzyms sowie dem GC-Gehalt der zu untersuchenden DNA abhängig ist (Nei & Li, 1979). Dieser Zusammenhang ist in folgender Formel berücksichtigt:

$$x = l(GC/2)^{r_1}[(1-GC)/2]^{r_2}$$

x Anzahl der zu erwartenden Fragmente

l Länge der zu untersuchenden DNA in bp

GC ... Anteil der Basen G und C in der zu untersuchenden DNA

r₁ Anzahl G plus C in der Erkennungssequenz des Enzyms

r₂ Anzahl A plus T in der Erkennungssequenz des Enzyms

Es ist ersichtlich, daß Enzyme, die 4 Basen als Erkennungssequenz benötigen (4-Basenschneider), die DNA häufiger spalten als 6-Basenschneider. Je höher nun die Fragmentanzahl ist, desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit, auf polymorphe Sequenzabschnitte und somit verschiedene mtDNA-Haplotypen zu stoßen. 4-Basenschneider sind für den Vergleich von Populationen innerhalb einer Art sehr gut geeignet, da im Durchschnitt eine untere Auflösungsgrenze von 0.05% Sequenzunterschied (Nukleotiddiversität, siehe II.5.4.) erzielt werden kann (Wilson et al., 1985).

Werden jedoch Vergleiche zwischen Arten angestellt, wo höhere Nukleotiddiversitäten zu erwarten sind, ist der Einsatz von 4-Basenschneidern ungeeignet (Nei & Li, 1979; Wilson et al., 1985). Um annehmen zu können, daß gleich große Fragmente bei verschiedenen Tieren homologe Abschnitte der mitochondrialen DNA enthalten, sollte deren Zahl bei Artvergleichen eher gering sein (Quinn & White, 1987). Der Einsatz von 6-Basenschneidern ermöglicht im Mittel eine Auflösung von mindestens 0.5% Nukleotiddiversität (Wilson et al., 1985). Diese gestattet eine Differenzierung sehr junger maternalen Linien, sodaß phylogenetische Beziehungen im Bereich des Art- und Unterartenniveaus aufgelöst werden können (Awise et al., 1987).

Bei Trennung einer Population in Teilpopulationen bleiben die maternalen Linien auf die jeweilige Teilpopulation beschränkt. Aufgrund deren Nukleotiddiversitäten kann der Zeitpunkt der Trennung abgeschätzt werden (Quinn & White, 1987). Sieht man von Arthybriden ab, so werden in der Regel zwischen Arten keine mtDNA-Haplotypen ausgetauscht, sodaß die zu erwartende Nukleotiddiversität mit der Höhe des phylogenetischen Alters der gemeinsamen Stammart zunimmt (Moritz et al., 1987).

1.2.5. Einsatzgebiete der RFLP-Analyse mitochondrialer DNA

Bereits vor zwanzig Jahren wurden RFLPs der mitochondrialen DNA in **phylogenetischen Untersuchungen** zur Radiation des heutigen Menschen (Johnson et al., 1983) und dessen systematischer Stellung innerhalb der Primaten (Ferris et al., 1981) verwendet.

Weiters geben RFLP-Analysen der mitochondrialen DNA auch Aufschluß über die **Mechanismen der Artbildung**. So gelang bei einigen als sympatrisch eingestuften Vogelarten der Nachweis einer allopatrischen Entstehung (Zink, 1991).

Mittels RFLP-Analysen der mitochondrialen DNA konnte beim Buckelwal die Aufspaltung in mehrere Subpopulationen nachgewiesen werden, was Rückschlüsse auf die **Soziobiologie** der Art erlaubt (Baker et al., 1990).

Hinsichtlich der **genetischen Folgen ökologischer Veränderungen** ist diese Methode ebenfalls von großer Bedeutung. Studien an amerikanischen Grauwölfen zeigten, daß in Minnesota bei 62% und in Quebec bei 100% der Individuen die mitochondriale DNA von Kojoten stammte. In Alaska und den North-West-Territories hingegen konnte weder eine Introgression von Kojoten-mtDNA in Grauwolfbestände, noch ein Vorkommen von Wolf-mtDNA bei den untersuchten Kojoten festgestellt werden. Derartige Hybridzonen sind ausschließlich in Gebieten zu finden, wo Wälder innerhalb kurzer Zeit großflächig in landwirtschaftliche Nutzflächen umgewandelt wurden. Daher ist der Schluß zulässig, daß bei der Zusammenführung von Arten durch plötzliche ökologische Veränderungen bevorzugt Hybride entstehen (Lehman et al., 1991).

Aufgrund der mtDNA-Differenzierung konnten bei einer Studie über europäische Rothirschpopulationen (*Cervus elaphus* L.) Aussagen bezüglich des **Artenschutzes und der Wildbewirtschaftung** getroffen werden. Autochthone Genpools können sich durch die Einbürgerung von standortfremdem Rotwild verändern. Die RFLP-Analyse der mitochondrialen DNA ermöglicht sowohl eine Abschätzung des Fortpflanzungserfolges von eingebürgerten weiblichen Individuen als auch die Lokalisation deren Herkunft (Hartl et al., 1995).

Im Rahmen der **molekularen Paläontologie** können mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion und anderer spezifischer Techniken (DNA-Fingerprinting, DNA-Sequenzierung etc.) Studien der mitochondrialen DNA oder der Kern-DNA von fossilem sowie in Museen aufbewahrtem Material (getrocknetes Tier- und Pflanzengewebe) durchgeführt werden (Herrmann & Hummel, 1994). So wurden 1972 in Qilakitsoq nahe bei Ummannaq in West-Grönland zwei Gräber mit acht mumifizierten Leichen gefunden. Die Altersbestimmung mittels der ¹⁴C-Methode ergab einen Zeitraum von 1475 ± 50 Jahren v.Chr. Nukleäre DNA wurde für die Geschlechtsbestimmung und mitochondriale DNA für die Feststellung des ethnischen Ursprungs mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert (Thuesen & Engberg, 1990).

2. ENZYMELEKTROPHORESE

Die multiplen molekularen Formen eines Enzyms werden als Isoenzyme bezeichnet. Diese unterscheiden sich zwar strukturell, aber nicht immer auch funktionell voneinander. Sie können die phänotypischen Produkte unterschiedlicher Genloci, verschiedener Allele an einem Genlocus oder posttranslationaler Modifikationen darstellen. Unter dem Begriff Alloenzyme versteht man jene Isoenzyme, die auf eine allelische Variabilität zurückgehen.

Die elektrophoretische Untersuchung von Alloenzymen stellt gegenwärtig im Bereich der Populationsgenetik und Systematik hinsichtlich des Zeit- und Laboraufwandes eine ökonomische Alternative zu zahlreichen DNA-Methoden (DNA-Fingerprinting, Sequenzierung, mtDNA-RFLP-Analysen, etc.) dar.

Nachteile dieser Methode liegen in der begrenzten Auflösungsfähigkeit wie auch in der mangelnden direkten Vergleichbarkeit publizierter Daten. Nur etwa ein Drittel der tatsächlich vorhandenen Variabilität kann aufgrund der Redundanz des genetischen Codes und der identischen Nettoladung verschiedener Aminosäuren mit Hilfe der Elektrophorese erfaßt werden (Ayala, 1977). Dem gegenüber steht das weite Einsatzgebiet dieser Methode, das, je nach Taxon, von der Unterscheidung von Individuen bis hin zur Systematik von Familien reicht.

Die Genetische Identität (I , Nei, 1972) beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der Individuen zweier Populationen oder Arten an einem willkürlich ausgewählten Genlocus identisch sind.

Die Genetische Distanz (D , Nei, 1972 und 1978) ist das Maß für die akkumulierten Codonsubstitutionen pro Genlocus. Basierend auf der Annahme einer durchschnittlichen, elektrophoretisch erkennbaren Substitutionsrate für Proteine kann die Genetische Divergenz innerhalb eines bestimmten Bereiches linear in eine Divergenzzeit umgerechnet werden (Nei, 1975).

Polymorphismen treten an manchen Isoenzymloci gehäuft und an anderen in der Regel überhaupt nicht auf. Daher sollten Polymorphie- und Heterozygotieraten immer auf der Basis weitgehend gleicher Gruppierungen von Isoenzymssystemen verglichen werden.

Die Heterozygotierate (H) gibt die genetische Variabilität in einem durchschnittlichen Individuum eines Bestandes an. Die Polymorphierate (P) beschreibt den Prozentsatz von polymorphen Loci. Zusammen mit der durchschnittliche Anzahl von Allelen pro Locus (A) charakterisiert sie die genetische Variabilität in einer Population.

3. DIE GEMSEN (GATTUNG *RUPICAPRA*)

3.1. SYSTEMATISCHE STELLUNG UND STAMMESGESCHICHTE

Die Ziegenartigen (Caprinae) stellen eine Unterfamilie der Bovidae (Hornträger oder Rinderartige) dar. Zu den Caprinae zählen zum Beispiel Wild- und Hausziege (*Capra aegagrus* und *Capra aegagrus* f. *hircus*), Wild- und Hausschaf (*Ovis ammon* und *Ovis ammon* f. *aries*), Steinbock (*Capra ibex*), Schraubenziege (*Capra falconeri*) und Mähnspringer (*Ammotragus lervia*). Eine Gattungsgruppe der Caprinae bilden die Rupicaprini (Gemsenartige), welcher neben den Gemsen (Gattung *Rupicapra*) auch die nordamerikanische Schneeziege (*Oreamnos*), die asiatische Urwaldgemse Goral (*Nemorhaedus*) sowie der Serau (*Capricornis*) zugeordnet werden (Knaus & Schröder, 1983; vgl. Abbildung I.4.).

Die Rupicaprini entstanden in der Zeit des Miozän in Asien. Sie breiteten sich während des frühen Pliozän und des mittleren Pleistozän weiter aus, wobei *Rupicapra* und *Oreamnos* Europa beziehungsweise Nordamerika besiedelten. Die Gemsen entwickelten sich im mittleren und späten Pleistozän in West-Eurasien (Masini & Lovari, 1988). Der asiatische Ursprung scheint durch fossile Funde der primitiven Stammform *Pachygazella grangeri* in Nord-China aus dem frühen Pliozän gesichert zu sein (Knaus & Schröder, 1983; Masini & Lovari, 1988). Im Pleistozän wurde durch die Eisvorstöße aus Nordeuropa die gesamte Fauna und Flora des europäischen Kontinents massiv verändert (siehe Abbildung I.5.). Die Gemsen waren gezwungen, in die eisfreien Gebiete nördlich und südlich der großen Gebirgszüge auszuweichen (Knaus & Schröder, 1983).

Känozoikum (Neozoikum) , Neuzeit			
Quartär (500-600 000) ¹⁾	Tertiär (70 Mio.) ¹⁾		Kreide (80 Mio.) ¹⁾
Holozän (geolog. Gegenwart)	Neogen	Paläogen	Jüngere Kreide
Pleistozän (Eiszeitalter)	-----		Ältere Kreide
Würm	Pliozän	Oligozän	
Riß	Miozän	Egozän	
u.a.		Paleozän	

Tabelle I.1.: In I.3.1. erwähnte Perioden der Erdgeschichte; ¹⁾ Dauer der Periode in Jahren

Zu Beginn der Würm-Eiszeit (vor ca. 80 000 Jahren) existierten zwei nahe verwandte Arten *Rupicapra pyrenaica* und *Rupicapra rupicapra*, wobei die erstere geographisch bereits in eine spanische Gruppe (Pyrenäen) und eine Zentral- und südapennine Gruppe (Mittelitalien) aufgespalten war. Das Verbreitungsgebiet von *Rupicapra rupicapra* erstreckte sich vom Kaukasus bis zu den Alpen (Masini & Lovari, 1988).

Da bei *Rupicapra pyrenaica* zahlreiche hoch konservierte Merkmale zu beobachten sind, wird vermutet, daß ihre Entwicklung von älteren Vertretern der Gattung *Rupicapra*, die während des mittleren Pleistozän nach Westeuropa gewandert sind, ausgegangen ist. Die an kältere Klimate gut angepaßte alpine Gemse (*Rupicapra rupicapra*) entwickelte sich vermutlich in Osteuropa. Sie war erst später aufgrund der zu trockenen Klimate in den östlichen mediterranen und pontischen Regionen gezwungen, nach Westeuropa auszuweichen. Da sich *Rupicapra rupicapra* in den wärmeren südlichen Gebieten Europas nicht ausbreitete, wurden diese von *Rupicapra pyrenaica* erfolgreich besiedelt (Masini & Lovari, 1988).

Paläontologische Befunde

Species	Specimens ⁺	Site	Age
<i>Rupicapra cf. pyrenaica</i>	(A)	Nestier (Cent. Pyrenees)	Late Riss
<i>Rupicapra pyrenaica</i>	(B)	Malarnaud (Cent. Pyrenees)	Early Würm
	(A)	La Vache (Pyrenees)	Late Würm
	(B)	Aitzbitarte iv (Cantabrics)	Late Würm
	(A)	Isturitz (Cantabrics)	Late Würm
	(A)	Mas d'Azil (Pyrenees)-1	Early Würm
	(A)	Mas d'Azil (Pyrenees)-2	Late Würm
	(A)	Papasidero (Southern Apennines)	Late Würm
	(B)	Grotta delle Balze (Central Apennines)	Early Holocene
	(B)	Ripa grande (Central Apennines)	Holocene
<i>Rupicapra rupicapra</i>	(A)	Farkaskoi Szilareg (Bukk Mts., Hungary)	Early Würm
	(A)	Subalyuk Barlang (Hungary)	Early Würm
	(B)	Trou de Nutons (Ardennes)	Late Würm
	(A) [†]	Grotta del Brojon (Eastern Alps)	Early Würm
	(A) [†]	Grotta del Principe (Western Alps)	Early Würm
	(A) [†]	Grotta die Fanciulli (Western Alps)	Late Würm
	(A) [†]	Grotta di Equi (Northern Apennines)	Early Würm
	(B)	Monte Sumbra (Northern Apennines)	Holocene

Tabelle I.2.: Fossile Funde von (*Rupicapra*) während der Riß- und Würm-Eiszeiten sowie dem Holozän nach Masini & Lovari (1988); ⁺ (A) isolated horn cores, (B) frontals with horn cores or well-preserved skulls; [†] taxonomic or chronologic reference may be questionable

Aus der obenstehenden Zusammenstellung fossiler Gemsenfunde (Tabelle I.2.) geht hervor, daß die vor allem von Lovari (1987), Masini & Lovari (1988) und Nascetti (1985) entwickelte Hypothese zweier getrennter Einwanderungslinien von *Rupicapra* in Europa durch zahlreiche fossile Funde von *Rupicapra pyrenaica* sowie *Rupicapra rupicapra* gestützt wird.

Die Systematik und Taxonomie der Gamsen wird einerseits bezüglich ihrer Stellung gegenüber anderen Vertretern der Caprinae (Geist, 1987; Hartl et al., 1990) und andererseits hinsichtlich der Unterteilung der Gattung in Arten und Unterarten seit geraumer Zeit sehr kontrovers diskutiert.

Seit den ersten systematischen Studien zu Beginn dieses Jahrhunderts gab es folgende Vorschläge bezüglich der Klassifikation innerhalb der Gattung *Rupicapra*:

- Lydekker (1913) ordnete alle bis zu diesem Zeitpunkt beobachteten Gamsen einer Art, *R. rupicapra*, zu.
- Camerano (1914) hingegen erweiterte diese Einteilung auf drei Arten: *R. rupicapra*, *R. pyrenaica*, *R. ornata*.
- Couturier (1938) und Dolan (1963) postulierten eine Art, *R. rupicapra*, die 10 Unterarten umfaßt (*R. r. rupicapra*, *R. r. cartusiana*, *R. r. carpatica*, *R. r. tatrica*, *R. r. balcanica*, *R. r. caucasia*, *R. r. asiatica*, *R. r. parva*, *R. r. ornata* und *R. r. pyrenaica*).
- Lovari (1987), Masini & Lovari (1988) und Nascetti et al. (1985) vertreten die Auffassung, daß *R. r. pyrenaica*, *R. r. parva* und *R. r. ornata* zu einer eigenen Art, *R. pyrenaica*, zählen. Die übrigen oben erwähnten Unterarten könnten der Art *R. rupicapra* zugeordnet werden. Die Gattung *Rupicapra* könnte somit in zwei Arten, *Rupicapra rupicapra* und *Rupicapra pyrenaica*, mit deren sieben beziehungsweise drei Unterarten eingeteilt werden.

Die Klassifikation nach Couturier und Dolan wird heute noch sehr häufig verwendet (vgl. Knaus & Schröder, 1983) und steht dem letztgenannten Modell der Systematik von *Rupicapra* in der aktuellen Diskussion gegenüber.

3.2. VERBREITUNGSGEBIETE UND BESTANDSGRÖSSEN

Im folgenden Abschnitt soll auf die gegenwärtigen Verbreitungsgebiete unter besonderer Berücksichtigung der Größe der einzelnen Gamsenbestände eingegangen werden. Einige Bestände sind deutlich vom Aussterben bedroht, andere hingegen konnten erfolgreich vergrößert oder zumindest konstant gehalten werden. Oftmals war der Schutz einer Gamsenpopulation beziehungsweise (Unter-)art in einem Nationalpark die einzige Möglichkeit, um deren Erhaltung zu sichern (zum Beispiel *Rupicapra pyrenaica ornata* im Abruzzen-Nationalpark in Mittelitalien). Bei den Gamsen handelt es sich um eine Gattung, deren gegenwärtige Gesamtindividuenzahl mit ca. 523 000 Tieren über die gefährdete Situation mancher Unterarten hinwegtäuscht. Die im alpinen Bereich (wie zum Beispiel in der Schweiz oder in Österreich) lebenden Gamsen sind in ihrem Bestand nicht gefährdet. Die Erhaltung

anderer Bestände beziehungsweise Unterarten, so zum Beispiel *Rupicapra rupicapra balcanica*, erfordert in Zukunft ein wirksames Wildtiermanagement. Pemberton et al. (1989) untersuchten mittels Enzymelektrophorese die genetische Differenzierung zwischen *Rupicapra r. rupicapra* und *Rupicapra r. cartusiana*. Es sollte festgestellt werden, ob es sich bei der Population aus dem Chartreusemassiv um eine Subspezies, *R. r. cartusiana*, handeln könnte. Die Genetischen Distanzen (Nei, 1972) zeigten, daß die Individuen von *R. r. cartusiana* die am stärksten isolierte Population bilden und daher als schützenswert einzustufen sind.

Verbreitung und Situation der Bestände

Rupicapra p. parva wurde in weiten Gebieten bereits ausgerottet. Jene Bestände, die im Nationalpark von Cavadonga angesiedelt wurden und im Massiv der Pena Ubina leben, gelten derzeit als gesichert.

Der Bestand in den spanischen Pyrenäen (*Rupicapra p. pyrenaica*) ist mit 25 000 Tieren ziemlich gesichert.

Wie oben bereits erwähnt, wurde *Rupicapra p. ornata* im Abruzzen-Nationalpark angesiedelt, um diese Unterart zu erhalten. Zusammen mit den frei lebenden Tieren im Apennin Mittelitaliens zählt der Bestand 350 Gemen und ist von der IUCN (International Union for Conservation of Nature) als potentiell gefährdet eingestuft (vgl. Tabelle I.3.).

Der Bestand von *Rupicapra r. cartusiana* in den französischen Alpen und im Chartreusemassiv ist mit 100 Individuen zahlenmäßig gering, sodaß hier in Zukunft die Bemühungen für seine Erhaltung fortgesetzt werden müssen.

Rupicapra r. rupicapra umfaßt mit 450 000 Tieren den größten Bestand wie auch das größte Verbreitungsgebiet (Einbürgerungen in Neuseeland) und ist somit nicht gefährdet.

Die Verbreitung von *Rupicapra r. tatrica* in der Hohen Tatra, in Polen und in der Slowakei ist mit 900 Vertretern dieser Unterart in ihrem Bestand gefährdet, obwohl in der Hohen Tatra keine Gemen gejagt werden dürfen.

In den transsylvanischen Alpen und in Rumänien existieren gesicherte Bestände von *Rupicapra r. carpatica* im Gegensatz zu *Rupicapra r. balcanica*, deren Verbreitung in Griechenland, Albanien, Rest-Jugoslawien, Kroatien und Bulgarien bereits gefährdet ist.

Der Bestand von *Rupicapra r. caucasica*, der 13 000 im Kaukasus lebende Tiere umfaßt, ist gesichert.

Rupicapra r. asiatica hat ihr Verbreitungsgebiet im Berggebiet des Pontus, des Taurus und Antitaurus, sowie in Kleinasien. Die Größe des Bestandes ist zahlenmäßig nicht bekannt und er wird als gefährdet eingestuft (Knaus & Schröder, 1983; Masini & Lovari, 1988).

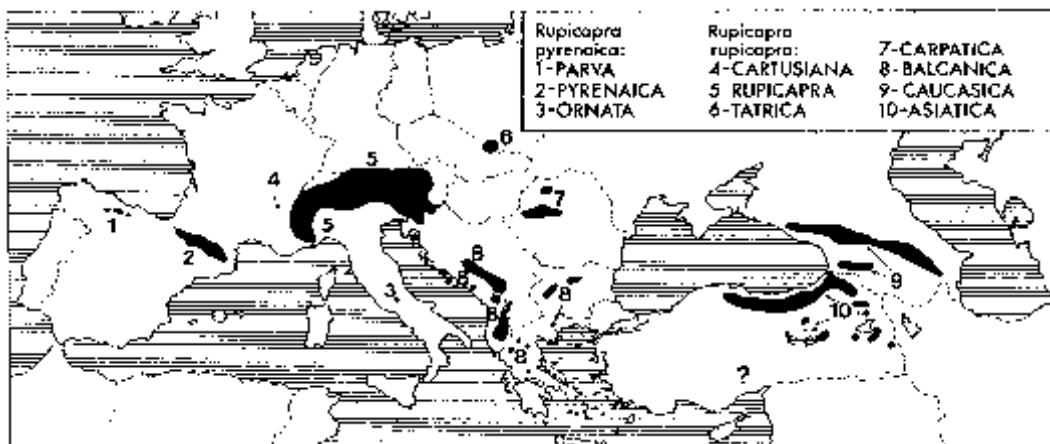


Abbildung I.6.: Verbreitungsgebiete von *Rupicapra* auf der Nordhalbkugel nach Lovari (1987); die Teilareale sind nach der Unterart benannt

Art	Unterart	Anzahl der Tiere
<i>Rupicapra pyrenaica</i>		31 350
	<i>parva</i> (Cabrera, 1911)	6 000
	<i>pyrenaica</i> (Bonaparte, 1845)	25 000
	<i>ornata</i> (Neumann, 1899)	350 [*]
<i>Rupicapra rupicapra</i>		491 500
	<i>cartusiana</i> (Couturier, 1938)	100
	<i>rupicapra</i> (Linné 1758)	450 000
	<i>tatrica</i> (Blahout, 1971)	900 ^{**}
	<i>carpatica</i> (Couturier, 1938)	2 500
	<i>balcanica</i> (Bolkay, 1925)	25 000 ^{**}
	<i>caucasia</i> (Lydekker, 1910)	13 000
<i>asiatica</i> (Lydekker, 1908)	nicht bekannt	
Insgesamt		522 850

Tabelle I.3.: Bestandsgrößen von *Rupicapra* modifiziert nach Masini & Lovari (1988); ^{*} potentiell gefährdet (IUCN); ^{**} gefährdet (IUCN)

Einbürgerungen

Abgesehen von den in Abbildung I.6. dargestellten Verbreitungsgebieten von *Rupicapra* finden sich Gamsen auch auf Neuseeland, deren einerseits aus Österreich (*R. r. rupicapra*), andererseits von der Hohen Tatra (*R. r. tatrica*) und/oder aus Rumänien (*R. r. carpatica*) stammende Gründerindividuen auf der Südinsel ausgesetzt wurden (Lovari, 1987). So wurden zum Beispiel 1907 acht Tiere aus Ebensee in Oberösterreich und 1914 drei Gamsen aus dem Tiergarten Schönbrunn in Wien nach Neuseeland verschifft. Diese Tiere konnten sich erfolgreich ansiedeln und vermehren (Knaus & Schröder, 1983).

Nach der Jahrhundertwende wurden in Nord-Böhmen (sächsisch-böhmisches Grenzgebiet) zwei Aussäzungen mit 11 sowie 15 Individuen der alpinen Gemse (*R. r. rupicapra*) durchgeführt. Der Bestand erhöhte sich bis 1945 auf 150 Tiere. In Sachsen gelangten 1940 sieben aus den bayerischen Alpen stammende Gemsen durch die Zerstörung eines Gatters unbeabsichtigt in Freiheit. Sie kreuzten sich mit den Tieren aus den beiden Beständen in Nord-Böhmen und die neue Population umfaßte 1960 130 bis 140 Tiere. In Tschechien können Gemsen aufgrund der hohen Populationsdichte bejagt werden. In Deutschland hingegen mußten sie unter Schutz gestellt werden, da das karge Sandsteingebiet in der Sächsischen Schweiz keinen optimalen Lebensraum darstellt (Knaus & Schröder, 1983).

Da Gemsen im Schwarzwald (BRD) bis ins 14. Jahrhundert zum Standwild gezählt hatten, wurden 21, aus den Revieren Ebensee in Oberösterreich und Leoben in der Steiermark stammende Tiere, in den Jahren 1935-39 dort wieder angesiedelt (Knaus & Schröder, 1983).

Weitere Einbürgerungen von *Rupicapra rupicapra rupicapra* erfolgten auch in Frankreich, Mittelitalien und im Grenzgebiet von Albanien zu Rest-Jugoslawien (siehe Abbildung I.7.).

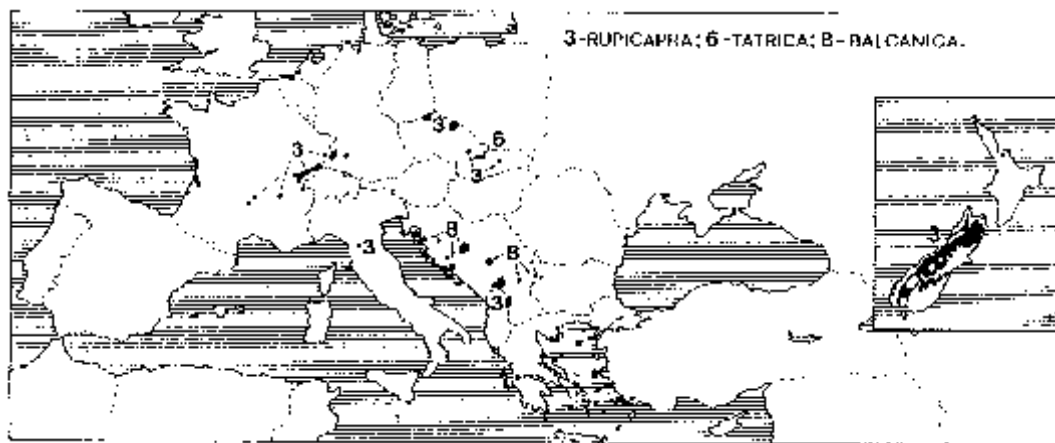


Abbildung I.7.: Eingeführte Gemsenpopulationen (*Rupicapra rupicapra* ssp.) nach Lovari (1987)

4. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit soll mit Hilfe der RFLP-Analyse der mitochondrialen DNA von verschiedenen Gemsenpopulationen die genetische Differenzierung zwischen *R. rupicapra* und *R. pyrenaica* im Vergleich zur Genetischen Divergenz zwischen Unterarten und lokalen Populationen von *R. rupicapra* untersucht werden.

- Vorweg soll geklärt werden, ob bei Gemsen generell eine Variabilität der mitochondrialen DNA vorhanden ist. Wenn dies zutrifft, wird diese Variabilität zur Ermittlung des Differenzierungsgrades innerhalb und zwischen lokalen Populationen der Gemse herangezogen.
- Weiters gilt es die Frage zu beantworten, ob die genetische Differenzierung zwischen einigen beschriebenen Unterarten größer ist als jene zwischen den untersuchten lokalen Populationen.
- Nicht zuletzt stellt sich die Frage nach dem Ausmaß der Genetischen Divergenz zwischen den postulierten Arten *R. pyrenaica* und *R. rupicapra*. Im Bereich der mitochondrialen DNA sollte sich die reproduktive Isolation von Arten in einer gegenüber Unterarten und lokalen Populationen deutlich erhöhten Genetischen Divergenz niederschlagen.
- Um festzustellen, in welchem Ausmaß die Differenzierung in der mitochondrialen DNA mit jener in einem anderen genetischen System übereinstimmt, wird in den slowenischen Beständen die genetische Variation in 25 Isoenzymssystemen elektrophoretisch untersucht. Die erhaltenen Daten werden außerdem mit jenen aus Arbeiten von Miller & Hartl (1986, 1987), Pemberton et al. (1989) und Rubin (1992) verglichen.

Das Ausmaß der Differenzierung innerhalb und zwischen den untersuchten Populationen wird im Zusammenhang mit der Hypothese einer getrennten Einwanderung von *Rupicapra pyrenaica* und *Rupicapra rupicapra* nach Europa während des Pleistozäns (Lovari, 1987; Masini & Lovari, 1988) interpretiert.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. UNTERSUCHTE TIERE

Alle untersuchten Tiere wurden im Rahmen der regulären regionalen Bejagung erlegt. Die Tiere waren adult, ohne besondere Auffälligkeiten, und beiderlei Geschlechts. Die Organproben, bestehend aus Leber oder Niere, wurden unmittelbar nach dem Abschluß den Tieren entnommen, so rasch wie möglich tiefgefroren und bis zur Untersuchung bei -20°C gelagert.

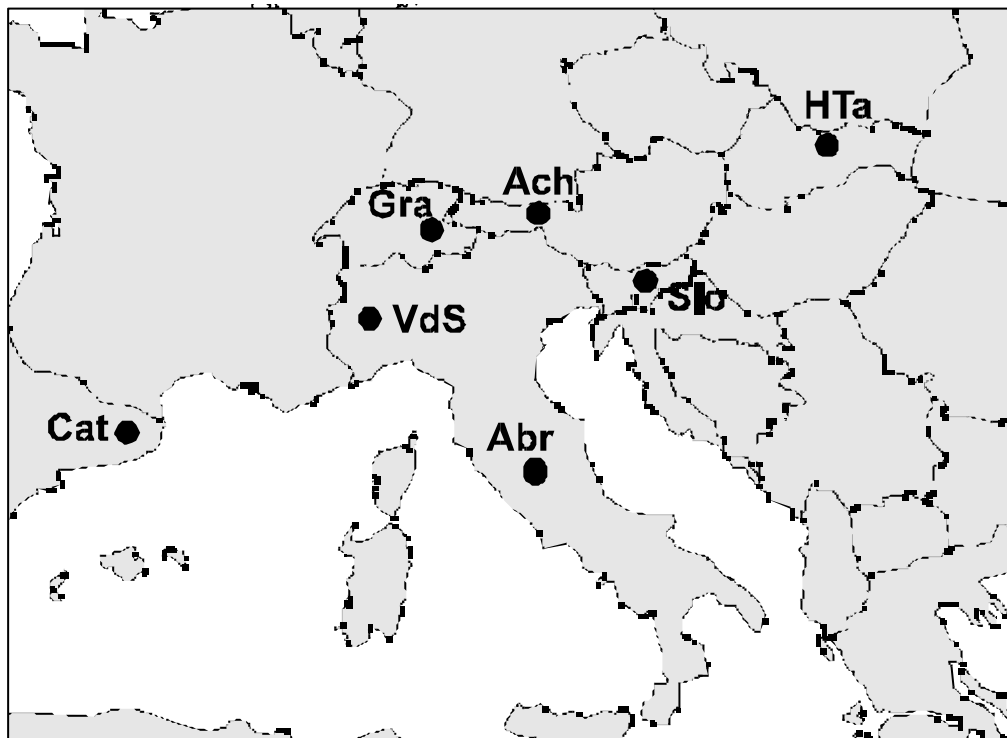


Abbildung II.1.: Herkunftsgebiete der untersuchten Gamsen; HTa = Hohe Tatra (Slowakei), Ach = Achenkirch (Österreich), Gra = Graubünden (Schweiz), Slo = Slowenien, VdS = Val di Susa (Italien), Abr = Abruzzo (Italien), Cat = Katalonien (Spanien)

Herkunftsland	Anzahl der Tiere
Slowakei	1
Österreich	8
Schweiz	16
Slowenien	18
Italien	7
Spanien	10
Gesamtanzahl	60

Tabelle II.1.: Übersicht über die Herkunft und Anzahl der untersuchten Tiere

Die Tabellen II.2. bis II.6. zeigen die geographische Herkunft der untersuchten Gamsen mit den dazugehörigen Revieren sowie die bei der Jagd dokumentierten Registernummern der einzelnen Tiere.

Slowenien	
Revier	Nummer
Gebiet 1: Kamnik	
Velika Planina	21, 22, 23, 76
Konc	27
Mokrica	75
Gebiet 2: Triglav	
Triglavski Narodni Park	29, 32, 34, 38
Kranjska Gora	37
Gebiet 3: Maribor	
Velo Polje	85
Komisija	91, 93
XI.Reon	94
Hudi Kot	97
Luknja	98
Smolnik	99

Tabellen II.2.: Herkunft und Nummern der Tiere aus Slowenien

Revier	Nummer
Slowakei	
Hohe Tatra	tat-1
Österreich	
Achenkirch	588, 598, 605, 659, 744, 938, 939, 947

Tabelle II.3.: Herkunft und Nummern der Tiere aus der Slowakei und Österreich

Schweiz/Graubünden	
Revier	Nummer
Klosters	116, 119, 251
Maienfeld	188, 212, 214, 215, 243
Luzein	235, 236, 255
Schiers	237, 259
Seewies	216
Malans	246
Fläsch	258

Tabelle II.4.: Herkunft und Nummern der Tiere aus der Schweiz

Italien	
Revier	Nummer
Val di Susa	1,2,3,4,5,6
Abruzzen	abr-1

Tabelle II.5.: Herkunft und Nummern der Tiere aus Italien

Spanien/Katalonien	
Revier	Nummer
Vallferrera, Lerida	19, 20, 22, 39
Pallars Sobira, Lerida	30
Parc National d'Aigues	40
Setcases, Gerona	29, 37, 38, 43

Tabelle II.6.: Herkunft und Nummern der Tiere aus Spanien

2. RFLP-ANALYSE DER MITOCHONDRIALEN DNA

2.1. ISOLIERUNG VON MtDNA MITTELS CsCl/EtBr-GRADIENTEN

(Lansman et al., 1981; Darley-Usmar, 1987; Rickwood, 1986)

Aus Organproben (Leber oder Niere) werden die Mitochondrien durch Homogenisieren und anschließende differentielle Zentrifugation vom Zellkern und den übrigen Zellbestandteilen abgetrennt. Die Lyse der Mitochondrien erfolgt durch das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS), welches in weiterer Folge mit den vorhandenen Proteinen einen Komplex bildet, sodaß diese durch Zentrifugation abgetrennt werden können.

Anschließend erfolgt die Trennung der superspiralisierten mtDNA von der Kern-DNA und der entspannten mtDNA durch Zentrifugation im CsCl/EtBr-Dichtegradienten.

Durch die Einlagerung von Ethidiumbromid (EtBr) in die DNA-Doppelhelix wird die Dichte der DNA verringert, wobei sich in die superspiralisierte mtDNA aufgrund ihrer kompakten Struktur deutlich weniger EtBr einlagern kann als in die lineare Kern-DNA oder in die entspannte zirkuläre mtDNA.

Die Zentrifugation erfolgt bei hoher Geschwindigkeit in der Ultrazentrifuge, wobei sich ein kontinuierlicher Caesiumchlorid (CsCl)-Dichtegradient einstellt, sodaß sich die verschiedenen DNA-Formen entsprechend ihrer unterschiedlichen Dichte trennen.

Da EtBr bei 590nm des sichtbaren Lichts das absorbierte UV-Licht emittiert, können die verschiedenen DNA-Formen durch das eingelagerte EtBr bei Betrachtung unter UV-Licht (302nm) als rot-orangefärbige Banden erkannt und getrennt voneinander isoliert werden.

Die obere der beiden Banden enthält neben Resten der nukleären DNA auch die entspannte mtDNA, die untere Bande besteht aus der superspiralisierten Form der mtDNA. Diese ist meist nur nach Aufarbeitung von frischen, noch nicht tiefgefrorenen Organproben vorhanden, bei länger gelagertem Material hingegen ist nur die obere Bande sichtbar, da hier die mtDNA vorwiegend entspannt vorliegt. Für Klonierungsexperimente sowie als Hybridisierungssonde eignet sich die mtDNA der oberen Fraktion nicht, da sie zu stark mit nukleärer DNA verunreinigt ist und daher qualitativ schlechter ist als die mtDNA in ihrer superspiralisierten Form.

Die so gewonnene mtDNA kann nun für RFLP-Analysen durch Spaltung mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen wie auch für Polymerase-Kettenreaktionen oder Sequenzreaktionen verwendet werden.

DURCHFÜHRUNG

Isolierung der Mitochondrien

- 10-20g Leber, Herz oder Niere sorgfältig in kleine Stücke schneiden und in 3ml/g MSB-Ca²⁺ aufnehmen
- In einem Potter-Homogenisator auf Eis homogenisieren (8-12x) und 0.05xVolumen DIS-EDTA zugeben (dieses Homogenisat kann einige Tage bei +4°C gelagert werden)
- In Zentrifugenröhrchen überführen und mit MSB-Ca²⁺-EDTA austarieren; 5min. bei +4°C und 700g zentrifugieren (die Zentrifugationsgeschwindigkeit sollte für jeden Organismus zwischen 500g und 2000g optimiert werden)
- Den Überstand in frische Röhrchen überführen, austarieren und wie oben zentrifugieren; das Pellet kann zur Isolierung von Kern-DNA verwendet werden
- Den Überstand in frische Röhrchen überführen, austarieren und 15min. bei +4°C und 10000g zentrifugieren
- Das Pellet in 0.25M Saccharose-TE resuspendieren und 15min. bei +4°C und 10000g zentrifugieren, der Überstand wird verworfen

Lyse der Mitochondrien

- Die Pellets in insgesamt 4ml TNE resuspendieren und 5min. bei Raumtemperatur (RT) inkubieren
- 800: I einer 20%igen SDS-Lösung zugeben, 2min. bei RT inkubieren, anschließend 800: I TNE zugeben

Reinigung der mtDNA am CsCl/EtBr-Gradienten

- 5.2ml des Lysats zu exakt 5.400g CsCl zugeben und durch mehrmaliges Schwenken das CsCl vollständig lösen, 15min. bei +4°C inkubieren
- 20min. bei 6000rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren, dadurch flotiert der Protein-SDS-Komplex an der Oberfläche und kann mit einer Spatel entfernt werden (die Probe kann nach der Zentrifugation mehrere Wochen aufbewahrt werden)
- 200: I EtBr (10mg/ml) in ein Ultrazentrifugenröhrchen füllen, die Probe zugeben und das Röhrchen falls nötig mit 1g/ml CsCl/TNE vollständig auffüllen
- Jeweils 2 Röhrchen exakt (auf max. ±10mg) austarieren, verschrauben und durch Zusammendrücken auf Dichtheit prüfen
- Im Vakuum bei +20°C und 80 000rpm 15h zentrifugieren
- Am UV-Schirm die Bande(n) markieren und mit einer Pasteurpipette absaugen
- Das EtBr mit 1xVolumen Isoamylalkohol gründlich ausschütteln und 2min. bei ca. 4000rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren
- Die obere Phase absaugen, als Sondermüll verwerfen und den Vorgang wiederholen, bis die obere Phase völlig klar bleibt
- 3xVolumen 70% EtOH zugeben und bei +4°C mind. 1h inkubieren ! DNA-Fällung
- bei RT und 14000rpm 20min. in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugieren
- Überstand abheben und verwerfen; das Pellet trocknen und in 50-100: I TE lösen
- 2-3: I DNA-Lösung sollten nach einer Behandlung mit Restriktionsendonukleasen auf einem Agarosegel deutlich sichtbare Banden zeigen

MATERIALIEN

MSB-Ca²⁺ 38.30g/l Mannit
 24.00g/l Saccharose
 6.05g/l Tris-Base
 3mM CaCl₂
 pH 7.5 (1N HCl)
 bei +4°C lagern

DIS-EDTA 200mM EDTA
 pH 7.5
 bei +4°C lagern

0.25M Saccharose+TE 250mM Saccharose
 50mM Tris-Base
 10mM EDTA
 pH 8.0
 bei +4°C lagern

TNE 10mM Tris-Base
 100mM NaCl
 1mM EDTA
 pH 8.0

TE 10mM Tris-Base
 1mM EDTA
 pH 8.0

Ethidiumbromid (EtBr) 10mg/ml A.dest.
20% SDS (w/v)
Caesiumchlorid (CsCl)
Ethanol (EtOH) 70%
Isoamylalkohol

2.2. MtDNA-SPALTUNG MIT RESTRIKTIONSENZYMEN

(Fuchs & Blakesley, 1983; Knippers, 1985; Stryer, 1988; Watson et al., 1987)

Enzyme, die die Phosphodiester-Bindungen der Polynukleotidkette der DNA spalten, werden als Nukleasen bezeichnet. *Endonukleasen* sind jene Enzyme, die im Gegensatz zu den *Exonukleasen* keine terminalen Nukleotide abbauen, sondern nur Doppelstrangbrüche durchführen.

Lange Zeit wurde angenommen, daß Endonukleasen relativ unspezifisch Bindungen zwischen Nukleotiden lösen, bis sich herausstellte, daß diese Enzyme spezifische kurze Sequenzen in doppelsträngiger (ds) DNA erkennen, an diese binden und die DNA entweder direkt an dieser Stelle oder in deren unmittelbarer Nähe spalten.

Restriktionsendonukleasen oder -enzyme wurden im Zusammenhang mit der Fähigkeit von Prokaryoten entdeckt, sogenannte Fremd-DNA abzubauen, um so das eigene Genom vor Rekombination mit unerwünschter DNA zu schützen (Restriktion). Ein Restriktionsenzym kann somit zwischen eigener (nativer) geschützter und fremder nicht modifizierter DNA unterscheiden. Sie stellen daher eine Art "Immunsystem" der Prokaryoten dar. Das eigene Genom wird durch Methylierung von bestimmten Nukleotiden der Erkennungssequenz vor den Restriktionsenzymen geschützt (Modifikation).

Derzeit wurden aus ca. 300 Prokaryoten mehr als 400 verschiedene Restriktionsendonukleasen isoliert. In den meisten prokaryotischen Zellen können diese Enzyme gefunden werden, in eukaryotischen Zellen hingegen sind sie nicht vorhanden. Die meisten Enzyme erkennen Gruppen von vier bis sechs Nukleotiden (manche auch acht oder mehr), die überwiegend als Palindrome vorhanden sind. Die Schnittstelle selbst liegt häufig innerhalb der Erkennungssequenz, seltener entstehen nach einer Spaltung sogenannte glatte Enden ("blunt ends").

Man unterscheidet vor allem 2 Klassen von Restriktionsendonukleasen:

Typ I:

Endonukleasen dieses Typs benötigen für ihre Aktivität ATP und S-Adenosylmethionin.

Typ II:

Enzyme dieser Klasse sind von den oben genannten Verbindungen unabhängig, dafür aber sehr sequenzspezifisch.

In der vorliegenden Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen verwendet, die palindrome Erkennungssequenzen bestehend aus 6 Nukleotiden benötigen (6-Basenschneider) und zum Typ II zu zählen sind.

DURCHFÜHRUNG

Restriktionsansatz in 10-20: 1 Volumen

- 0.5-2: g DNA (für mtDNA-RFLPs)
- 1/10 Volumen 10x Restriktionspuffer
- 10 Units Enzym je : g DNA
- mit A.dest. auf das Endvolumen auffüllen

Die Enzymmenge richtet sich nach der DNA-Konzentration, wobei 1 Unit (U) jene Menge Enzym umfaßt, die benötigt wird, um 1: g DNA unter optimalen Bedingungen (Ionenkonzentration, Temperatur) in einer Stunde vollständig zu schneiden (verdauen).

Für die meisten Enzyme liegt das Temperaturoptimum bei +37°C.

Die Ionenkonzentration richtet sich nach dem Enzym und wird vom Hersteller angegeben. Die Enzyme werden im Überschuß zugegeben (10 U je 1: g DNA) und der Restriktionsansatz zwei Stunden inkubiert. Bei übereinstimmenden Ionenkonzentrationen und Temperaturen kann auch mit mehreren Enzymen gleichzeitig geschnitten werden. Es ist jedoch wichtig zu beachten, daß das Volumen der zugeführten Enzyme 1/10 des Gesamtvolumens nicht übersteigt, da das im Lagerpuffer enthaltene Glycerin bei zu hoher Konzentration die Reaktion inhibiert.

MATERIALIEN

Restriktionsenzyme

Erkennungssequenzen der Enzyme (5'Y 3')

<i>Apal</i>	GGGCC/C	<i>Asnl</i>	AT/TAAT
<i>BamHI</i>	G/GATCC	<i>BclI</i>	T/GATCA
<i>BglII</i>	A/GATCT	<i>Clal</i>	AT/CGAT
<i>DraI</i>	TTT/AAA	<i>EcoRI</i>	G/AATTC
<i>EcoRV</i>	GAT/ATC	<i>HindIII</i>	A/AGCTT
<i>PstI</i>	CTGCA/G	<i>PvuII</i>	CAG/CTG
<i>SacI</i>	GAGCT/C	<i>Scal</i>	AGT/ACT
<i>SfuI</i>	TT/CGAA	<i>StuI</i>	AGG/CCT
<i>StyI</i>	C/C(A,T)(T,A)GG	<i>XbaI</i>	T/CTAGA

/: entspricht der Spaltungsstelle

10x Restriktionspuffer

Dieser wird vom Hersteller den Enzymen beigegeben.

Herstellung eines eigenen 10x Puffers:

- 10mM Tris/HCl pH 7.5
- 10mM Magnesiumchlorid
- 10: g/ml Bovinserumalbumin
- Natriumchloridkonzentration je nach Enzym:
 - 0mM
 - 50mM, L low salt
 - 100mM, M medium salt
 - 150mM, H high salt

2.3. MtDNA-FRAGMENTTRENNUNG MITTELS AGAROSEGELELEKTROPHORESE

(Aaij & Borst, 1971; Rickwood & Hames, 1982; Sambrook et al., 1989)

Die in einem Elektrodenpuffer (pH 7.8) negativ geladenen Nukleinsäuren bewegen sich in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode.

Da deren Wanderungsgeschwindigkeit und -weite von

- der Molekülgröße,
- der Konformation der DNA,
- der Spannung des elektrischen Feldes
- und dem Vernetzungsgrad des Mediums

abhängig ist, werden Fragmente verschiedener Größe je nach Trennleistung des Gels aufgetrennt.

Trennvermögen von Agarosegelen (ME-Agarose)

Agarose % (w/v)	effektive Auftrennung von Fragmenten in kb		
0.5	1.0	bis	30
0.7	0.8	bis	12
1.0	0.5	bis	10
1.2	0.4	bis	7.0
1.5	0.2	bis	3.0

Für die Trennung jener Fragmente, die nach einem Verdau des gesamten mt-Genoms mit 6-Basenschneidern erhalten wurden, ist eine Agarosekonzentration von 0.7% (w/v) gewählt worden, die eine Auftrennung im Bereich von 0.8 bis 12kb ermöglicht.

Durch die Einlagerung von Ethidiumbromid (EtBr) in die DNA-Doppelhelix können die erhaltenen Fragmente bei Betrachtung unter UV-Licht als rot-orangefärbige Banden sichtbar gemacht werden, da EtBr bei 590nm des sichtbaren Lichts das absorbierte UV-Licht (302nm) emittiert.

DURCHFÜHRUNG

Agarosegelelektrophorese

- Agarose einwiegen (w/v), Elektrodenpuffer zugeben und kurz aufkochen (auf einem beheizbaren Magnetrührer oder in einer Mikrowelle)
- Auf etwa +60°C abkühlen lassen und zu je 100ml Agarosegel 5 : 1 EtBr zugeben, gründlich mischen
- Bei etwa +55°C in den Gelschlitten gießen und erstarren lassen
- Den Kamm aus dem Gel ziehen, Gelschlitten aus der Gießform nehmen, in die Elektro-phoreseapparatur legen und mit dem für das Gel gewählten Elektroden (=Lauf-)puffer knapp überschichten
- DNA-Restriktionsansatz mit 3 : 1 Auftragspuffer mischen und vorsichtig in die Gel-taschen einbringen, 3 : 1 Kontroll-DNA (z.B. Lambda mit *Hind*III geschnitten und im Auftragspuffer gelöst) ebenfalls in eine Geltasche einbringen
- Bei 30V bis 80V vom negativen zum positiven Pol im elektrischen Feld wandern lassen
- Ist der dem Auftragspuffer beigemengte Frontmarker (hier Bromphenolblau) ent-sprechend weit gewandert, das Netzgerät abschalten, den Gelschlitten aus der Apparatur nehmen und am UV-Schirm (Brille verwenden !) betrachten; anschließend die Fragmentlängen bestimmen sowie photographieren (Polaroid 667, schwarz/weiß)

MATERIALIEN

ME-Agarose

Elektrodenpuffer 10xTBE Stammlösung
 108g Tris-Base
 55g Borsäure
 9.3g EDTA
 mit A.dest. auf 1000ml auffüllen, pH ca. 8.0
Arbeitslösung (0.5xTBE): Stocklösung mit A.dest. 1:20 verdünnen

Lambda-*Hind*III Kontroll-DNA

Ethidiumbromid (EtBr) 10mg/ml A.dest.

Auftragspuffer 0.25% Bromphenolblau
 40% Saccharose
 10mM Tris/HCl pH 8.0
 1mM EDTA
Arbeitslösung: Stocklösung mit 0.5xTBE 1:3 verdünnen

Der Größenstandard Lambda-*Hind*III

Für die Bestimmung von Fragmentlängen und Konzentrationen der einzelnen Banden, die durch Verdau der mtDNA mit 6-Basenschneidern entstanden sind, wurde hier der Lambda-*Hind*III-Größenstandard verwendet und die Längen der DNA-Fragmente im Vergleich zu diesem Marker errechnet. Der Verdau des Genoms des Bakteriophagen Lambda mit der Restriktionsendonuklease *Hind*III ergibt folgende Fragmente:

Banden	Basenpaare	Menge in ng
1	23 130	250
2	9 416	100
3	6 557	70
4	4 361	50
5	2 322	24
6	2 027	21
7	564	5
8	125	1.25
Gesamtmenge		500ng

MATERIALIEN

Lambda-*Hind*III-Marker für 1ml mit Endkonzentration 100ng/: I
- 200: I Lambda-*Hind*III verdaute DNA (500: g/ml)
- 166: I Auftragspuffer
- 634: I 0.5xTBE

2.4. BERECHNUNG DER FRAGMENTLÄNGEN

Die Wanderungsweite der DNA-Fragmente in der Gelmatrix steht im umgekehrt proportionalem Verhältnis zu \log_{10} der Basenpaaranzahl (Sambrook et al., 1989). Läßt man auf demselben Gel gleichzeitig DNA-Fragmente bekannter bp-Länge (z.B. Lambda-*Hind*III-Marker) mitwandern, so kann aus den unterschiedlichen Wanderungsweiten der Fragmente mittels logarithmischer Interpolation ihre Länge bestimmt werden. Die Berechnung erfolgte, nachdem alle Wanderungsweiten nach zwei Stunden Elektrophorese (0.7% Agarose) bei 80V am UV-Schirm im Gel gemessen wurden, mittels eines hauseigenen EDV-Programmes (Rudolf Willing) über einen kubischen Spline.

Um eine höhere Meßgenauigkeit der Fragmente mit Längen über 4kb zu erreichen, wurden die DNA-Fragmente in den Gelen jeweils weitere zwei Stunden bei 80V elektrophoretisch aufgetrennt und die Messungen wiederholt.

3. RFLP-ANALYSE DES CYTOCHROM b-GENS

3.1. AMPLIFIZIERUNG DES CYTOCHROM b-GENS MIT PCR

(Irwin et al., 1991; Kocher et al., 1989; Saiki et al., 1988)

Auf dem schweren Strang des mitochondrialen Genoms ist zwischen dem D-Loop und der 5. Untereinheit der NADH-Dehydrogenase (ist Bestandteil der Atmungskette) das Cytochrom b codiert.

In dieser Arbeit wird das Cytochrom b als zweites Markersystem für die systematische Unterscheidung zwischen *R. rupicapra* und *R. pyrenaica* verwendet. Mittels der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) und spezifischer Primer wird das Cytochrom b-Gen des mitochondrialen Genoms amplifiziert und anschließend eine RFLP-Analyse mit 4- und 5-Basenschneidern durchgeführt.

DIE KOMPONENTEN DER PCR

Es ist zu beachten, daß eine ausgewogene Balance zwischen allen Reagentien des Reaktionsansatzes für ein positives Ergebnis einer PCR unerlässlich ist.

Die Konzentrationen für die in diesem System verwendeten Komponenten muß für jeden Organismus optimiert werden.

Gleiches gilt auch für die Temperaturen der einzelnen Schritte der Polymerase-Kettenreaktion.

PRIMER (Irwin et al., 1991)

L14724 5' - CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G - 3'

H15915 5' - AAC TGC AGT CAT CTC CGG TTT ACA AGA C - 3'

Die optimale Konzentration der Primer liegt bei je 0.5-1.0: M pro Reaktionsansatz. Bei zu hoher Primerkonzentration können sowohl Primerdimere als auch unspezifische Produkte entstehen.

NUKLEOTIDE

Die Konzentration der Nukleotide (dNTPs) sollte in einem Bereich von 20-200: M pro Nukleotid und Reaktionsansatz liegen. Als Faustregel gilt, daß 20: M für 2.6: g und 200: M für ca. 25: g DNA ausreichen. Ist die Konzentration zu hoch, so können unspezifische Produkte entstehen; ist sie hingegen zu gering, werden vermutlich auch dementsprechend weniger, aber vorwiegend einzelsträngige PCR-Produkte entstehen können, obwohl bei eher niedrigen dNTP-Konzentrationen die Fehlbindungsrate der Primer reduziert ist.

MAGNESIUMKONZENTRATION

Von der DNA-Polymerase werden zweiwertige Kationen benötigt, sodaß meist die Zugabe von MgSO_4 zusätzlich zum 10xPolymerasepuffer notwendig ist. Die Endkonzentration soll mindestens 0.5-1mM höher sein als die gesamte dNTP-Konzentration. Eine Verringerung der Mg^{2+} -Konzentration erhöht bei gleichbleibender Temperatur die Stringenz der Primerbindung an die DNA, wohingegen bei einer zu hohen Mg^{2+} -Konzentration die Fehlerrate der Polymerase zunehmen kann. In diesem Fall hat sich eine MgSO_4 -Konzentration von 2mM als ausreichend erwiesen, sollen aber größere PCR-Produkte entstehen, so muß die Mg^{2+} -Konzentration dementsprechend erhöht werden. Weiters empfiehlt es sich, DNA nach der Isolation nur in destilliertem Wasser zu lösen, da das im TE-Puffer enthaltene EDTA unter Umständen Mg^{2+} -Ionen des PCR-Reaktionsansatzes komplexieren könnte.

DNA-POLYMERASE

Bezüglich der Polymerase hat sich die Verwendung der Vent (exo⁻) DNA-Polymerase (ohne Exonukleaseaktivität) des thermophilen Archaeobakteriums *Thermococcus litoralis* als sehr zufriedenstellend erwiesen. Das Gen für die Polymerase wurde gentechnisch verändert, um die 3' ! 5' Proofreading-Exonuklease zu eliminieren, und anschließend in *Escherichia coli* kloniert und expremiert, daher handelt es sich um eine rekombinante DNA Polymerase. Diese Polymerase ist sehr vielseitig verwendbar, da für ihre Aktivität bereits Nanogramm an DNA ausreichen. Pro Reaktionsansatz werden 4 Units Polymerase eingesetzt, wobei 1 Unit (U) jene Menge Enzym darstellt, die 10nM dNTPs (200: M pro NTP) bei +75°C in 30min. umsetzt.

KONZENTRATION DER DNA

Die vorliegende DNA-Menge ist ausschlaggebend für die Anzahl der Zyklen der PCR, wobei für jene DNA-Menge, die nach einer Präparation von mtDNA gewonnen wurde, 30-35 Zyklen ausreichen, um genügend amplifizierte Cytochrom b-DNA zu erhalten. Leider mußte festgestellt werden, daß zirkuläre DNA schlechter amplifiziert wird als lineare. Von der mtDNA, die nach der Präparation in 50:1 TE-Puffer aufgenommen worden war, reichten 2-3:1 für einen Reaktionsansatz aus. Die Menge der mtDNA, die präpariert wurde, könnte auch vor der Verwendung für die PCR auf einem Agarosegel abgeschätzt werden.

DNA-BINDUNG ("Annealing") DER PRIMER

Sehr maßgeblich für gute Ergebnisse ist eine auf die Primer abgestimmte Annealing-Temperatur (T_A), die von +45° bis 72°C variieren kann. Um unspezifische Produkte zu vermeiden, ist die Temperatur solange zu erhöhen, bis die für das gesamte System höchstmögliche gefunden wurde. Für die Berechnung der Annealing-Temperatur sind folgende Schmelztemperaturen (T_m) der Nukleotide zu beachten: $T_m(\text{A/T}) = 2^\circ\text{C}$ und $T_m(\text{G/C}) = 4^\circ\text{C}$. Die Annealing-Temperatur der verwendeten Primer ergibt sich aus folgendem Zusammenhang:

$$T_A = T_m - 5^\circ\text{C}$$

DNA-SYNTHESE ("Primer-Extension")

Bei der Primer-Extension ist in erster Linie die Zeitdauer von Bedeutung, da jede Polymerase unterschiedliche Syntheszeiten aufweist. Auch hängt die Dauer von der Größe des

PCR-Produktes ab. Für die hier verwendete Polymerase und das 1.2kb große Cytochrom b-Fragment ist eine Primer-Extension von 1min. ausreichend. Im allgemeinen gilt für die Dauer und die Temperatur, daß 1min. bei +72° bis 75°C für ein Fragment mit der Größe von 1kb ausreicht. Diese Angaben gelten für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 0.05 bis 15kb.

DURCHFÜHRUNG

Reaktionsansatz in 100: l Volumen

- 1/10 Volumen 10x Puffer
- 1/10 Volumen 10x dNTP-Mix
- 2mM MgSO₄
- 1/100 Volumen 100x Primer-Mix
- 2: l mtDNA
- 4 Units DNA-Polymerase
- Rest mit A.dest. auffüllen

PCR-Programm am Thermo Cyclor (Techne PHC-3)

1. Teil (1 Zyklus)

- Denaturierung der DNA: 5min. bei +95°C
- Zugabe der DNA-Polymerase: 2min. bei +93°C

2. Teil (35 Zyklen)

- Denaturierung: 1min. bei +93°C
- Primer-Annealing: 1min. bei +49°C
- Primer-Extension: 1min. bei +72°C

3. Teil (1 Zyklus)

- Primer-Extension: 5min. bei +72°C
- Abkühlung der Proben auf die Lagertemperatur von +4°C

MATERIALIEN

DNA-Polymerase	Vent (exo ⁻) DNA-Polymerase
10x Polymerasepuffer	Dieser wird vom Hersteller den Enzymen beigegeben. 1x Puffer: 10mM KCl 10mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 20mM Tris/HCl 2mM MgSO ₄ 0.1% Triton X-100 pH 8.8
10x dNTP-Mix	bestehend aus 2mM je dATP, dCTP, dGTP und TTP
100x Primer-Mix	bestehend aus 0.1mM je Primer
100mM MgSO ₄	

3.2. SPALTUNG DES CYTOCHROM b MIT RESTRIKTIONSENZYMEN

Die mit PCR vervielfältigte mtDNA des Cytochrom b wird mit Restriktionsendonukleasen behandelt, die vier und fünf Basen als Erkennungssequenz (4- und 5-Basenschneider) beinhalten und zum Typ II zählen (siehe auch II.2.2.).

DURCHFÜHRUNG

Restriktionsansatz in 10-20: 1 Volumen

- 0.5 bis 2: g DNA (für mtDNA-RFLPs)
- 1/10 Volumen 10x Restriktionspuffer
- 10 Units Enzym je : g DNA
- mit A.dest. auf das Endvolumen auffüllen

Die Enzymmenge richtet sich nach der DNA-Konzentration, wobei 1 Unit (U) jene Menge Enzym umfaßt, die benötigt wird, um 1: g DNA unter optimalen Bedingungen (Ionenkonzentration, Temperatur) in einer Stunde vollständig zu schneiden.

Für die meisten Enzyme liegt das Temperaturoptimum bei +37°C.

Die Ionenkonzentration richtet sich nach dem Enzym und wird vom Hersteller angegeben. Die Enzyme werden im Überschuß zugegeben (10 U je 1: g DNA) und der Restriktionsansatz zwei Stunden inkubiert.

MATERIALIEN

Restriktionsenzyme Erkennungssequenzen der Enzyme (5' ÷ 3')

<i>AluI</i>	AG/CT
<i>Avall</i>	G/G(A,T)CC
<i>CfoI</i>	GCG/C
<i>DdeI</i>	C/TnAG
<i>HaeIII</i>	GG/CC
<i>HinfI</i>	G/AnTC
<i>MspI</i>	C/CGG
<i>MvaI</i>	CC/(A,T)GG
<i>NciI</i>	CC/(G,C)GG
<i>RsaI</i>	GT/AC
<i>TaqI</i>	T/CGA

/: entspricht der Spaltungsstelle

10xRestriktionspuffer Dieser wird vom Hersteller den Enzymen beigegeben.
Herstellung eines eigenen 10x Puffers:
- 10mM Tris/HCl pH 7.5
- 10mM Magnesiumchlorid
- 10: g/ml Bovinserumalbumin
- Natriumchloridkonzentration je nach Enzym:
 0mM
 50mM, L low salt
 100mM, M medium salt
 150mM, H high salt

3.3. CYTOCHROM b-FRAGMENTTRENnung MITTELS AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Da die Auftrennung der mit Restriktionsenzymen gespaltenen DNA des Cytochrom b-Gens wie in Abschnitt II.2.3. erfolgte, wird an dieser Stelle auf die Durchführung der Agarosegelelektrophorese nicht näher eingegangen. Es sei nur erwähnt, daß im Gegensatz zu II.2.3. hier Agarosegele mit einer Konzentration von 1.3 bis 1.5% (w/v) Agarose verwendet wurden.

Die Größenstandards pBR322-*Bst*NI und 100bp DNA-Leiter

Für die Bestimmung von Fragmentlängen der einzelnen Banden, die durch Verdau der Cytochrom b-DNA mit 4- und 5-Basenschneidern entstanden sind, wurden hier der pBR322-*Bst*NI- und 100bp DNA-Leiter-Größenstandard verwendet.

Der Verdau des Plasmids pBR322 mit der Restriktionsendonuklease *Bst*NI ergibt folgende Fragmente:

Banden	Basenpaare
1	1857
2	1058
3	929
4	383
5	121
6	13

Die 100bp DNA-Leiter besteht aus folgenden Fragmenten:

Banden von 100 bis 1500bp im Abstand von 100bp und eine zusätzliche Bande bei 2072bp.

MATERIALIEN

pBR322-*Bst*NI-Marker für 200: l mit Endkonzentration 250ng/: l
- 50: l des Markers (1: g/: l)
- 150: l verdünnter Auftragspuffer

100bp DNA-Leiter für 200: l mit Endkonzentration 250ng/: l
- 50: l des Markers (1: g/: l)
- 150: l verdünnter Auftragspuffer

3.4. BERECHNUNG DER FRAGMENTLÄNGEN

Die Berechnung der Längen der erhaltenen Fragmente wurde wie in Abschnitt II.2.4. durchgeführt, sodaß darauf hier nicht näher eingegangen wird.

4. ENZYMELEKTROPHORESE

4.1. UNTERSUCHTE ENZYME

Mittels horizontaler Stäkegelelektrophorese werden die Enzyme und deren Varianten aufgetrennt (Harris, 1980; Harris & Hopkinson, 1976) und anschließend in situ mit enzym-spezifischen histochemischen Färbemethoden detektiert (Zymogramm-Methode nach Hunter & Markert, 1957). In der vorliegenden Arbeit wurden 25 verschiedene Isoenzyme auf eventuell vorhandene Polymorphismen untersucht. Diese Isoenzyme sind in Tabelle II.7. zusammen mit den dafür notwendigen Puffersystemen sowie den spezifischen Färbemethoden aufgelistet.

4.2. ISOLIERUNG DER ENZYME AUS ORGANPROBEN

Die Enzyme werden durch Homogenisieren von tiefgefrorenen Organproben (Leber oder Niere) auf Eis, anschließendes Tieffrieren und gekühlte Zentrifugation von den übrigen Zellbestandteilen abgetrennt. Der Überstand nach der Zentrifugation kann sofort zum Beladen der Gele verwendet oder für den späteren Gebrauch tiefgefroren werden.

DURCHFÜHRUNG

- 1cm³ Leber oder Niere in 1xVolumen Homogenisierpuffer aufnehmen
- In einem in Eis gepackten Probenröhrchen werden die Organe mittels Ultra-Turrax homogenisiert
- Proben bei -20°C tieffrieren (dient zum Zerreißen der Zellwände)
- 5min. bei RT auftauen lassen
- 20min. bei +4°C und 6000rpm zentrifugieren
- Den Überstand auf mehrere Probenröhrchen aufteilen und zum Beladen der Gele verwenden

MATERIALIEN

Homogenisierpuffer	0.01M Phosphatpuffer pH 7.4 0.1mM MgCl ₂ auf +4°C lagern
1M Phosphatpuffer Stammlösung 1 Stammlösung 2	Lösung 1 mit Lösung 2 auf pH 7.4 einstellen 87.0g K ₂ HPO ₄ in 500ml A.dest. 27.6g NaH ₂ PO ₄ in 200ml A.dest.

EC-Nummer	Enzymbezeichnung	Abkürzung	Puffer	Färbung
3.5.4.4	Adenosindeaminase	ADA	TC	1
2.7.4.3	Adenylatkinase	AK	TC	2
3.5.1.14	Aminoacylase-1	ACY-1	TC	7
2.6.1.1	Aspartataminotransferase	AAT (GOT)	TC	3
3.1.1.1	Esterasen	ES	P	4
4.2.1.2	Fumarathydratase	FH (FUM)	TC	2
1.1.1.47	Glucosedehydrogenase	GDH	TC	1
1.1.1.49	Glucose-6-phosphatdehydrogenase	GPD (G-6-PD)	TC	3
5.3.1.9	Glucosephosphatisomerase	GPI (PGI, PHI)	P	3
1.4.1.3	Glutamatdehydrogenase	GLUD	TC	5
1.1.1.8	" -Glycerophosphatdehydrogenase	GDC (GPDH)	TC	4
2.7.1.1	Hexokinase	HK	TC	1
1.1.1.42	Isocitratdehydrogenase	IDH	TC	3
1.11.1.6	Katalase	CAT (CE)	TC	8
2.7.3.2	Kreatinkinase	CK	TC	4
1.1.1.27	Laktatdehydrogenase	LDH	P	3
1.1.1.37	Malatdehydrogenase	MDH (MOR)	TC	3
1.1.1.40	Malatenzym	ME (MOD)	TC	2
5.3.1.8	Mannosephosphatisomerase	MPI	P	2
3.4.11	Peptidasen	PEP	P	2
2.7.5.1	Phosphoglucomutase	PGM	P	6
1.1.1.44	6-Phosphogluconatdehydrogenase	PGD (6-PGD)	P	3
3.1.3.2	Saure Phosphatase	ACP	TC	4
1.1.1.14	Sorbitoldehydrogenase	SDH (SORDH)	TC	4
1.15.1.1	Superoxiddismutase	SOD	P	3

Tabelle II.7.: Untersuchte Alloenzymssysteme; Referenzen der Färbungen: 1) Harris & Hopkinson (1976), 2) Siciliano & Shaw (1976), 3) Selander et al. (1971), 4) Shaw & Prasad (1979), 5) Brewer & Sing (1970), 6) Manlove et al. (1975), 7) Qavi & Kit (1980), 8) Thorup et al. (1961), Puffersysteme: TC Tris-Citrat-System; P Phosphat-System

4.3. HORIZONTALE STÄRKEGELELEKTROPHORESE

Für die Auftrennung von Enzymen und deren Varianten können verschiedene Techniken der Elektrophorese verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die horizontale Stärkegelelektrophorese herangezogen. Die Trennung der Enzyme beziehungsweise deren Wanderungsweiten im Stärkegel sind abhängig von Nettoladung und Molekülgröße. Die hier untersuchten Proteine sind sogenannte Ampholyte und tragen je nach pH-Wert der verwendeten Puffer entweder eine positive oder eine negative Nettoladung. Diese Nettoladung bei einem bestimmten pH-Wert ist abhängig von der Ionisation der freien Aminogruppen der Aminosäuren Lysin und Arginin sowie der Ionisation der freien Carboxylgruppen von Asparagin und Glutamin. In einem elektrischen Feld wandern negativ geladene Moleküle (Anionen) zur positiv geladenen Anode, sowie positiv geladene Moleküle (Kationen) zur negativ geladenen Kathode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist direkt proportional zur Größe der Nettoladung des Enzyms und der Stromstärke des elektrischen Feldes. Die beteiligten Komponenten wie Pufferzusammensetzung, pH-Wert, Spannung und Stromstärke müssen für jedes untersuchte System empirisch optimiert werden (Harris & Hopkinson, 1976).

Für die Auftrennung von Enzymvarianten wurde die Anzahl der verwendeten Puffersysteme deutlich reduziert (Ayala, 1982; Siciliano & Shaw, 1976; Siciliano et al., 1984). In der vorliegenden Arbeit kamen zwei verschiedene kontinuierliche Puffersysteme zur Anwendung (Csaikl et al., 1980; Hartl & Höger, 1986; Manlove et al., 1975).

DURCHFÜHRUNG

Gießen der Gele

- 31g hydrolysierte Kartoffelstärke einwiegen, 250ml Gelpuffer zugeben, ca. 30min kochen (beheizbarer Magnetrührer) und mit der Wasserstrahlpumpe entgasen
- Gel in eine 15x22cm große Form gießen (Glasplatte mit Plexiglasleisten), mit einer Plastikfolie und einer Glasplatte abdecken
- Auf RT erstarren lassen
- Vor dem Beladen 45min. bei +4°C kühlen

Beladen der Gele

- ca. 7cm oberhalb der kathodischen Gelkante Schlitze von 5mm Breite und 0.5mm Stärke im Abstand von ca. 2mm ins Gel stechen
- 0.5cm² große Filterpapierstückchen werden mit dem Überstand der Zentrifugation getränkt und in die Gelslitze gesteckt

Elektrophorese

Tris-Citrat-System Spannung: 130V
 Stromstärke: 95m
 Laufzeit: 5h 30min.

Phosphat-System Spannung: 200V
 Stromstärke: 95mA
 Laufzeit: 6h

- Nach Beladen der Gele werden diese mit der Startlinie näher der Kathode auf die gekühlten (+4°C) Platten der Elektrophoresekammern gelegt
- Durch Filterpapierstreifen wird die Verbindung mit dem Wannepuffer hergestellt
- Nach ca. 20min. Laufzeit werden die Filterpapierstückchen aus den Schlitzen entfernt und das Gel mit einer Plastikfolie abgedeckt (Schutz vor Austrocknung)
- Nach Beendigung der Laufzeit werden die Gele mit einer Nylonschnur horizontal gedrittelt
- In diesen Gelscheiben werden nun die Enzyme in situ mittels verschiedener histochemischer Färbemethoden detektiert

MATERIALIEN

Tris-Citrat-System

Wannepuffer 166g Tris-Base
 66.0g Zitronensäure
 in 2l A.dest. lösen
 pH 8.0 (1M Zitronensäure)

Gelpuffer Wannepuffer 1:29 mit A.dest. verdünnt

Gel 12.4% (w/v) 31g Stärke in 250ml Gelpuffer

Phosphat-System

Wannepuffer 0.1M Phosphatpuffer

Gelpuffer 1M Phosphatpuffer 1:165 mit A.dest. verdünnt

Gel 12.4% (w/v) 31g Stärke in 250ml Gelpuffer

4.4. HERKUNFT UND ANZAHL DER UNTERSUCHTEN TIERE

Alle untersuchten Tiere wurden im Rahmen der regulären regionalen Bejagung erlegt. Die Tiere waren adult, ohne besondere Auffälligkeiten, und beiderlei Geschlechts.

Die Organproben, bestehend aus Leber oder Niere, wurden unmittelbar nach dem Abschluß entnommen, so rasch wie möglich tiefgefroren und bis zur Untersuchung bei &20°C gelagert.

Slowenien	
Gebiet	Nummer
Triglav	11-28, 31, 33, 35, 36, 41, 42, 43, 48-59, 65-80, 82, 83, 86-90, 101, 103, 104
Kamnik	29, 30, 32, 34, 37, 38, 39, 40, 44, 45, 46, 47, 81, 102, 105, 106
Maribor	60-64, 84, 85, 91-99

Tabelle II.8.: Herkunft und Nummern der Tiere aus Slowenien

5. PHYLOGENETISCHE INTERPRETATION

Phänetische Methoden beruhen auf der Abschätzung des Ähnlichkeitsgrades zwischen Vertretern zweier Populationen, Taxa oder mtDNA-Linien (OTUs - Operational Taxonomic Units), der ohne Gewichtung über alle untersuchten Merkmale (hier handelt es sich um Restriktionsschnittstellen) berechnet wird. Im Falle von mehreren OTUs können die jeweils paarweise ermittelten Ähnlichkeiten in Form eines Dendrogramms übersichtlich dargestellt werden. Ein solches Dendrogramm kann jedoch nur dann als Stammbaum gelten, wenn die Evolutionsgeschwindigkeiten bei allen erfaßten OTUs weitgehend gleich sind. Dies gilt insbesondere für "gewurzelte" Bäume (z.B. UPGMA - unweighted pair-group method using an arithmetic average), während "ungewurzelte" Bäume (z.B. Fitch-Margoliash Dendrogramm) gegenüber variablen Evolutionsraten weniger empfindlich sind.

Beim Maximum-Parsimony-Verfahren wird mittels eines Algorithmus nach einem (ungewurzelten) Baum gesucht, der die geringste Zahl von Merkmalsänderungen (wie hier das Auftreten oder den Verlust von Restriktionsschnittstellen) beinhaltet.

Je nach Datenlage können mehrere, topologisch unterschiedliche Bäume auf der gleichen Zahl von Merkmalstransformationen beruhen. In diesem Fall werden mittels eines "Consensus"-Verfahrens die stabilsten Verzweigungen ermittelt.

5.1. GENETISCHE DIVERGENZ

5.1.1. Codierung der Schnittstellen

Manche Restriktionsenzyme erzeugten bei verschiedenen untersuchten Gemen unterschiedliche Fragmentmuster, die darauf zurückzuführen sind, daß Schnittstellen auf dem mitochondrialen Genom verloren gegangen oder hinzugekommen sind. Basierend auf diesen Unterschieden konnten mtDNA-Haplotypen definiert werden, die sich in der Anzahl der Schnittstellen der Restriktionsenzyme voneinander unterschieden. Jene untersuchten Gemen, die bei allen verwendeten Restriktionsenzymen das gleiche Fragmentmuster aufwiesen, wurden einem mtDNA-Haplotyp zugeordnet. Für die Berechnung der Genetischen Distanzen (D, Nei & Li, 1979) zwischen den mtDNA-Haplotypen mußten diese Ergebnisse EDV-gerecht codiert werden, um sie einem Computerprogramm zugänglich zu machen. Die Codierung erfolgte in einem binären System, wobei vorhandene Schnittstellen mit "1" und ausgefallene Schnittstellen mit "0" belegt wurden (siehe III.1.4. und 2.4.).

Ein Beispiel für eine Binäre Schnittstellencodierung auf der Grundlage der drei unterschiedlichen Fragmentmuster des Restriktionsenzym *Xba*I, die bei den untersuchten Gemen (*Rupicapra*) gefunden wurden, ist in Tabelle II.8. dargestellt.

***Xba*I**

Fragmentlängen (kb)	Binäre Schnittstellencodierung
Typ A: 6.6, 1.6, 2.8, 0.9, <u>3.1</u> , <u>1.0</u>	1 1 1 1 1 1
Typ B: 6.6, 1.6, 2.8, 0.9, <u>4.1</u>	1 1 1 1 1 0
Typ C: 8.5, 2.8, 0.9, <u>3.1</u> , <u>1.0</u>	1 0 1 1 1 1

Tabelle II.9.: Fragmentlängen und abgeleitete Binäre Schnittstellencodierung der drei Restriktionstypen A, B und C des Restriktionsenzym *Xba*I; das Fragment 8.5kb wird bei Typ A und B in die Fragmente 6.6 und 1.6kb gespalten; das Fragment 4.1kb wird bei Typ A und C in die Fragmente 3.1 und 1.0kb gespalten

Die Binäre Schnittstellencodierung wird in einer bestimmten Form in den Computer eingegeben und mittels eines hauseigenen Programmes von Ing. Rudolf Willing werden die Genetischen Distanzen zwischen den einzelnen Taxa (hier mtDNA-Haplotypen) nach der unten angeführten Formel berechnet.

5.1.2. Genetische Distanz

Die Berechnung der Genetischen Distanz (D) zwischen mtDNA-Haplotypen erfolgt nach der untenstehenden Gleichung (Nei & Li, 1979) und gibt die geschätzte Zahl der Unterschiede (Zahl der akkumulierten Basensubstitutionen) pro Nukleotid zwischen zwei Sequenzen an:

$$D = - (3/2) \log_{10} [(4S^{1/2r} - 1)/3] \quad \text{oder} \quad D = - (\log_{10} S)/r$$

- S = n_{xy}/n_o Anteil der seit dem letzten gemeinsamen Vorfahren unveränderten Schnittstellen
- n_{xy} gemeinsame Schnittstellen von Typ X und Typ Y
- n_o im Ahnen der beiden Typen vorhandene Schnittstellen. Diese sind nicht bekannt und müssen daher nach der Formel $n_o = (n_x + n_y)/2$ geschätzt werden.
- r Anzahl der vom Restriktionsenzym erkannten Nukleotide des Palindroms

Die Berechnung der paarweisen Genetischen Distanz (D) zwischen Populationen (beruhend auf den gefundenen mtDNA-Haplotypen) erfolgt über die Genetische Identität (I). Diese ist die Wahrscheinlichkeit, mit der Individuen aus zwei Populationen an einem zufällig ausgewählten Genlocus identische Allele besitzen. Die folgenden Formeln nach Nei (1972) werden angewendet:

$$I = J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$$

$$J_{xy} = 3 p_{ix} p_{iy} \quad J_x = 3 p_i^2 x \quad J_y = 3 p_i^2 y$$

D = - lnI

- D Zahl der akkumulierten Codonsubstitutionen pro Genlocus, Genetische Distanz
 p Allelfrequenz, hier mtDNA-Haplotypenfrequenz (entspricht x in II.5.4.2. und 5.4.3.)
 i i-tes Allel, hier mtDNA-Haplotyp
 x Population x
 y Population y

5.1.3. Genetische Divergenzzeit

Die unter II.5.1. berechneten Genetischen Distanzen (D) können unter der Voraussetzung einer weitgehend selektionsneutralen molekularen Evolution und einer Konstanz hinsichtlich der Codonsubstitutionsrate pro Jahr in Divergenzzeiten umgerechnet werden. Nach Wilson et al. (1985) entsprechen 2% Genetische Distanz (D) einer Divergenzzeit (t) von 1 Million Jahre.

5.2. FITCH-MARGOLIASH ALGORITHMUS

Auf jene Genetischen Distanzen, die nach Nei & Li (1979) zwischen den mtDNA-Haplotypen berechnet wurden, wird der Fitch-Margoliash Algorithmus (Fitch & Margoliash, 1967) angewendet (z.B. PHYLIP-Programmpaket von Felsenstein, 1993).

Dabei werden "fehlende" OTUs als gemeinsame Vorfahren eingefügt und die vorhandenen OTUs in drei Gruppen eingeteilt. Am Beispiel von Genetischen Distanzen (Jukes & Cantor, 1969) zwischen Menschenaffen (Brown et al., 1982) soll das Grundprinzip kurz erläutert werden.

	Mensch	Schimpanse	Gorilla	Orangutan	Gibbon
Mensch	-	0.015	0.045	0.143	0.198
Schimpanse		-	0.030	0.126	0.179
Gorilla			-	0.092	0.179
Orangutan				-	0.179
Gibbon					-

Tabelle II.10.: Paarweise Genetische Distanzen (Jukes & Cantor, 1969) zwischen Menschenaffen beruhend auf Sequenzvergleichen von mtDNA (Brown et al., 1982)

Im ersten Schritt werden zwei Gruppen mit jenen beiden OTUs gebildet, die die geringste Genetische Distanz zueinander aufweisen: 1. Gruppe (A) - Mensch, 2. Gruppe (B) - Schimpanse. Die 3. Gruppe (X) bilden die übrigen OTUs (Gorilla, Orangutan und Gibbon). Diese drei Gruppen werden über den gemeinsamen "fehlenden" Vorfahren C miteinander verbunden.

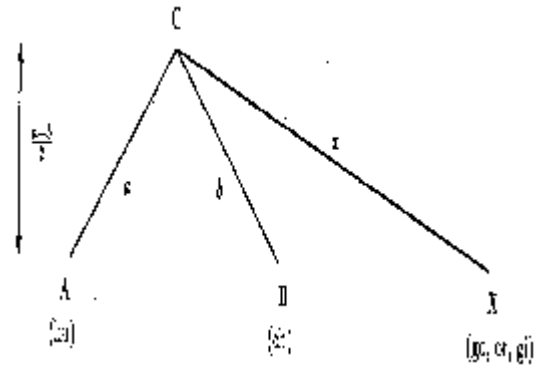
Die nachstehende Abbildung zeigt den ersten Schritt der Konstruktion eines Fitch-Margoliash Dendrogramms und dafür soll die Berechnung der linearen Distanzen kurz erläutert werden. Die Distanzen von C zu A, B werden als a, b und die Entfernung von C zu X als x bezeichnet. d_{AX} und d_{BX} sind die Distanzen von A nach X beziehungsweise von B nach X. d_{AB} und d_{BA} hingegen stellt die durchschnittliche Entfernung von A und B zu allen anderen Verzweigungspunkten außer B beziehungsweise A dar.

$$a+x = d_{AX} = \frac{1}{3}(0.045+0.143+0.198) = 0.129$$

$$b+x = d_{BX} = \frac{1}{3}(0.030+0.126+0.179) = 0.112$$

$$a+b = d_{AB} = 0.015$$

Aus der Berechnung der durchschnittlichen Distanz von A zu jeder OTU der Gruppe X ergibt sich: $a = 0.016$ und $b = -0.001$ (= 0.000 wird verwendet, da negative Distanzen bei diesem Verfahren Null gesetzt werden).



Im zweiten Schritt werden folgende Gruppen gebildet: 1. Gruppe - C, 2. Gruppe (D) - Gorilla und 3. Gruppe (X) - Orangutan und Gibbon. Diese drei Gruppen werden wiederum über den gemeinsamen "fehlenden" Vorfahren E miteinander verbunden.

Im dritten und letzten Schritt werden wieder folgende drei Gruppen gebildet: 1. Gruppe - E, 2. Gruppe (F) - Orangutan und 3. Gruppe (X) - Gibbon. Hier wird der gemeinsame "fehlende" Vorfahre G eingefügt (Weir, 1990).

In der Regel können mehrere Bäume konstruiert werden, wobei jener ausgewählt wird, der die geringste prozentuelle Standardabweichung aufweist (Fitch-Margoliash Kriterium). Die Abbildung II.2. zeigt das endgültige Fitch-Margoliash Dendrogramm ("gewurzelt") der paarweisen Genetischen Distanzen von Tabelle II.9. und die linearen Abstände zwischen den untersuchten Menschenaffen.

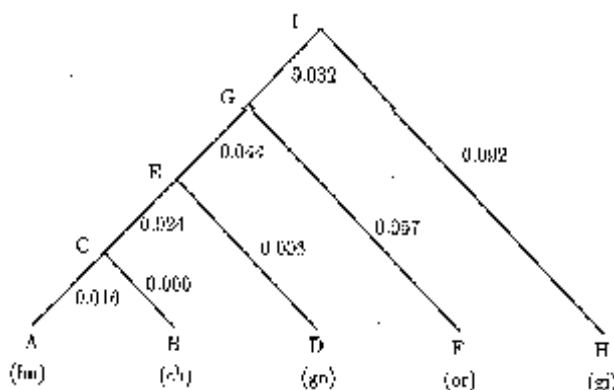


Abbildung II.2.: Fitch-Margoliash Dendrogramm ("gewurzelt") der paarweisen Genetischen Distanzen von Tabelle II.9. (aus Weir, 1990); hu Mensch, ch Schimpanse, go Gorilla, or Orangutan, gi Gibbon

5.3. MAXIMUM-PARSIMONY-METHODE

Bei diesem Verfahren entsteht ebenfalls ein Dedrogramm, dessen Verzweigungspunkte unter der Annahme der geringsten Anzahl von evolutiven Veränderungen beruhend auf dem Auftreten oder dem Verlust von Restriktionsschnittstellen berechnet (Edwards & Cavalli-Sforza, 1963, "The Principle of Minimum Evolution"). Die lineare Entfernung zwischen zwei Populationen (oder Taxa) wird in Schritten angegeben, durch die diese beiden aufgrund von Schnittstellenveränderungen voneinander getrennt sind. Meist können mit einem Datensatz mehrere gleich wahrscheinliche Maximum-Parsimony-Bäume (oder Parsimony-Netzwerke) konstruiert werden. Als Entscheidungshilfe bedient man sich daher eines Consensus-Baumes, der auf der Grundlage der häufigsten und stabilsten Verzweigungen gebildet wird ("Majority Rule Consensus tree").

Die Konstruktion eines Parsimony-Netzwerks soll ausgehend von der in Tabelle II.11. angeführten Merkmalsmatrix gezeigt werden. Im ersten Schritt werden z.B. die Haplotypen D, A, C und E herangezogen.

Der Haplotyp D ist einen Mutationsschritt (*Avall*) von jedem der drei anderen entfernt, wohingegen die Haplotypen A, C und E jeweils zwei Schritte voneinander getrennt sind (A: *Avall, SpeI*; C: *Avall, HincII*; E: *Avall, StuI*).

Der Haplotyp B ist durch einen Schritt von A (*DraI*), durch zwei Schritte von D (*DraI, SpeI*) und durch drei Schritte von C (*DraI, HincII, SpeI*) und E (*DraI, SpeI, StuI*) entfernt. Diese Beziehungen der Merkmale zueinander ergeben den unteren Teil des in Abbildung II.3. dargestellten Parsimony-Netzwerks.

Weiters ist aus der Matrix zu entnehmen, daß zwischen den Haplotypen A-E und den Haplotypen H, I, J, L und M ein deutlicher genetischer Unterschied besteht, da sie sich im Restriktionsmuster von fünf Enzymen voneinander unterscheiden.

	M e r k m a l e								
OTUs	<i>Avall</i>	<i>DraI</i>	<i>DraII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HincII</i>	<i>NdeI</i>	<i>PvuII</i>	<i>SpeI</i>	<i>StuI</i>
A	a	c	c	c	c	c	c	d	c
B	a	b	c	c	c	c	c	d	c
C	a	c	c	c	b	c	c	c	c
D	a	c	c	c	c	c	c	c	c
E	a	c	c	c	c	c	c	c	d
H	c	c	b	d	c	d	b	b	d
I	c	c	b	e	c	d	b	b	d
J	b	c	b	e	c	c	b	b	c
L	c	c	b	d	c	d	b	b	c
M	d	c	b	d	c	c	b	b	c

Tabelle II.11.: Merkmalsmatrix von mtDNA-Klonen bei Grünschildkröten nach Bowen et al. (1992); OTUs Operational Taxonomic Units

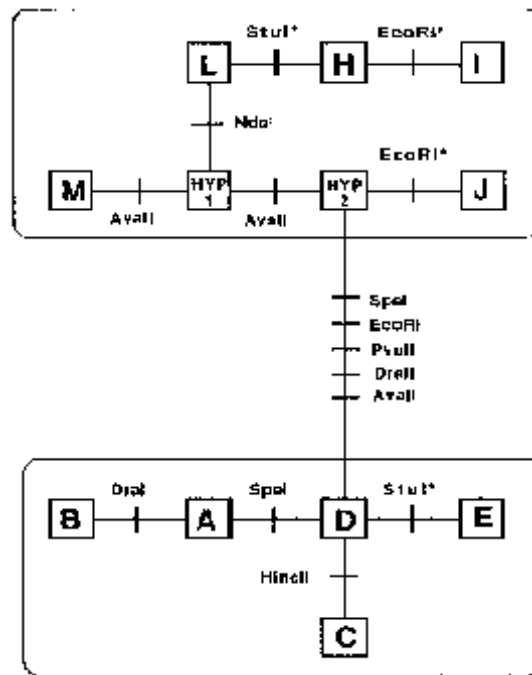


Abbildung II.3.: Maximum-Parsimony-Netzwerk beruhend auf der Merkmalsmatrix von Tabelle II.11. (aus Avise, 1994)

Bei der Konstruktion des oberen Teils des Netzwerks wird in gleicher Weise verfahren. In diesem Beispiel ist der untere Teil mit dem oberen Teil über den Haplotyp D und den angenommenen "fehlenden" Haplotyp HYP2 verbunden.

Diese beiden Haplotypen sind durch fünf Schritte getrennt, wohingegen eine Verknüpfung mit einem anderen Haplotyp der Matrix sechs oder mehr Schritte erfordern würde (vgl. Abbildung III.4.a. und 4.b.).

Mittels eines Algorithmus (in Form eines Computerprogrammes) werden jene Parsimony-Bäume berechnet, die ein Minimum von Merkmalsänderungen beinhalten ("most parsimonous trees").

Anschließend wird mit Hilfe eines "Consensus"-Verfahrens jener "Majority Rule Consensus tree" ermittelt, der die geringsten wie auch stabilsten Verzweigungen aller gefundenen Parsimony-Bäume repräsentieren soll (Avise, 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein von Joseph Felsenstein konzipiertes Programm verwendet (Mixed method parsimony - Version 3.5c, 1993), in dem die Parsimony-Methode nach Wagner (Kluge & Farris, 1969) verwendet wird. Diese berücksichtigt Merkmalsänderungen in beide Richtungen (0 \leftrightarrow 1, Verlust oder Auftreten einer Restriktionsschnittstelle).

5.4. HAPLOTYPEN- UND NUKLEOTIDDIVERSITÄT

5.4.1. Haplotypendiversität

Die Haplotypendiversität (HD) beschreibt die genetische Variabilität einer Population auf Ebene der mitochondrialen DNA und ist vergleichbar mit dem Heterozygotiegrad (H) der Enzymelektrophorese für einen Genlocus (h). Sie beruht auf der Anzahl und den Häufigkeiten verschiedener mtDNA-Haplotypen in einer Population. Die Haplotypendiversität (HD) wird nach folgender Formel berechnet (Nei & Tajima, 1981):

$$HD = (1 - \sum x_i^2) / (n-1)$$

x_i relative Häufigkeit des mtDNA-Haplotyps i in der Population x

n Stichprobenumfang

5.4.2. Haplotypenfrequenz

Die Haplotypenfrequenz (x_i) gibt an, mit welcher Häufigkeit ein bestimmter mtDNA-Haplotyp in einer Population vertreten ist. Berechnet wird die Haplotypenfrequenz beruhend auf dem folgenden einfachen mathematischen Zusammenhang:

$$x_i = a/n$$

a Anzahl des mtDNA-Haplotyps i in der Population x

n Stichprobenumfang

5.4.3. Nukleotiddiversität

Die Nukleotiddiversität (ND) einer Population kann als Mittelwert der paarweisen Nukleotiddivergenz (D) der untersuchten Individuen eines Bestandes berechnet werden. In die Berechnung der Nukleotiddiversität (ND) einer Population gehen sowohl die Zahl der verschiedenen Haplotypen als auch deren Unterschiedlichkeit ein. Die Nukleotiddiversität (ND) wird nach folgender Formel berechnet (Nei & Tajima, 1981):

$$ND = \sum_{i,j} 3x_i x_j D_{ij}$$

x_i, x_j relative Häufigkeit der mtDNA-Haplotypen i und j in der Population x

Mit Hilfe des Programms "NDBoots" werden Ergebnismatrizen mit den Nukleotiddiversitäten (ND) für alle möglichen paarweisen Vergleiche zwischen den untersuchten Individuen berechnet. Die Grundlage dafür bildet eine binäre Matrix bestehend aus allen Fragmenten (siehe III.1.7.). Diese Berechnungen beruhen auf einer vorher festgelegten Anzahl von Bootstrap-Datensätzen. Unter einem Bootstrap versteht man eine zufällige Probennahme aus dem Datensatz (Efron, 1982).

Bei den hier angestellten Berechnungen werden zufällig bestimmte Fragmente herangezogen. Der so gebildete Bootstrap-Datensatz beinhaltet die gleiche Anzahl von Fragmenten wie der Originaldatensatz und die zufällige Auswahl dieser Fragmente erfolgt "mit Zurücklegen", daher können einige Fragmente öfter, andere auch überhaupt nicht vertreten sein.

Bei einem Vergleich von zwei Gruppen oder Populationen darf ein Individuum nur einer der beiden Gruppen angehören. Wird die Nukleotiddiversität zwischen zwei Populationen berechnet, so ist die resultierende Netto-Nukleotiddiversität (ND_{net}) bezüglich der Nukleotiddiversität innerhalb der beiden Populationen korrigiert.

Das Programm für die Berechnung der Nukleotiddiversität zwischen den Gamsen aus den alpinen Ländern und den Tieren aus den spanischen Pyrenäen wurde von Dr. Tiedemann (Tiedemann, 1994) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

5.5. AUSWERTUNG DER ENZYMELEKTROPHORESE

Nach den von Harris & Hopkinson (1976), Allendorf et al. (1977) sowie Harris (1980) beschriebenen Prinzipien erfolgt die Auswertung und Interpretation der Bandenmuster auf dem Stärkegel. Das am häufigsten verwendete Maß für die Quantifizierung der genetischen Variabilität von Populationen ist die Heterozygotierate (H, Nei, 1975), die auch als "Gendiversität" bezeichnet und mittels folgender Formel berechnet wird:

$$\bar{H} = \frac{1}{L} \sum_j [3(1 - \sum_i x_{ij}^2)]$$

x_{ij} Frequenz des Allels i am Genlocus j

L Gesamtanzahl der untersuchten Loci

Die Polymorphierate (P, Ayala, 1977) beschreibt den Anteil der polymorphen Loci an der Gesamtzahl der untersuchten Loci. Der mathematische Zusammenhang stellt sich wie folgt dar:

$$P = L_p / L$$

L_p Anzahl der polymorphen Loci

Die Genetische Divergenz (D) zwischen Populationen, Unterarten, Arten und höheren Taxa kann nach Nei (1972 und 1978) und anderen, bei Rogers (1986) beschriebenen Methoden ermittelt werden.

Für die Berechnung der Genetischen Distanz (D) zwischen den untersuchten Populationen wurde eine von Wright (1978) modifizierte Genetische Distanz (Rogers, 1972) verwendet:

$$D = (1/2) \sum_i |x_i - y_i|$$

x_i, y_i Frequenz des i-ten Allels in den Populationen x und y

Für die Konstruktion von Dendrogrammen können folgende Verfahren zur Anwendung kommen: Average Linkage Clustering (UPGMA = unweighted pair-group method using an arithmetic average, oder WPGMA = weighted PGMA), Cavalli-Sforza-Edwards Baum, Fitch-Margoliash Baum, Wagner-Baum sowie Maximum-Parsimony-Baum.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Heterozygotierate, die Polymorphierate und die Genetische Distanz mit dem Programmpaket BIOSYS-1 (Swofford & Selander, 1989) berechnet.

6. VERWENDETE CHEMIKALIEN UND ENZYME

Chemikalien	Hersteller
Agarose (ME)	Sea Kem
Borsäure	Merck
Bovinseralbumin	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Caesiumchlorid	Boehringer Mannheim
Calciumchlorid	Merck
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS)	Merck
dNTPs	USB
Ethanol	universitätsintern
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	USB
Filterpapier	Schleicher & Schuell
Hydrochloridsäure (HCl)	Merck
Isoamylalkohol	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Lambda- <i>Hind</i> III-Marker	New England Biolabs
Mannit	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Magnesiumchlorid	USB
Magnesiumsulfat	New England Biolabs
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
pBR322- <i>Bst</i> NI-Marker	New England Biolabs
Polaroid 667	Kodak
Primer (für Cytochrom b)	Codon Genetic Systems
Restriktionsenzyme	Boehringer Mannheim
Restriktionspuffer	Boehringer Mannheim
Saccharose	Merck
Stärke	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-Base)	USB
Vent DNA-Polymerase	New England Biolabs
Vent DNA-Polymerasepuffer	New England Biolabs
Zitronensäure	Merck
100bp DNA-Leiter-Marker	Life Technologies

III. ERGEBNISSE

1. RFLP-ANALYSE DER MITOCHONDRIALEN DNA

1.1. FRAGMENTLÄNGEN DER RESTRIKTIONSTYPEN

Für die populationsgenetischen Untersuchungen der Gamsen (*Rupicapra*) wurde aus insgesamt 60 Tieren (siehe II.1.) die mitochondriale DNA isoliert und in Folge mit 18 Restriktionsendonukleasen, die zu den 6-Basenschneidern zählen (*Apal*, *AsnI*, *BamHI*, *BclI*, *BglII*, *ClaI*, *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *PstI*, *PvuII*, *SacI*, *Scal*, *SfuI*, *StuI*, *StyI* und *XbaI*) gespalten. Im Anschluß daran wurden die Fragmente auf Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und die Muster der verschiedenen Restriktionstypen verglichen. Beruhend darauf wurden mtDNA-Haplotypen definiert, die sich aus den unterschiedlichen Kombinationen der gefundenen Restriktionstypen ergaben. Es wurde nun festgestellt, welcher mtDNA-Haplotyp den untersuchten Individuen zugeordnet werden kann.

In Tabelle III.1. sind die Fragmentlängen der Restriktionstypen der verwendeten Restriktionsendonukleasen in Kilobasenpaaren angeführt. Es ist zu beachten, daß für die Restriktionsenzyme *Scal* und *StyI* die Angaben fehlen, da die entsprechenden Fragmentlängen und Schnittstellen bei den Individuen aus Spanien nicht einwandfrei bestimmt werden konnten (siehe III.1.2.). Daher wurden sie für die vergleichenden Studien zwischen den Tieren aus Spanien und jenen aus den übrigen Gebieten nicht herangezogen. Für den Typ C des Enzyms *SfuI* gilt ähnliches, doch konnte hier die variable Schnittstelle festgestellt werden und die Fragmentlängen sind für die statistische Auswertung nicht von Bedeutung. Auch war die Qualität der isolierten mtDNA des Individuums aus den italienischen Abruzzen zu mangelhaft, um eine RFLP-Analyse des gesamten mitochondrialen Genoms durchführen zu können. Es konnte jedoch das Cytochrom b-Gen mittels PCR erfolgreich amplifiziert und ebenfalls mit Restriktionsenzymen gespalten werden (siehe III.2.).

Von den 16 Restriktionsenzymen zeigten vier (*AsnI*, *EcoRI*, *SfuI* und *XbaI*) jeweils drei Restriktionstypen (Typ A, B und C); sechs Enzyme (*BamHI*, *BclI*, *ClaI*, *DraI*, *EcoRV* und *PvuII*) ergaben jeweils zwei Restriktionstypen (Typ A und B). Bei *Apal*, *BglII*, *HindIII*, *PstI*, *SacI* und *StuI* trat jeweils nur ein Restriktionstyp (Typ A) auf.

Asnl			Sful			Xbal		
Typ A	Typ B	Typ C	Typ A	Typ B	Typ C	Typ A	Typ B	Typ C
		3.5			x.x			8.5
2.6	2.6		7.2	7.2		6.6	6.6	
	2.5	2.5	2.9	2.9	2.9		4.1	
2.2	2.2	2.2	2.9		2.9	3.1		3.1
2.0	2.0	2.0		2.1		2.8	2.8	2.8
1.9					x.x	1.6	1.6	
1.8	1.8	1.8	1.6	1.6	1.6	1.0		1.0
1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	0.9	0.9	0.9
1.0	1.0	1.0		0.8		EcoRI		
0.9	0.9					Typ A	Typ B	Typ C
0.9	0.9	0.9				9.4	9.4	
0.6						7.0		7.0
BamHI		DraI		BclI				5.4
Typ A	Typ B	Typ A	Typ B	Typ A	Typ B		4.0	4.0
5.1		6.9	6.9	16.0			3.0	
	4.0	4.5			7.5	EcoRV		
3.5	3.5		2.6		6.2	Typ A	Typ B	
3.0	3.0		1.9		2.2	8.7	8.6	
2.6	2.6	1.6	1.6			7.4		
1.4	1.4	1.4	1.4				4.8	
	1.1	0.8	0.8				3.6	
		0.7	0.7					

Tabelle III.1.: Fragmentlängen der Restriktionstypen A, B und C der verwendeten Restriktionsenzyme in kb (mit der Toleranz von - 5% Meßungenauigkeit); ^{*)} andere Schnittstelle als bei Typ A; k.S. keine Schnittstelle; x.x. Fragmentlänge konnte nicht ermittelt werden

Fortsetzung von Tabelle III.1.

Stul	Apal	HindIII	PvuII	
Typ A	Typ A	Typ A	Typ A	Typ B
3.0	12.5	13.3		16.0
3.0	3.0	1.9	8.5	
2.0	1.3	1.4	7.8	
1.8	BglII	SacI	Clal	
1.8	Typ A	Typ A	Typ A	Typ B
1.5	16.0	16.0	16.0	16.0 ¹⁾
1.4	PstI			
0.7	Typ A			
0.4	k.S.			

1.2. GEFUNDENE mtDNA-HAPLOTYPEN

Bei den 59 untersuchten Gemsen (exklusive einem Tier aus den italienischen Abruzzen, siehe III.1.1.) wurden die mtDNA-Haplotypen 1 bis 8 gefunden. Die Tabelle III.2. zeigt, wie sich die einzelnen mtDNA-Haplotypen aus den Restriktionstypen der verwendeten Enzyme zusammensetzten.

Der mtDNA-Haplotyp 2* wird für die Auswertungen nicht herangezogen, da die Fragmentmuster der Typen A und B des Enzyms *StyI* nicht einwandfrei bestätigt sind (siehe III.1.1.). Dieser Haplotyp ist hier aber berücksichtigt, um alle gefundenen mtDNA-Haplotypen innerhalb von *R. rupicapra* darzustellen.

Der Haplotyp 5 wurde als Standard-mtDNA-Haplotyp definiert, der sich jeweils aus dem Typ A der Restriktionsenzyme zusammensetzte und auch am häufigsten gefunden wurde. Die mtDNA-Haplotypen 1 und 6 unterschieden sich vom mtDNA-Haplotyp 5 jeweils durch variable Schnittstellen bei einem Restriktionsenzym (1: *AsnI* und 6: *XbaI*). Die mtDNA-Haplotypen 2*, 3 und 4 hingegen unterschieden sich bereits in zwei und der Haplotyp 2 in drei Enzymen.

Betrachtet man die bei den beiden Gemsen aus Spanien gefundenen mtDNA-Haplotypen 7 und 8, so ist zu erkennen, daß diese bei acht (Haplotyp 8) beziehungsweise bei neun (Haplotyp 7) Restriktionsenzymen variable Schnittstellen aufwiesen. Insgesamt differierten der mtDNA-Haplotyp 8 durch 10 und der mtDNA-Haplotyp 7 durch 11 variable Schnittstellen vom Standard-mtDNA-Haplotyp 5.

	Haplotypen der mitochondrialen DNA								
Enzym	1	2	2*	3	4	5	6	7	8
Apal	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Asnl	B	B	B	A	A	A	A	C	C
BamHI	A	A	A	A	B	A	A	B	B
BclI	A	A	A	A	A	A	A	B	B
BglII	A	A	A	A	A	A	A	A	A
ClaI	A	A	A	A	A	A	A	B	B
DraI	A	A	A	A	A	A	A	B	B
EcoRI	A	A	A	A	B	A	A	C	C
EcoRV	A	A	A	A	A	A	A	B	B
HindIII	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PstI	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PvuII	A	A	A	A	A	A	A	B	B
SacI	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Scal	A	A	A	A	A	A	A	n.a.	n.a.
SfuI	A	B	A	B	A	A	A	C	A
StuI	A	A	A	A	A	A	A	A	A
StyI	A	A	B	A	A	A	A	n.a.	n.a.
XbaI	A	B	A	B	A	A	C	A	A

Tabelle III.2.a.: Zusammensetzung der mtDNA-Haplotypen aus den drei Restriktionstypen A, B, C der verwendeten Enzyme; n.a. nicht analysiert

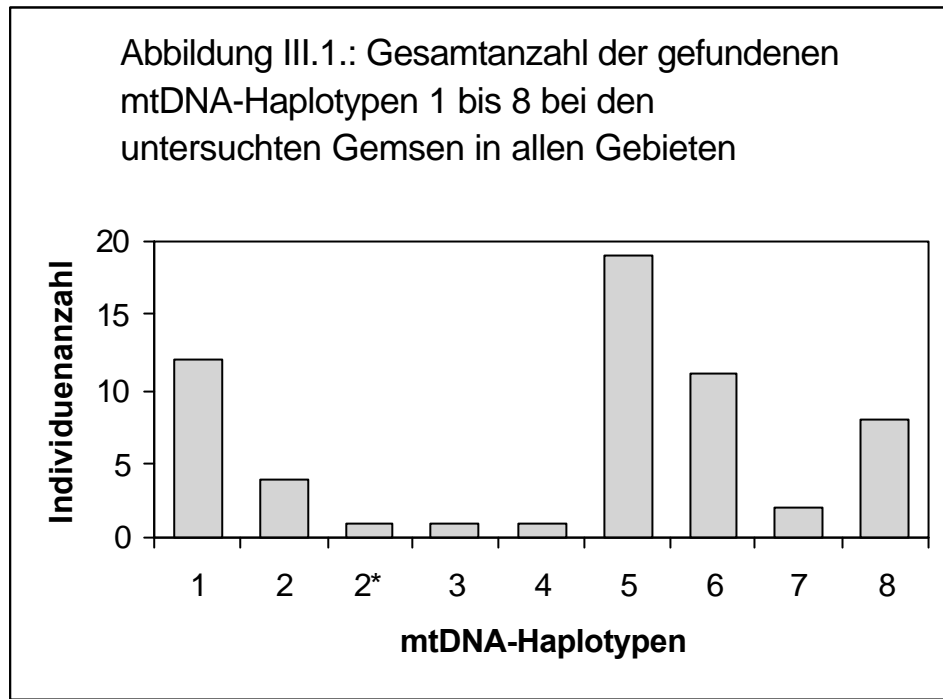
Land	Typ	Nummern der Tiere
Slowenien	1	21, 22, 32, 34, 37, 38, 85
	2	23, 27, 75, 93
	2*	29
	3	99
	4	n.b.
	5	76, 91, 94, 97, 98
	6	n.b.
	7	n.b.
Österreich	1	n.b.
	2	n.b.
	2*	n.b.
	3	n.b.
	4	n.b.
	5	588, 598, 605, 659, 744, 938-9, 947 *
	6	n.b.
	7	n.b.
8	n.b.	

Tabelle III.2.b.: Zuordnung der mtDNA-Haplotypen zu den untersuchten Tieren; n.b. nicht beobachtet; tat Gemse der Hohen Tatra

Fortsetzung von Tabelle III.2.b.

Land	Typ	Nummern der Tiere
Slowakei	1	n.b.
	2	n.b.
	2*	n.b.
	3	n.b.
	4	n.b.
	5	tat
	6	n.b.
	7	n.b.
8	n.b.	
Schweiz	1	116
	2	n.b.
	2*	n.b.
	3	n.b.
	4	251
	5	119, 216, 237
	6	188, 212, 214, 215, 235, 236, 243, 246, 255, 258-9
	7	n.b.
8	n.b.	
Italien	1	2, 3, 4, 6
	2	n.b.
	2*	n.b.
	3	n.b.
	4	n.b.
	5	1, 5
	6	n.b.
	7	n.b.
8	n.b.	
Spanien	1	n.b.
	2	n.b.
	2*	n.b.
	3	n.b.
	4	n.b.
	5	n.b.
	6	n.b.
	7	19, 20
8	22, 29, 30, 37, 38, 39, 40, 43	

1.3. GEOGRAPHISCHE VERTEILUNG DER mtDNA-HAPLOTYPEN, HAPLOTYPENDIVERSITÄT



Land	Anzahl d. Tiere	mtDNA-Haplotypen								
		1	2	2*	3	4	5	6	7	8
SLO	18	7	4	1	1	-	5	-	-	-
A	8	-	-	-	-	-	8	-	-	-
CH	16	1	-	-	-	1	3	11	-	-
I	6	4	-	-	-	-	2	-	-	-
SK	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-
E	10	-	-	-	-	-	-	-	2	8
Total	59	12	4	1	1	1	19	11	2	8

Tabelle III.3.a.: Geographische Verteilung der mtDNA-Haplotypen 1 bis 8 in SLO Slowenien, A Österreich, CH Schweiz, I Italien, SK Slowakei und E Spanien

Die Abbildung III.1. zeigt, daß der mtDNA-Haplotyp 5, welcher unter III.1.2. als Standard-Haplotyp definiert wurde, am häufigsten zu finden war (19 Tiere). Auch wurde festgestellt, daß dieser Haplotyp in allen untersuchten Gebieten auftrat, mit Ausnahme der untersuchten Gemen aus Spanien. In der Stichprobe aus den spanischen Pyrenäen wurden zwei mtDNA-Haplotypen (7 und 8) gefunden, die bei den Gemen aus den anderen untersuchten Gebieten nicht auftraten (siehe Tabelle III.3.a.).

Die Haplotypen 2*,3 und 4 waren bei jeweils einem Individuum vertreten, Haplotyp 2 fand sich bei 4 Tieren, der Haplotyp 1 hingegen bei 12 und Haplotyp 6 bei 11 Gemen.

In Spanien konnten 2 verschiedene Haplotypen festgestellt werden, die sich voneinander jedoch nur im Restriktionsmuster eines Enzyms unterschieden (siehe III.1.1.).

Haplotypendiversität und Haplotypenfrequenz

In der nachstehenden Tabelle ist die Haplotypendiversität (HD) sowie die Haplotypenfrequenz (x) in den untersuchten Gebieten wie auch innerhalb des gesamten Stichprobenumfangs von 59 Tieren angeführt.

Land	HD	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆	x ₇	x ₈
SLO	76.1	41.2	23.4	5.9	0	29.3	0	0	0
A	0	0	0	0	0	1	0	0	0
CH	51.6	6.3	0	0	6.3	18.7	68.7	0	0
I	53.5	66.6	0	0	0	33.3	0	0	0
SK	0	0	0	0	0	1	0	0	0
E	35.6	0	0	0	0	0	0	20	80
Total	66.5	20.7	6.9	1.6	1.6	32.8	19.0	3.5	13.8

Tabelle III.3.b.: Haplotypendiversität (HD) und Haplotypenfrequenz (x₁-x₈) der gefundenen mtDNA-Haplotypen 1 bis 8; Angaben in Prozent; SLO Slowenien, A Österreich, CH Schweiz, I Italien, SK Slowakei und E Spanien;

In Österreich und der Slowakei beträgt die Haplotypendiversität der untersuchten Gemen 0, da jeweils nur ein mtDNA-Haplotyp vertreten war. In Slowenien findet sich mit 0.761 (76.1%) die größte Haplotypendiversität, da 5 verschiedene Haplotypen gefunden werden konnten. In der Schweiz und in Italien hingegen sind mit 0.516 (51.6%) und 0.535 (53.5%) annähernd gleiche Haplotypendiversitäten festzustellen.

Die Frequenz der mtDNA-Haplotypen 1 und 5 ist mit 20.3 und 32.1% deutlich höher als jene der übrigen Haplotypen. Ausgehend von diesen Frequenzen kann nun die paarweise Genetische Divergenz (Nei, 1972) zwischen den untersuchten Populationen von *Rupicapra* berechnet werden (Tabelle III.5.b.).

1.5. GENETISCHE DIVERGENZ UND DIVERGENZZEITEN

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0.0000							
2	0.0010	0.0000						
3	0.0015	0.0005	0.0000					
4	0.0015	0.0025	0.0020	0.0000				
5	0.0005	0.0015	0.0010	0.0010	0.0000			
6	0.0010	0.0020	0.0015	0.0015	0.0005	0.0000		
7	0.0055	0.0066	0.0071	0.0059	0.0060	0.0066	0.0000	
8	0.0050	0.0061	0.0066	0.0054	0.0055	0.0061	0.0005	0.0000

Tabelle III.5.a.: Genetische Distanzen (Nei & Li, 1979) zwischen den gefundenen mtDNA-Haplotypen 1 bis 8 der untersuchten Gemsen

	CH	A	I	SLO	SK
CH	0.000				
A	1.346	0.000			
I	1.643	0.806	0.000		
SLO	1.611	0.646	0.115	0.000	
SK	1.346	0.000	0.806	0.646	0.000

Tabelle III.5.b.: Paarweise Genetische Distanz (Nei, 1972) zwischen den untersuchten Populationen von *R. rupicapra*, berechnet nach den Haplotypenfrequenzen von Tabelle III.3.b. in Prozent; CH Schweiz (Graubünden), A Österreich (Achenkirch), I Italien (Val di Susa), SLO Slowenien, SK Slowakei (Hohe Tatra)

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-							
2	50 000	-						
3	75 000	25 000	-					
4	75 000	125 000	100 000	-				
5	25 000	75 000	50 000	50 000	-			
6	50 000	100 000	75 000	75 000	25 000	-		
7	275 000	330 000	355 000	295 000	300 000	330 000	-	
8	250 000	305 000	330 000	270 000	275 000	305 000	85 000	-

Tabelle III.6.: Geschätzte Divergenzzeiten (Wilson et al., 1985) in Jahren zwischen den gefundenen mtDNA-Haplotypen 1 bis 8 der untersuchten Gemsen

1.6. DENDROGRAMME

Fitch-Margoliash Unrooted Network

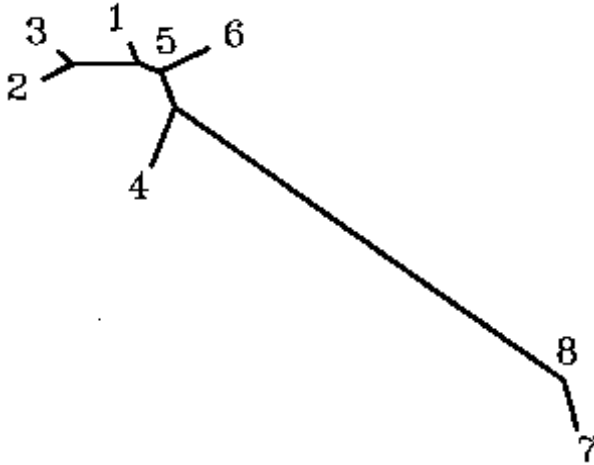


Abbildung III.2.: Fitch-Margoliash Unrooted Network der gefundenen mtDNA-Haplotypen 1 bis 8 der untersuchten Gemen, berechnet nach dem PHYLIP-Programmpaket von Felsenstein (1993); die Genetische Distanz zwischen Haplotyp 7 und 8 beträgt 0.05%

Treefile: (((5:0.00000, 6:0.00050):0.00003, ((8:0.00000, 7:0.00050):0.00477, 4:0.00063):0.00037):0.00025, (2:0.00032, 3:0.00018):0.00066, 1:0.00021);

Fitch-Margoliash Dendrogramm

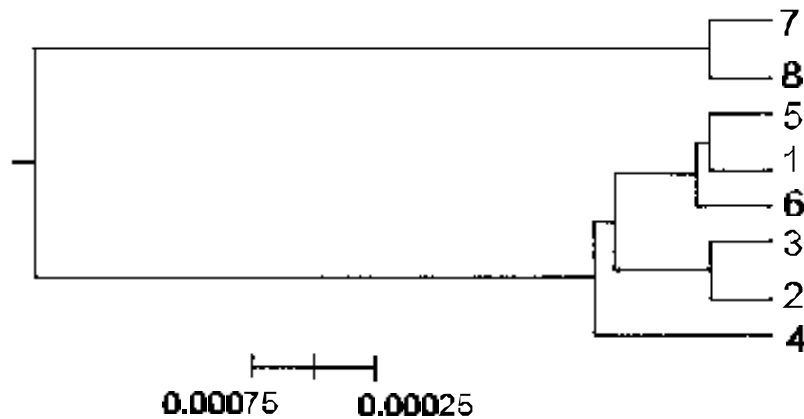


Abbildung III.3.: Fitch-Margoliash Dendrogramm ("gewurzelt") der gefundenen mtDNA-Haplotypen 1 bis 8 der untersuchten Gemen, berechnet nach dem PHYLIP-Programmpaket von Felsenstein (1993)

Treefile: ((8:0.00025, 7:0.00025):0.00271, (((5:0.00025, 1:0.00025):0.00005, 6:0.00030):0.00033, (3:0.00025, 2:0.00025):0.00038):0.00008, 4:0.00070):0.00226);

Maximum-Parsimony Unrooted Networks

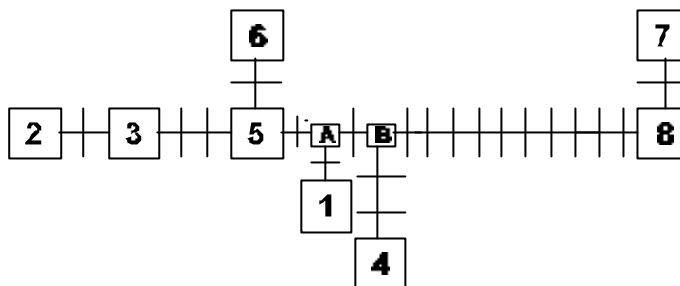


Abbildung III.4.a.: Majority Rule Consensus Tree der gefundenen mtDNA-Haplotypen 1 bis 8 der untersuchten Gemen berechnet nach dem PHYLIP- Programmpaket von Felsenstein (1993); Querstriche entlang des Baumes geben das Auftreten oder den Verlust einer Schnittstelle an; A und B sind angenommene Verzweigungspunkte

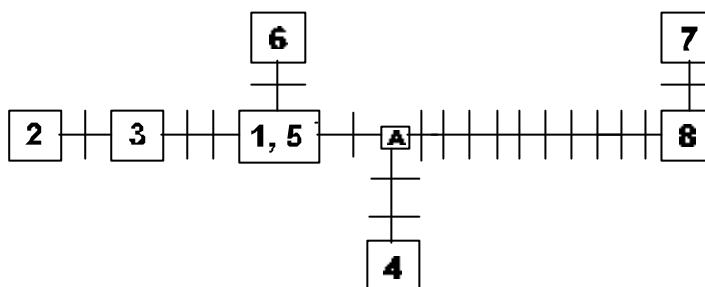


Abbildung III.4.b.: Majority Rule Consensus Tree der gefundenen mtDNA-Haplotypen 1 bis 8 der untersuchten Gemen berechnet nach dem PHYLIP-Programmpaket von Felsenstein (1993); Querstriche entlang des Baumes geben das Auftreten oder den Verlust einer Schnittstelle an; A ist ein angenommener Verzweigungspunkt

Die Abbildungen III.4.a. und 4.b. zeigen zwei Netzwerke, die mittels eines “Consensus”-Verfahrens nach Anwendung des Wagner-Parsimony (II.5.3.) ermittelt werden konnten, wobei Abbildung III.4.b. das sparsamste (“most parsimonous”) Netzwerk darstellt. Das “Consensus”-Verfahren ergab aufgrund der drei Restriktionstypen des Enzyms *SfuI* (vgl. III.1.1.), wovon zwei Schnittstellen des Typs C nicht eindeutig bestimmt werden konnten, in diesem Fall zwei Netzwerke.

Die angenommenen Verzweigungspunkte A und B in diesen Netzwerken sollen auf möglicherweise vorhandene mtDNA-Haplotypen hinweisen, die bei dieser Untersuchung nicht gefunden wurden. Diese “fehlenden” Haplotypen könnten Übergangsformen zwischen den bislang beobachteten Typen darstellen. Einerseits besteht die Möglichkeit, daß diese Haplotypen bei Untersuchungen von weiteren Gemen aus dem Verbreitungsgebiet von

Rupicapra rupicapra gefunden werden.

Andererseits wäre aber auch denkbar, daß diese fehlenden Haplotypen ("missing links") im Laufe der Entwicklung von *Rupicapra* bereits ausgestorben sind.

Die Abbildungen III.2. und III.3. zeigen sehr deutlich den großen linearen Abstand zwischen den gefundenen mtDNA-Haplotypen von den untersuchten Gamsen aus dem alpinen Bereich (*R. rupicapra*) und jenen aus Spanien (*R. p. pyrenaica*). Die beiden Fitch-Margoliash Dendrogramme beziehungsweise Netzwerke geben jene Genetischen Distanzwerte nach Nei & Li (1979) als lineare Abstände wieder, die in Tabelle III.5.a. angegeben sind.

Die Maximum-Parsimony-Netzwerke hingegen (Abbildung III.4.a. und 4.b.) stellen die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den mtDNA-Haplotypen basierend auf dem Auftreten oder dem Verlust von Schnittstellen dar. Die beiden Haplotypen 7 und 8 (*R. p. pyrenaica*) zeigen mehr veränderte Restriktionsschnittstellen bezogen auf die Haplotypen 1 bis 6 (*R. rupicapra*), als letztere Haplotypen untereinander. Die gefundenen mtDNA-Haplotypen der alpinen Gamsen variieren nur geringfügig.

Bei allen erstellten Netzwerken und Dendrogrammen ergibt sich eine eindeutige Trennung zwischen den beiden vermuteten Arten, *R. pyrenaica* und *R. rupicapra*.

1.7. CODIERUNG DER FRAGMENTE

	1	2	3	4	5	6	7	8		A	B	B	A	A	A	C	A
BamHI	A	A	A	B	A	A	B	B	SfuI	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1		0	1	1	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1		0	1	1	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	0	0	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	1	0	0	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	0	1	1	0	0		0	0	0	0	0	0	1	0
DraI	A	A	A	A	A	A	B	B	XbaI	A	B	B	A	A	C	A	A
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	0	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	0	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1		0	0	0	0	0	1	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	0	0		1	1	1	1	1	1	1	1
EcoRI	A	A	A	B	A	A	C	C	ClaI	A	A	A	A	A	A	B	B
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1		0	0	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	1	0	0	0	0		1	1	1	1	1	1	0	0
	0	0	0	1	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	1
	1	1	1	0	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	0	0		1	1	1	1	1	1	1	1
EcoRV	A	A	A	A	A	A	B	B	StuI	A	A	A	A	A	A	A	A
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	0	0		1	1	1	1	1	1	1	1
HindIII	A	A	A	A	A	A	A	A	SacI	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
ApaI	A	A	A	A	A	A	A	A	BglII	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1		0	0	0	0	0	0	1	1
PvuII	A	A	A	A	A	A	B	B	AsnI	B	B	A	A	A	A	C	C
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	1		0	0	0	0	0	0	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	0	0		1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	0	0		1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
BclI	A	A	A	A	A	A	B	B		1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	0	0		1	1	1	1	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	1	1		0	0	1	1	1	1	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	1		0	0	1	1	1	1	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	1		1	1	0	0	0	0	1	1

Tabelle III.8.: Binäre Ergebnismatrix der Fragmentcodierung der gefundenen mtDNA-Haplotypen 1 bis 8 bei den untersuchten Gemsen aufgrund der Restriktionstypen A, B, C der verwendeten Enzyme

1.8. NUKLEOTIDDIVERSITÄT

Für die Berechnung der Nukleotiddiversität wurden die gefundenen Restriktionsmuster bei *Rupicapra* ebenfalls EDV-gerecht codiert. Im Gegensatz zu der Codierung für die Berechnung der Genetischen Divergenz (vgl. III.5.1.) muß hier bezüglich des Vorhanden-seins oder Nichtvorhandenseins von gemeinsamen Fragmenten codiert werden. Auch in diesem Fall wird eine binäre Ergebnismatrix erstellt, wobei "0" das Fehlen und "1" das Vorhandensein eines gemeinsamen Fragmentes bezeichnet. In Tabelle III.8. (III.1.7.) ist diese binäre Ergebnismatrix dargestellt.

Die nachstehenden Berechnungen wurden mit dem Programm "ND-Boots" (Tiedemann, 1994) durchgeführt. Es wurde zwischen den Gamsen der alpinen Gruppe (Slowakei, Österreich, Schweiz, Slowenien und Italien) und jenen aus den spanischen Pyrenäen die paarweise Netto-Nukleotiddiversität berechnet (Tabelle III.9.a.). Weiters wurde die paarweise Netto-Nukleotiddiversität zwischen allen untersuchten Gamsenpopulationen ermittelt (Tabelle III.9.b.).

Total	Alpen	Spanien	ND	ND _{net}	
0.005083	0.001824	0.000380	0.012486	0.011381	
0.000923	0.000512	0.000228	0.002485	0.002428	Standardfehler
0.0034-0.007	0.001-0.0029	0.0-0.0009	0.008-0.0179	0.0071-0.0166	Konfidenzintervall 95%
0.0037-0.0067	0.0011-0.0028	0.0-0.0008	0.0088-0.0169	0.0078-0.0159	Konfidenzintervall 90%

Tabelle III.9.a.: Nukleotiddiversität zwischen den untersuchten Gamsen aus den Alpen (Slowakei, Österreich, Schweiz, Slowenien, Italien) und Spanien; ND Nukleotiddiversität; ND_{net} Nettonukleotiddiversität

	E	CH	A	I	SLO	SK
E	-	1.33	1.23	1.13	1.22	1.23
CH	-	-	0.10	0.17	0.25	0.10
A	-	-	-	0.08	0.15	0.00
I	-	-	-	-	0.12	0.08
SLO	-	-	-	-	-	0.15
SK	-	-	-	-	-	-

Tabelle III.9.b.: Netto-Nukleotiddiversität zwischen den untersuchten Populationen von *Rupicapra* in Prozent; E Spanien (Katalonien), CH Schweiz (Graubünden), A Österreich (Achenkirch), I Italien (Val di Susa), SLO Slowenien, SK Slowakei (Hohe Tatra)

2. RFLP-ANALYSE DES CYTOCHROM b-GENS

2.1. FRAGMENTLÄNGEN DER RESTRIKTIONSTYPEN

Für die populationsgenetischen Untersuchungen der Gemsen (*Rupicapra*) wurde von jeweils einem Vertreter der gefundenen Haplotypen der Gesamt-mtDNA (siehe III.1.2.) das Cytochrom b-Gen mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Da die isolierte mtDNA des Individuums aus den italienischen Abruzzen (*R. pyrenaica ornata*) nur für die Amplifizierung des Cytochrom b-Gens und eine anschließende Restriktionsanalyse herangezogen werden konnte, wurden ebenso die Gemse der Hohen Tatra sowie alle sechs Individuen des Val di Susa in Norditalien auf diese Weise untersucht.

Anschließend wurden die erhaltenen DNA-Produkte mit sechs 4-Basenschneidern zählen (*AluI*, *CfoI*, *HaeIII*, *MspI*, *RsaI* und *TaqI*) sowie fünf 5-Basenschneidern (*Avall*, *DdeI*, *HinfI*, *MvaI* und *NciI*) gespalten.

Die so erhaltenen Fragmente wurden auf Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und die Muster der verschiedenen Restriktionstypen verglichen. Basierend darauf wurden Cytochrom b-Haplotypen definiert, die sich aus den unterschiedlichen Kombinationen der beobachteten Restriktionstypen zusammensetzen.

Insgesamt liegt hier eine Restriktionsanalyse des Cytochrom b-Gens mit 4- und 5-Basenschneidern von insgesamt 16 Tieren vor.

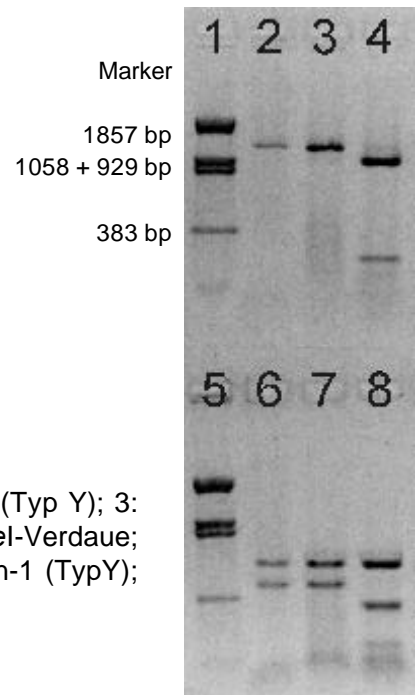
Die Abbildungen III.5., 6. und 7. zeigen jene unterschiedlichen Fragmentmuster der Enzyme *Avall*, *DdeI*, *MvaI* und *HaeIII*, die bei den Tieren aus Spanien, den Abruzzen sowie Slowenien (stellvertretend für den alpinen Bereich) zu beobachten waren.

Diese Abbildungen sind Ausschnitte aus den Fotos der dazugehörigen Agarosegele und wurden invers in den Computer eingescannt, daher erscheinen die sonst hellen DNA-Banden hier schwarz.

In Tabelle III.10. sind die Fragmentlängen der Restriktionstypen der verwendeten Restriktionsendonukleasen in Kilobasenpaaren angeführt.

Von den 11 Restriktionsenzymen zeigten fünf (*AluI*, *Avall*, *DdeI*, *MvaI* und *RsaI*) zwei Restriktionstypen (Typ X und Y); nur das Enzym *HaeIII* ergab die drei Typen X, Y und Z, und die Enzyme *CfoI*, *HinfI*, *MspI*, *NciI* und *TaqI* wiesen nur einen Restriktionstyp (Typ X) auf.

Der Typ Y von *Avall* und *MvaI* hatte keine Schnittstelle, wie auch der Typ X der Enzyme *MspI* und *NciI*.



1-4 *Ava*II-Verdaue; 1: Marker pBR322-*Bst*NI; 2: Spanien Nr. 40 (Typ Y); 3: Abruzenen-1 (Typ Y); 4: Slowenien Nr. 99 (Typ X); Spur 5-8 *Dde*I-Verdaue; 5: Marker pBR322-*Bst*NI; 6: Spanien Nr. 40 (Typ Y); 7: Abruzenen-1 (Typ Y); 8: Slowenien Nr. 99 (Typ X)

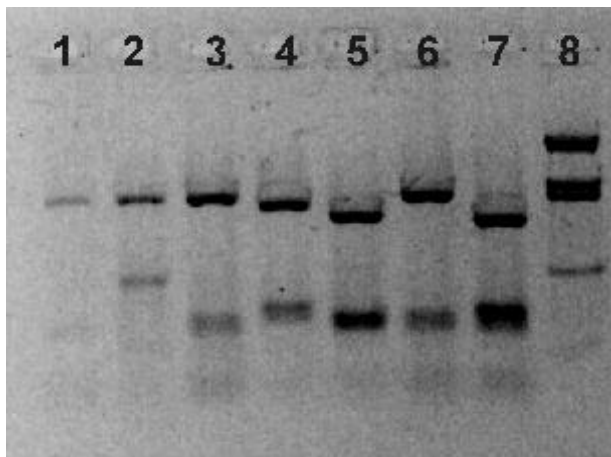
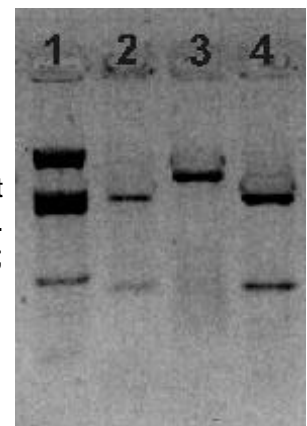


Abbildung III.6.: Spur 1-4 Fragmentmuster der Cytochrom b-Restriktion mit *Mva*I; 1: Marker pBR322-*Bst*NI; 2: Spanien Nr. 40 (Typ X); 3: Abruzenen-1 (Typ Y); 4: Slowenien Nr. 99 (Typ X)

Abbildung III.7.: Spur 1-8 Fragmentmuster der Cytochrom b-Restriktion mit *Hae*III; 1: Spanien Nr. 40 (Typ X); 2: Abruzenen-1 (Typ Z); 3: Slowenien Nr. 99 (Typ X); 4-6: Vergleich mit Schaf, Ziege, Thar; 7: Italien Nr. 5 (Typ Y); 8: Marker pBR322-*Bst*NI



<i>Alul</i>		<i>Avall</i>		<i>Ddel</i>		<i>Mval</i>	
Typ X	Typ Y	Typ X	Typ Y	Typ X	Typ Y	Typ X	Typ Y
0.9			k.S.	0.7	0.7		k.S.
	0.5	0.95			0.5	0.95	
	0.4	0.25		0.3		0.25	
0.3	0.3			0.2			
<i>Rsal</i>		<i>Haelll</i>			<i>CfoI</i>	<i>Hinfl</i>	<i>TaqI</i>
Typ X	Typ Y	Typ X	Typ Y	Typ Z	Typ X	Typ X	Typ X
0.8		0.9		0.9	0.7	0.3	0.6
	0.55		0.7		0.5	0.3	0.6
0.25	0.25			0.3		0.3	
	0.25	0.2	0.2		<i>MspI</i>	<i>NciI</i>	
0.15	0.15		0.2		Typ X	Typ X	
		0.1	0.1		k.S.	k.S.	

Tabelle III.10.: Fragmentlängen der Restriktionstypen X, Y und Z der verwendeten Restriktionsenzyme in kb (mit einer Toleranz von - 5% Meß-ungenauigkeit); k.S. keine Schnittstelle

2.2. GEFUNDENE CYTOCHROM b-HAPLOTYPEN

Es wurden bei den untersuchten Vertretern der mtDNA-Haplotypen (inklusive 1 Tier aus den italienischen Abruzzen) die Cytochrom b-Haplotypen 1, 2, 3 und 4 gefunden. Tabelle III.11. zeigt, wie sich die beobachteten Cytochrom b-Haplotypen aus den Restriktionstypen der verwendeten Enzyme zusammensetzten. Der Haplotyp 1 wurde als Standard-Cytochrom b-Haplotyp definiert, der sich jeweils aus dem Typ X der Restriktionsenzyme bildete. Der Typ 2 unterschied sich von Typ 1 nur durch eine variable Schnittstelle des Enzyms *Haelll*, der Typ 3 hingegen bereits in drei Enzymen (*Alul*, *Avall* und *Ddel*) und drei variablen Schnittstellen; der Typ 4 wich sogar in sechs (*Alul*, *Avall*, *Ddel*, *Haelll*, *Mval* und *Rsal*) Restriktionsenzymen sowie sechs differierenden Schnittstellen von Typ 1 ab.

	Cytochrom b-Haplotypen			
Enzym	1	2	3	4
<i>AluI</i>	X	X	Y	Y
<i>Avall</i>	X	X	Y	Y
<i>CfoI</i>	X	X	X	X
<i>Ddel</i>	X	X	Y	Y
<i>HaeIII</i>	X	Y	X	Z
<i>Hinfl</i>	X	X	X	X
<i>MspI</i>	X	X	X	X
<i>MvaI</i>	X	X	X	Y
<i>NciI</i>	X	X	X	X
<i>RsaI</i>	X	X	X	Y
<i>TaqI</i>	X	X	X	X

Tabelle III.11.: Zusammensetzung der Cytochrom b-Haplotypen aus den drei Restriktionstypen X, Y und Z der verwendeten Restriktionsenzyme; **fett** 4-Basenschneider

In Tabelle III.12. wird gezeigt, welcher Cytochrom b-Haplotyp bei den Haplotypen der gesamten mitochondrialen DNA auftrat. Es kann jedoch nicht jedem Tier, von dem die RFLP-Analyse des gesamten mitochondrialen Genoms vorliegt, ein Cytochrom b-Haplotyp zugeordnet werden (vgl. III.1.2., Tabelle III.2.a. und 2.b.), da nur jeweils ein Vertreter jedes beobachteten mtDNA-Haplotyps hier untersucht wurde. Die nachstehende Tabelle gilt daher nur für 16 untersuchte Individuen, die alle beobachteten mtDNA-Haplotypen repräsentieren sollen.

	mtDNA-Haplotypen									
	1	2	2*	3	4	5	6	7	8	A-I
Cytochrom b-Haplotyp	1	1	1	1	1	1	1	3	3	4

Tabelle III.12.: Zuordnung der gefundenen Cytochrom b-Haplotypen zu den beobachteten Haplotypen der gesamten mtDNA bei den untersuchten Gamsen; A-I bezeichnet den wahrscheinlichen Haplotyp der Gesamt-mtDNA der Gemse aus dem Abruzen-Gebirge in Mittelitalien, da von diesem Tier in dieser Arbeit nur Daten der RFLP-Analyse des Cytochrom b-Gens vorliegen (vgl. III.2.1.)

2.3. GEOGRAPHISCHE VERTEILUNG DER CYTOCHROM b-HAPLOTYPEN

Wie unter III.2.2. erwähnt, kann auch die geographische Verteilung der Cytochrom b-Haplotypen nicht für alle Tiere angegeben werden, sondern nur für die untersuchten 16 Individuen. Es konnte jedoch festgestellt werden, daß die Typen 1 und 2 nur in den alpinen Regionen auftraten, der Typ 3 war eindeutig beschränkt auf die Stichprobe aus Spanien und der Typ 4 war nur bei dem Tier aus den Abruzzern in Mittelitalien zu finden. Der Typ 2 trat nur bei 2 der untersuchten Gamsen des Val di Susa auf und wuch lediglich in einer Schnittstelle von Typ 1 ab (siehe III.2.1.).

Cytochrom b-Haplotypen				
Region	1	2	3	4
Alpen (SK, A, CH, SLO)	+	-	-	-
Val di Susa (I)	+	+	-	-
Abruzzern (I)	-	-	-	+
Katalonien (E)	-	-	+	-

Tabelle III.13.: Geographische Verteilung der gefundenen Cytochrom b-Haplotypen der untersuchten Gamsen in den verschiedenen Regionen; SK Slowakei, A Österreich, CH Schweiz, SLO Slowenien, I Italien, E Spanien; + Typ ist vorhanden; - Typ ist nicht vorhanden

2.4. CODIERUNG DER SCHNITTSTELLEN

	1	2	3	4		1	2	3	4
<i>AluI</i>	X	X	Y	Y	<i>Msp</i>	X	X	X	X
	1	1	1	1		0	0	0	0
	0	0	1	1	<i>RsaI</i>	X	X	X	Y
<i>CfoI</i>	X	X	X	X		1	1	1	1
	1	1	1	1		1	1	1	1
<i>HaeIII</i>	X	Y	X	Z		0	0	0	1
	1	1	1	1	<i>TaqI</i>	X	X	X	X
	1	1	1	0		1	1	1	1
	0	1	0	0					

Tabelle III.14.: Binäre Ergebnismatrix der gefundenen Cytochrom b-Haplotypen 1 bis 4 der untersuchten Gamsen aufgrund der drei Restriktionstypen X, Y und Z der verwendeten 4-Basenschneider

2.5. GENETISCHE DIVERGENZ UND DIVERGENZZEITEN

	1	2	3	4
1	0.0000			
2	0.0058	0.0000		
3	0.0058	0.0112	0.0000	
4	0.0189	0.0245	0.0112	0.0000

Tabelle III.15.: Genetische Divergenz (Nei & Li, 1979) zwischen den gefundenen Cytochrom b-Haplotypen 1 bis 4 der untersuchten Gemen

	1	2	3	4
1	-			
2	290 000	-		
3	290 000	560 000	-	
4	945 000	1 225 000	560 000	-

Tabelle III.16.: Geschätzte Divergenzzeiten (Wilson et al., 1985) in Jahren zwischen den gefundenen Cytochrom b-Haplotypen 1 bis 4 der untersuchten Gemen

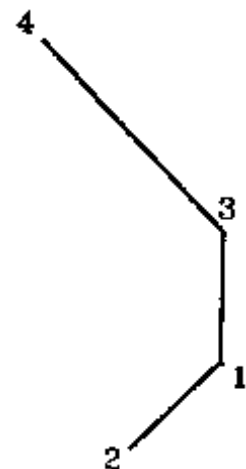
2.6. DENDROGRAMME

Fitch-Margoliash Unrooted Network

Abbildung III.8.:

Fitch-Margoliash Unrooted Network der gefundenen Cytochrom b-Haplotypen 1 bis 4 der untersuchten Gemen, berechnet nach dem PHYLIP-Programmpaket von Felsenstein (1993)

Treefile: (2:0.00567,(4:0.01185,3:0.00000):0.00578,1:0.00013);



Fitch-Margolish Dendrogramm

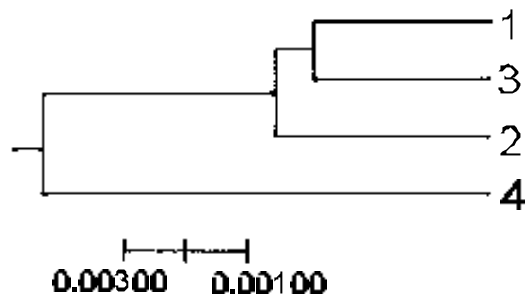


Abbildung III.9.: Fitch-Margoliash Dendrogramm ("gewurzelt") der gefundenen Cytochrom b-Haplotypen 1 bis 4 der untersuchten Gemen, berechnet nach dem PHYLIP-Programmpaket von Felsenstein (1993)

Treefile: (((3:0.00290,1:0.00290):0.00057,2:0.00347):0.00389, 4:0.00736);

Maximum-Parsimony Unrooted Network

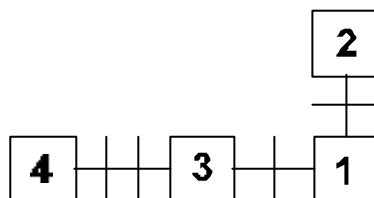


Abbildung III.10.: Majority Rule Consensus Tree der gefundenen Cytochrom b-Haplotypen 1 bis 4 der untersuchten Gemen, berechnet nach dem PHYLIP-Programmpaket von Felsenstein (1993); Querstriche entlang des Baumes geben den Verlust oder das Auftreten einer Schnittstelle an

3. ENZYMELEKTROPHORESE

Bei den 95 untersuchten Gamsen aus Slowenien (siehe II.4.4.) war nur ein Enzymlocus, *Pgm-2*, mit zwei Allelen polymorph. Die nachstehende Tabelle zeigt die 40 Strukturgenloci, die mittels Enzymelektrophorese analysiert wurden (siehe auch Tabelle II.7.). Diese Isoenzyme wurden ausgewählt, um die erhaltenen Daten mit jenen von Miller & Hartl (1986, 1987), Pemberton (1989) und Rubin (1992) vergleichen zu können. Es wurden die Heterozygotie- und Polymorphierate innerhalb des gesamten Stichprobenumfangs sowie die Genetische Divergenz nach Wright (1978) zwischen den Populationen der drei Untersuchungsgebiete Triglav, Kamnik und Maribor ermittelt.

Enzym	Genloci	Enzym	Genloci
ADA	Ada	CAT	Cat
AK	Ak-1, -2	LDH	Ldh-1, -2
ACY-1	Acy-1	MDH (MOR)	Mor-1, -2
AAT	Aat-1, -2	ME	Me-1, -2
ES	Es-1, -2	MPI	Mpi
FH	Fh	PEP	Pep-1, -2
GDH	Gdh	PGM	<i>Pgm-1</i> , -2, -3
GPD	Gpd	PGD	Pgd
GPI	Gpi	ACP	Acp-1, -2, -3
GLUD	Glud	SDH	Sdh
GDC	Gdc	SOD	Sod-1, -2
HK	Hk-1, -2	CK	Ck-1, -2
IDH	Idh-1, -2		

Tabelle III.17.: Untersuchte Alloenzyme und deren Strukturgenloci

Am *Pgm-2-Locus* trat das Allel A mit 82.1% und das Allel B mit 17.9% auf. Daraus ergaben sich eine Polymorphierate von 2.6% und Heterozygotiegrad von 0.8%. Die gefundene Heterozygotenhäufigkeit stimmt mit dem errechneten Wert des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts überein.

	Tri	Kam	Mar
Tri	0.000		
Kam	0.006	0.000	
Mar	0.009	0.015	0.000

Tabelle III.18.: Genetische Distanzen nach Wright (1978) zwischen den Gamsenpopulationen in Triglav, Kamnik und Maribor (Slowenien); Tri Triglav, Kam Kamnik, Mar Maribor

Bei anderen untersuchten Populationen von *R. r. rupicapra* waren höhere Heterozygotie- und Polymorphieraten beobachtet worden (Miller & Hartl, 1986, 1987; Pemberton, 1989; Rubin, 1992), sodaß diesen interessanten Befunden durch künftige Enzymuntersuchungen innerhalb dieser Subspezies nachgegangen werden sollte.

Ein Vergleich der genetischen Variabilität der mitochondrialen DNA mit jener der untersuchten Alloenzyme wird in Abschnitt IV.1.2. angestellt.

IV. DISKUSSION

1. GENETISCHE DIFFERENZIERUNG BEI *R. RUPICAPRA*

1.1. VERTEILUNG UND HÄUFIGKEIT DER MTDNA-HAPLOTYPEN

Obwohl für die durchgeführte Untersuchung nur Tiere der Subspezies *R. rupicapra rupicapra* und *R. rupicapra tatrica* zur Verfügung standen (siehe II.1.) können einige wichtige Aussagen bezüglich der genetischen Differenzierung und Variabilität bei *Rupicapra rupicapra* getroffen werden.

Bei den 49 untersuchten Gemen aus den Gebieten Achenkirch, Graubünden, Val di Susa, Slowenien und dem Nationalpark der Hohen Tatra wurden insgesamt sieben verschiedene mtDNA-Haplotypen gefunden. Einer dieser Haplotypen konnte in die weiteren Betrachtungen nicht mit einbezogen werden, da der vom Standard-mtDNA-Haplotyp 5 abweichende Restriktionstyp eines Enzyms nicht eindeutig definiert war (siehe III.1.2.).

Die Variabilität der mtDNA ist bei Anwendung der RFLP-Analyse zunächst als Verlust oder Auftreten einer neuen Schnittstelle in der Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym auf der mitochondrialen DNA zu beobachten.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurde festgestellt, daß die Variabilität bezüglich der Anzahl der detektierten Schnittstellen gering war. So unterschieden sich die mtDNA-Haplotypen 1 und 6 vom Haplotyp 5 nur durch eine variable Schnittstelle, die mtDNA-Haplotypen 3 und 4 durch zwei variable Schnittstellen.

Den größten Unterschied zeigte der mtDNA-Haplotyp 2, da dieser in drei Schnittstellen vom Typ 5 abwich (Tabelle III.1., III.2.a. und III.4.).

Der mtDNA-Haplotyp 5 war bei insgesamt 19 Individuen am häufigsten vertreten, gefolgt vom Typ 1 mit 12 und Typ 6 mit 11 Tieren. Die Haplotypen 3 und 4 konnten bei je einer Gemse gefunden werden (Abbildung III.1.).

Der Standard-mtDNA-Haplotyp 5 wies die weiteste Verbreitung auf, da er in allen untersuchten Populationen gefunden wurde, und der zweithäufigste Typ 1 war in drei von fünf Populationen (Slowenien, Schweiz und Italien) vertreten (Tabelle III.3.a.).

Die mtDNA-Haplotypen 4 und 6 waren hingegen nur in der untersuchten Population in

Graubünden zu finden, wie auch die Typen 2 und 3 nur bei den Gamsen in Slowenien auftraten. Es dürfte sich somit bei diesen mtDNA-Haplotypen um lokal beschränkte Differenzierungen der mitochondrialen DNA handeln.

Im Gegensatz dazu wurden im Rahmen einer Großstudie an Feldhasen (*Lepus europaeus*) sieben verschiedene mtDNA-Haplotypen gefunden, wobei in allen untersuchten Populationen derselbe Standardtyp vorherrschend war. Die übrigen Haplotypen unterschieden sich in jeweils nur einer Schnittstelle und waren auf die Herkunftsgebiete der untersuchten Hasen beschränkt (Hartl et al., 1993).

Auffallend war, daß die drei Populationen aus Kamnik, Triglav und Maribor in Slowenien bezüglich der dort gefundenen mtDNA-Haplotypen sehr polymorph waren. Bei den 18 untersuchten Gamsen traten einerseits insgesamt fünf Haplotypen auf, andererseits waren in jedem Gebiet mindestens zwei dieser Haplotypen zu finden; darunter befand sich immer der Haplotyp 1 (Tabelle III.3.a.).

Gebiet	Kamnik	Triglav	Maribor
mtDNA-Haplotyp	1, 2, 5	1, 2*	1, 2, 3, 5

Tabelle IV.1.: Gefundene mtDNA-Haplotypen der untersuchten Gamsen in den drei Gebieten in Slowenien

Gründe für diese hohe Variabilität der mitochondrialen DNA bei den Gamsen aus Slowenien könnten einerseits postglaciale Einwanderungen in dieses Gebiet aus verschiedenen Regionen Südost-Europas (Refugialräume) sein; andererseits wären die Folgen eines genetischen Flaschenhalses ("Bottleneck-Effect") eine mögliche Erklärung. Auch gibt es die Überlegung, daß der Gamsbestand in diesem Gebiet sehr stark dezimiert wurde, sodaß Wiedereinbürgerungen aus anderen Populationen notwendig waren. Nicht zuletzt gilt es die Frage zu klären, wie groß das Ausmaß der Isolierung von Gamspopulationen auf den jeweiligen Gebirgsstöcken ist und ob Gamsen diese Regionen verlassen, um Täler zu durchwandern.

Betrachtet man die geographische Verteilung der gefundenen mtDNA-Haplotypen in den untersuchten Populationen von *R. rupicapra rupicapra* so zeigte sich, daß es sich bei den Haplotypen 1 und 5 möglicherweise um basale Typen der Haplotypen 2, 3, 4 und 6 handeln könnte, da diese beiden Typen in fast jeder Population zu finden waren (vgl. Tabelle III.3.a.).

Bei der untersuchten Gams aus der Hohen Tatra, die der vermuteten Subspezies *R. r. tatrica* angehört, wurde der Standard-mtDNA-Haplotyp 5 gefunden. Dies läßt zum einen den Schluß zu, daß die Population in der Hohen Tatra mit den Vertretern von *R. r. rupicapra* mindestens einen Haplotyp gemeinsam hat. Zum anderen bestätigt dieser Befund die Vermutung, daß es sich bei dem Typ 5 tatsächlich um einen basalen Haplotyp von *R. rupicapra* handeln könnte. Allerdings spricht dieser Befund nicht für den Subspeziesstatus von *R. r. tatrica*.

Das phylogeographische Muster in Abbildung IV.1. gibt die geographische Lokalisation der

gefundenen mtDNA-Haplotypen wieder, läßt aber noch keinen Schluß darüber zu, wie sich die Haplotypen voneinander abgeleitet beziehungsweise entwickelt haben. Dieser Aspekt ist auch in den beiden Maximum-Parsimony-Netzwerken (Abbildung III.4.a. und 4.b.) berücksichtigt. Das Ergebnis dieser Methode weist auf möglicherweise vorhandenen Haplotypen hin, die in dieser Untersuchung nicht gefundenen werden konnten. Vermutlich können diese fehlenden Typen einerseits bei Vertretern von *R. r. rupicapra* in den österreichischen Voralpen, oder andererseits bei Tieren der Subspezies *R. r. tatrica*, *R. r. balcanica* oder *R. r. carpatica* gefunden werden. Weiters besteht auch die Möglichkeit, daß einige dieser "fehlenden" Haplotypen bereits ausgestorben sind. Weiterführende Untersuchungen innerhalb von *Rupicapra rupicapra* können auch Aufschluß über die eiszeitlichen Migrationsbewegungen der Gamsen geben.

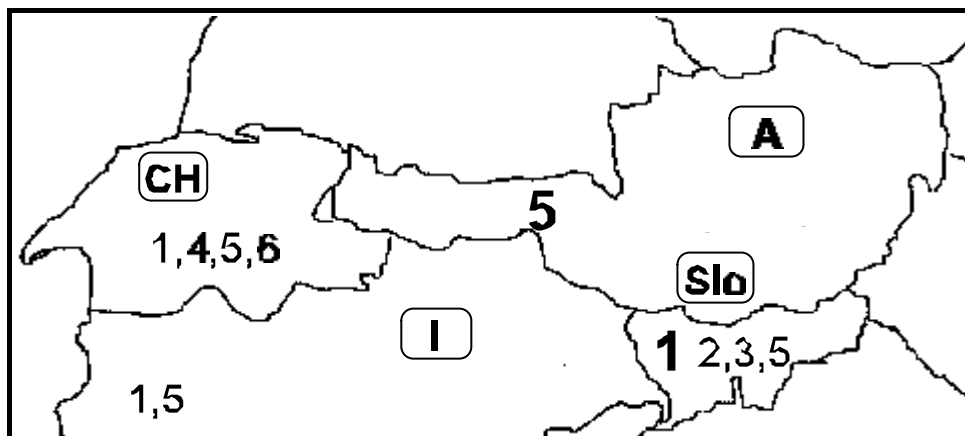


Abbildung IV.1.: Vorläufiges phylogeographisches Muster der gefundenen mtDNA-Haplotypen bei *R. rupicapra rupicapra* ausgehend vom Standard-mtDNA-Haplotyp 5; 1 bis 6 mtDNA-Haplotypen; A Österreich, CH Schweiz, I Italien, Slo Slowenien

Die Beziehungen zwischen den gefundenen mtDNA-Haplotypen der untersuchten Gamsen werden von einem Medianen Graphen nach Bandelt (1992) am besten wiedergegeben (Abbildung IV.2.). Die Querstriche entlang des Graphen geben - ähnlich wie bei einem Maximum-Parsimony-Netzwerken - den Verlust oder das Auftreten einer Schnittstelle eines Restriktionsenzym an. Der Mediane Graph enthält Verzweigungspunkte, die möglicherweise "fehlende" mtDNA-Haplotypen darstellen (siehe oben).

Weiters deutet dieser Graph an, daß es für die Entwicklung eines mtDNA-Haplotyps mehrere Möglichkeiten geben kann, die entweder geradlinig oder über einen oder sogar mehrere Haplotypen stattgefunden hat. Diesem Graphen ist ebenfalls deutlich zu entnehmen, daß die beiden mtDNA-Haplotypen 1 und 5 eine sehr zentrale Position innehaben. Nicht zuletzt geht daraus das hohe Ausmaß der Differenzierung der mitochondrialen DNA zwischen *R. rupicapra* und *R. pyrenaica* hervor, auf das in IV.3. näher eingegangen wird.

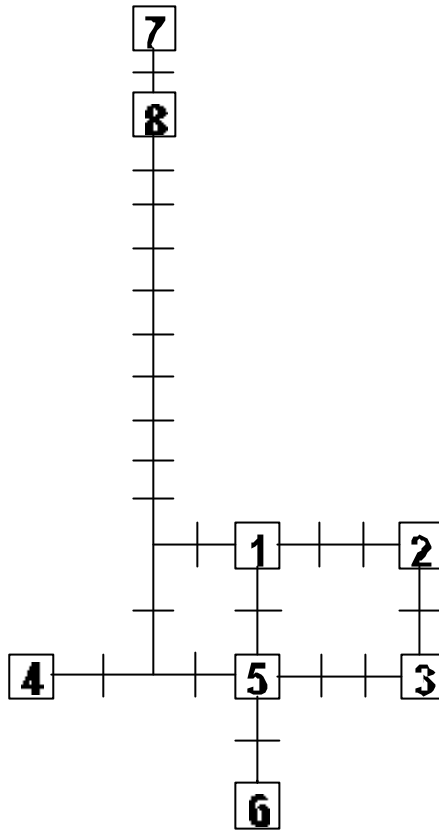


Abbildung IV.2.: Medianer Graph nach Bandelt (1992) der gefundenen mtDNA-Haplotypen 1 bis 8 der untersuchten Gamsen; Querstriche entlang des Graphes geben den Verlust oder die Entstehung von Schnittstellen an; die mtDNA-Haplotypen 1 bis 6 traten nur bei *R. rupicapra* und die Typen 7 und 8 nur bei *R. pyrenaica* auf

1.2. GENETISCHE VARIABILITÄT

Die Netto-Nukleotiddiversität zwischen den untersuchten Populationen von *R. rupicapra* erstreckt sich von 0.0% (Achenkirch und Hohe Tatra) bis maximal 0.25% zwischen den Gemsen aus Graubünden und Slowenien (Tabelle IV.2.).

Die Haplotypendiversität beträgt in den Populationen aus Achenkirch und der Hohen Tatra 0%, da hier jeweils nur ein mtDNA-Haplotyp auftrat. In den Populationen aus Graubünden, Val di Susa und Slowenien war eine Haplotypendiversität von 51.6% bis 76.1% zu finden. Im Gegensatz dazu wurde beim europäischen Rothirsch (*Cervus elaphus*) in einer Studie von Hartl et al. (1995) gefunden, daß die lokalen untersuchten Populationen meist monomorph für einen Haplotyp waren.

Die Nukleotiddiversität zwischen den mtDNA-Haplotypen aller untersuchter Individuen von *R. rupicapra* beträgt 0.18% (Tabelle III.9.a.). Die Nukleotiddiversität ist ein Maß für die Häufigkeit und die Genetische Divergenz der gefundenen mtDNA-Haplotypen. Daher spiegelt sich eine hohe Haplotypendiversität nicht immer in einer hohen Nukleotiddiversität wieder (Tabelle IV.2.). So beträgt z.B. die Haplotypendiversität in Slowenien zwar 76.1%, die Nukleotiddiversität hingegen nur 0.01%, da die gefundenen mtDNA-Haplotypen kaum voneinander differierten und einige auf diese Population beschränkt waren (Tabelle III.3.a.).

Die inter-Netto-Nukleotiddiversität - jene ND_{net} zwischen den untersuchten Gemenpopulationen - ist höher als die intra-Nukleotiddiversität - jene ND innerhalb jeder untersuchten Population. Begründet wird dieser Befund mit der Beobachtung, daß sich die mtDNA-Haplotypen zwischen Populationen stärker voneinander unterschieden, als innerhalb der Population.

Netto-Nukleotiddiversität						HD	ND
	CH	A	I	SLO	SK		
CH	-	0.10	0.17	0.25	0.10	51.6	0.01
A		-	0.08	0.15	0.00	0.0	0.00
I			-	0.12	0.08	53.5	0.01
SLO				-	0.15	76.1	0.01
SK					-	0.0	0.00

Tabelle IV.2.: Netto-Nukleotiddiversität zwischen den untersuchten Populationen von *R. rupicapra*; Haplotypendiversität (HD) und Nukleotiddiversität (ND) innerhalb der untersuchten Populationen von *R. rupicapra* in Prozent; CH Schweiz (Graubünden), A Österreich (Achenkirch), I Italien (Val di Susa), SLO Slowenien, SK Slowakei (Hohe Tatra)

Ein Vergleich der Nukleotid- und Haplotypendiversität (Tabelle III.9.b. und IV.2.) der untersuchten Populationen von *R. rupicapra* mit dem bei Alloenzymuntersuchungen gefundenen durchschnittlichen Heterozygotie- und Polymorphiegrad ist der Tabelle IV.3. zu

entnehmen. In dieser Gegenüberstellung findet man, daß die Kern-DNA bezüglich der untersuchten Alloenzyme eine geringere Variabilität innerhalb einer Population als die mtDNA aufweist. Die untersuchte Population von *R. r. rupicapra* in Achenkirch ist davon ausgenommen, da diese sowohl monomorph für einen mtDNA-Haplotyp (5) war, als auch eine geringe Heterozygotie- und Polymorphierate aufwies. Dies könnte auf eine lokale genetische Verarmung zurückzuführen sein.

In Slowenien war zu beobachten, daß die Variabilität der Alloenzyme mit den Werten $i H = 0.8\%$ und $i P = 2.6\%$ deutlich geringer ist als jene von anderen untersuchten Populationen (z.B. in Bayern oder Baden). Demgegenüber steht in diesem Fall eine sehr hohe Haplotypendiversität von 76.1%, da in Slowenien von den insgesamt sieben bei *R. r. rupicapra* gefundenen mtDNA-Haplotypen fünf vertreten waren. Eine mögliche Erklärung könnte sein, daß in Populationen die Tendenz vorhanden ist, eine erhöhte Polymorphie für verwandte Haplotypen auszubilden. Auch stimmt das Differenzierungsmuster der seltenen Haplotypen mit den Unterschieden in deren Frequenzen (vgl. Tabelle III.3.b.) in einem gewissen Ausmaß überein. Dennoch muß berücksichtigt werden, daß die beiden Systeme (Alloenzymuntersuchungen und RFLP-Analyse der mitochondrialen DNA) nicht unbedingt miteinander korreliert sind.

Herkunftsgebiet		$i H$	$i P$	n	R	HD	ND	n	R
<i>R. r. rupicapra</i>	Bayern, D	4.6	17.0	55	1				
	Kals, A	3.1	16.7	45	2				
	Südtirol, I	3.4	14.3	18	2				
	Lombardei, I	5.3	-	14	3				
	Baden, A	6.5	9.7	7	1				
	Murau, A	2.9	12.8	11	2				
	Achenkirch, A	2.8	9.5	59	4	0.0	0.182	8	5
	Slowenien, Slo	0.8	2.6	95	5	76.1		18	5
	Graubünden, CH					51.6		16	5
	Val di Susa, I					53.5		6	5
Nationalpark Hohe Tatra, SK					0.0	1		5	
<i>R. r. cartusiana</i>	Chartreuse, F	5.0	-	7	3				

Tabelle IV.3.: Genetische Variabilität bei Populationen von *R. r. rupicapra*, *R. r. cartusiana* und *R. r. tatraica*; $i H$ Durchschnittlicher Heterozygotiegrad, $i P$ Durchschnittlicher Polymorphiegrad; n Stichprobenumfang; R Referenz; HD Haplotypendiversität; ND Nukleotiddiversität; Angaben in Prozent; A Österreich, CH Schweiz, D Deutschland, F Frankreich, I Italien, Slo Slowenien, SK Slowakei; 1) Miller & Hartl (1986), 2) Miller & Hartl (1987), 3) Pemberton et al. (1989), 4) Rubin (1992), 5) Hammer (vorliegende Arbeit)

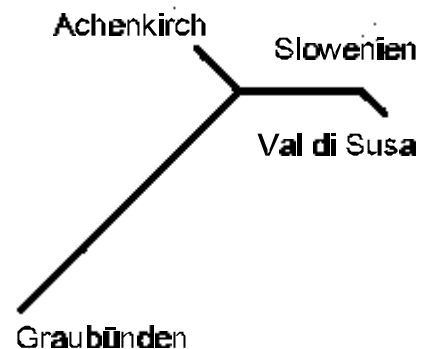
1.3. GENETISCHE DIVERGENZ

Die Genetische Distanz (Nei & Li, 1979) zwischen den gefundenen mtDNA-Haplotypen von *R. rupicapra* reicht von 0.05% (Typ 2/3 sowie 1/5 wie auch Typ 5/6) bis 0.25% zwischen dem Typ 2 und 4 (Tabelle III.5.a.). Die beiden als basale Haplotypen vermutete mtDNA-Haplotypen 1 und 5 weisen mit 0.05% die geringste Distanz auf. Bei den Typen 5 und 6 wurde der gleiche Wert ermittelt, zwischen Typ 1 und 6 wurde jedoch eine Distanz von 0.1% beobachtet. Jene beiden Haplotypen, die bei nur einem Individuum gefunden wurden (Typ 3 und 4) zeigten zu Typ 1, 5 und 6 eine Distanz von 0.1 oder 0.15%.

Die paarweise Genetische Distanz (Nei, 1972) zwischen den Populationen von *R. rupicapra* reicht von 0.0% (Achenkirch und Hohe Tatra) bis 1.64% zwischen Graubünden und Val di Susa (Tabelle III.5.b.). Die Distanz zwischen der Population aus Achenkirch und jener von der Hohen Tatra von 0.0% liegt darin begründet, daß einerseits die beiden Populationen monomorph für denselben mtDNA-Haplotyp waren, und andererseits von der Hohen Tatra nur eine Gemse untersucht werden konnte.

Die beiden Populationen mit der höchsten Haplotypendiversität, Graubünden und Slowenien, zeigen mit 1.61% auch eine hohe paarweise Genetische Distanz. Daraus geht zum einen eine Trennung der Populationen am Nordrand des Alpen-hauptkammes von jenen südlich davon hervor. Zum anderen scheint die Population in Graubünden, im Vergleich zu den übrigen, genetisch am stärksten isoliert zu sein (siehe Abbildung IV.1. und IV.3.).

Abbildung IV.3.: Fitch-Margoliash Unrooted Network der untersuchten Populationen von *R. rupicapra rupicapra* basierend auf den Genetischen Distanzen nach Nei (1972); Distanz zwischen Val di Susa und Slowenien: $D = 0.116$



In einer Studie von Miller & Hartl (1987) wurde die Genetische Divergenz innerhalb von vier Populationen von *R. r. rupicapra* mittels Enzymelektrophorese untersucht. Es wurden die in Tabelle IV.4. angeführten Genetischen Distanzen (Nei, 1972 oder 1978) ermittelt. Die Population aus Bayern lebt autochthon am nördlichen Verbreitungsrand von *R. r. rupicapra*, jene aus Süd- und Osttirol bilden einen zentralen Bestandteil der alpinen Gemsenbestände. Die Gemsen des niederösterreichischen Triestingtales stehen mit den autochthonen Tieren des Rax- und Schneeberggebiets in Verbindung.

	Bay	NÖ	St	Ot
Bay	-			
NÖ	0.0045	-		
St	0.0149	0.0129	-	
Ot	0.0031	0.0062	0.0169	-

Tabelle IV.4.: Genetische Distanzen (Nei, 1972 oder 1978) von vier alpinen Populationen von *R. r. rupicapra* vereinfacht nach Miller & Hartl (1987); Bay Bayern, NÖ Niederösterreich, St Südtirol, Ot Osttirol

Die Divergenzzeiten wurden zwischen den gefundenen mtDNA-Haplotypen von *R. rupicapra* berechnet (Wilson et al., 1985) und reichen von 25 000 bis 125 000 Jahren. Die beiden am häufigsten beobachteten mtDNA-Haplotypen 1 und 5 weisen mit 25 000 Jahren die geringste Divergenzzeit auf. Die höchste Divergenzzeit wurde zwischen den Typen 2 und 4 beobachtet, wobei der Typ 2 bei vier und der Typ 4 nur bei einem Tier beobachtet wurden. Jene mtDNA-Haplotypen, die nur durch ein Individuum vertreten waren (Typ 3 und 4), trennen 100 000 Jahre. Diese geschätzten Zeiträume stehen im Einklang mit den paläontologischen Gamsenfunden aus dem Riß- und Würmglacial (vgl. Tabelle I.2.).

1.4. ZUSAMMENFASSUNG

- U Bei den untersuchten Gamsen von *Rupicapra rupicapra* konnte genetische Variabilität und Differenzierung der mitochondrialen DNA beobachtet werden.
- U Innerhalb der untersuchten Populationen von *R. r. rupicapra* wurde sowohl eine hohe (z.B. Graubünden und Slowenien) wie auch sehr geringe Variabilität (in Achenkirch) der mtDNA festgestellt.
- U In Slowenien wurde einerseits eine sehr geringe Variabilität der untersuchten Alloenzyme und andererseits eine hohe Haplotypendiversität der mtDNA beobachtet.
- U Die genetische Differenzierung zwischen den untersuchten Populationen von *R. r. rupicapra* ist jedoch gering, da nur zwei Populationen monomorph für jeweils einen exklusiven mtDNA-Haplotyp waren. Die übrigen Populationen weisen hingegen hohe Haplotypendiversitäten auf.
- U Die Frage der Differenzierung zwischen den vermuteten Unterarten *R. r. rupicapra* und *R. r. tatica* konnte nicht ausreichend beantwortet werden, da von der Hohen Tatra nur ein Individuum zur Verfügung stand. Es konnte jedoch geklärt werden, daß *R. r. tatica* und *R. r. rupicapra* mindestens einen gemeinsamen mtDNA-Haplotyp aufweisen.
- U Das erhaltene phylogeographische Muster (Abbildung IV.1.) steht mit der geographische Herkunft der untersuchten Populationen von *R. rupicapra* in einem hohen

Ausmaß im Einklang. Der Mediane Graph (Abbildung IV.2.) nach Bandelt (1992) stellt die Beziehungen zwischen den gefundenen mtDNA-Haplotypen der untersuchten Gemen dar.

- U** Für eine umfangreichere Aufklärung der mtDNA-Differenzierung bei *Rupicapra rupicapra* ist es notwendig, zusätzliche Proben sowohl aus dem Verbreitungsgebiet von *R. r. rupicapra* als auch von anderen Subspezies (z.B. *R. r. tatrica*, *R. r. balcanica*, *R. r. caucasica*) zu erhalten. Dies gestaltet sich jedoch schwierig, da einerseits einige Subspezies ausschließlich in Nationalparks zu finden sind, und andererseits Herkunftsgebiete von Gemen (z.B. *R. r. balcanica*, *R. r. caucasica* oder *R. r. asiatica*) aufgrund politischer Ereignisse schwer zugänglich sind.

2. GENETISCHE DIFFERENZIERUNG BEI *R. PYRENAICA*

Für die Untersuchung der mtDNA-Differenzierung bei *Rupicapra pyrenaica* standen insgesamt nur 10 Individuen zur Verfügung. Diese Tiere stammen aus einer Population in Katalonien und wurden von Masini & Lovari (1988) als Subspezies *R. pyrenaica pyrenaica* klassifiziert (siehe I.3.1.). Innerhalb der 10 untersuchten Gemen wurden zwei mtDNA-Haplotypen gefunden, die sich in lediglich einer Schnittstelle eines Restriktionsenzymys voneinander unterschieden. Diese beiden mtDNA-Haplotypen traten ausschließlich bei den aus den Pyrenäen stammenden Gemen auf.

	Haplotypen-diversität	Genetische Divergenz	Divergenzzeit	Nukleotid-diversität
<i>R. pyrenaica pyrenaica</i>	35.6%	0.05%	85 000 J.	0.04%

Tabelle IV.5.: Haplotypendiversität (Nei & Tajima, 1981), Genetische Distanz (Nei & Li, 1979), Divergenzzeit (Wilson et al., 1985) und Nukleotiddiversität (Nei & Li, 1979; Nei & Tajima, 1981; Tiedemann, 1994) bei *R. pyrenaica pyrenaica*

Um genauere Aussagen bezüglich der genetischen Variabilität und Differenzierung der mitochondrialen DNA innerhalb *R. pyrenaica* treffen zu können, müssen Individuen aus den italienischen Abruzzen (*R. pyrenaica ornata*) und Nordspanien (*R. pyrenaica parva*) bezüglich ihrer RFLP-Muster untersucht werden. Beide Populationen dieser Subspezies sind bereits zahlenmäßig sehr stark dezimiert (350 und 6000 Individuen), sodaß sich diese in einem Nationalpark befinden und daher nicht bejagt werden dürfen. Künftige Untersuchungen werden aus diesem Grund mit Haar- oder Blutproben durchgeführt werden müssen.

3. GENETISCHE DIFFERENZIERUNG ZWISCHEN *R. RUPICAPRA* UND *R. PYRENAICA*

3.1. RFLP-ANALYSE DER GESAMTEN MtDNA

Die ermittelten Netto-Nukleotiddiversitäten (beruhend auf den mtDNA-Haplotypen) zwischen *R. p. pyrenaica* und *R. rupicapra* wie auch zwischen *R. p. pyrenaica* und den lokalen Populationen von *R. rupicapra* sind in Tabelle IV.6. angeführt. Die ND_{net} von 1.13 bis 1.33% zwischen den alpinen Gemsen (*R. rupicapra*) und den Gemsen aus Spanien (*R. p. pyrenaica*) könnte auf eine stattgefundene Speziation hinweisen. Avise et al. (1987) und Wilson et al. (1985) gehen davon aus, daß eine ND_{net} von $\geq 0.5\%$ ausreicht, um junge maternale Linien voneinander trennen zu können. Diese maternalen Linien müssen allerdings nicht unbedingt verschiedene Arten sein.

Da die Nukleotiddiversität berücksichtigt, wieviele Haplotypen vorhanden sind und wie unterschiedlich diese zueinander sind, muß eine hohe Haplotypendiversität nicht unbedingt eine hohe Nukleotiddiversität zur Folge haben. Zwischen den mtDNA-Haplotypen der Gemsen aus Achenkirch und den Gemsen aus Spanien wurde eine $ND_{net} = 1.23\%$ berechnet; die Haplotypendiversität betrug jedoch 0%, da nur ein mtDNA-Haplotyp gefunden wurde. Anders verhält es sich zwischen den Gemsen aus Slowenien und jenen aus Spanien. Hier beträgt die Netto-Nukleotiddiversität 1.22% und die Haplotypendiversität 76.1%, da in Slowenien zwar fünf verschiedene mtDNA-Haplotypen gefunden wurden, diese jedoch nicht sehr stark voneinander differieren (vgl. IV.1.2. und Tabelle IV.2.)

<i>Rupicapra rupicapra</i>					
	Graubünden	Achenkirch	Val di Susa	Slowenien	Hohe Tatra
<i>Rupicapra p. pyrenaica</i>	1.33 (51.6)	1.23 (0)	1.13 (53.5)	1.22 (76.1)	1.23 (0)
			1.14 (66.5)		

Tabelle IV.6.: Netto-Nukleotiddiversität und Haplotypendiversität (in Klammer) zwischen den untersuchten Populationen von *Rupicapra rupicapra* und *R. p. pyrenaica* in Prozent

Aus Tabelle IV.7. geht hervor, daß die berechneten Genetischen Distanzen von 0.50 bis 0.71% durchaus mit anderen Zahlenwerten konform gehen, die zwischen verschiedenen Großsäugetieren der gleichen Art ermittelt wurden. So reicht die Genetische Distanz zwischen Rothirsch und Damhirsch von 0.55 bis 0.63% (Nadlinger, 1994) und jene zwischen zwei Hausrindarten beträgt 0.7%. Es können aber bei Großsäugern auch höhere Werte gefunden werden, wie z.B. zwischen den beiden Cerviden-Arten *Cervus elaphus* und *Cervus unicolor* ($D = 4.24\%$, Cronin, 1991). Bei Kleinsäugetieren hingegen sind auf Artniveau generell höhere Divergenzen zu beobachten, wie zwischen den beiden Hasenarten *Lepus europaeus* und *Lepus timidus*, die eine Genetische Divergenz von 2.5% aufweisen (Nadlinger, 1994).

Art bzw. Gattung		D	Referenz
Art	<i>R. r. rupicapra/R. p. pyrenaica</i>	0.50-0.71	5
	<i>Cervus elaphus/Cervus dama</i>	0.55-0.63	2
	<i>Cervus elaphus/Cervus unicolor</i>	4.24	1
	<i>Bos prim. f. taurus/Bos prim. f. indicus</i>	0.7	2
	<i>Lepus europaeus/Lepus timidus</i>	2.5	2
	<i>Ursus arctos/Ursus maritimus</i>	0.84	3
	<i>Equus b. antiquorum/Equus grevyi</i>	0.828	4
	<i>Equus h. onager/Equus przewalskii</i>	0.656	4
	<i>Odocoileus virginianus/Odocoileus h. h.</i>	0.27	1
Gattung	<i>Lepus europaeus/Oryctolagus cuniculus</i>	5	2
	<i>Bison bonasus/Bos taurus</i>	1.1-1.45	2
	<i>Capreolus capreolus/Alces alces</i>	11.04	1

Tabelle IV.7.: Genetische Distanz (Nei & Li, 1979) der mtDNA zwischen Arten und Gattungen in Prozent; 1) Cronin (1991), 2) Nadlinger (1994), 3) Shields & Kocher (1991), 4) George & Ryder (1986), 5) Hammer et al. (1995)

(Unter-)art	n	D	Referenz
<i>Capra i. ibex/Capra i. nubia</i>	149/39	0.093	1
<i>Capra i. ibex/Capra pyrenaica</i>	3/20	0.023	3
<i>Capra aegagrus/Capra i. ibex</i>	43/115	0.228	4
/ <i>Capra i. ibex</i>	40/40	0.110	5
/ <i>Capra i. nubiana</i>	2/1	0.129	2
/ <i>Capra falconeri</i>	2/2	0.124	2
<i>Capra falconeri/Capra i. ibex</i>	2/1	0.173	2
/ <i>Capra i. nubiana</i>	2/1	0.173	2
<i>Capra i. ibex/R. r. rupicapra</i>	46/136	0.247	8
<i>R. r. rupicapra/R. p. pyrenaica</i>	43/25	0.096	6
/ <i>R. p. ornata</i>	43/18	0.121	6
/ <i>R. p. cartusiana</i>	32/7	0.013	7
<i>R. p. pyrenaica/R. p. ornata</i>	25/18	0.009	6

Tabelle IV.8.: Genetische Distanz (Nei 1972 oder 1978) bei Caprini und Rupicaprini; n Stichprobenumfang; 1) Stüwe et al. (1972), 2) Hartl et al. (1990), 3) Hartl et al. (1992), 4) Nascetti et al. (1987), 5) Randi et al. (1990), 6) Nascetti et al. (1985), 7) Pemberton et al. (1989), 8) Hartl (1986)

Untersuchungen der Populationsvariabilität und Differenzierung bei *Rupicapra rupicapra* und *Rupicapra pyrenaica* mittels Enzymelektrophorese unterstützen die von Nascetti et al. (1985), Masini & Lovari (1988) und Lovari (1985) entwickelte Klassifikation.

Zwischen *R. r. rupicapra* und *R. p. pyrenaica* beziehungsweise *R. p. ornata* wurde eine Genetische Distanz (Nei, 1972 oder 1978) von 0.096 und 0.121 ermittelt (Tabelle IV.8.). Diese Genetischen Distanzen werden als zusätzliches Argument für den Artstatus von *Rupicapra pyrenaica* gewertet (Masini & Lovari, 1988).

Im Vergleich dazu würde die Genetische Distanz von 0.013 zwischen *R. r. rupicapra* und *R. r. cartusiana* (Pemberton et al., 1989) beziehungsweise von 0.009 zwischen *R. p. pyrenaica* und *R. p. ornata* (Nascetti et al., 1985) für den jeweiligen Status als separate Unterart sprechen.

Aus Tabelle IV.8. ist weiters ersichtlich, daß es irreführend sein kann, als Grundlage für die Klassifikation von Arten und Unterarten lediglich die Genetische Distanz heranzuziehen. Zwischen *R. r. rupicapra* und *R. p. pyrenaica* beträgt die Genetische Distanz 0.096 wie auch zwischen *Capra i. ibex* und *Capra i. nubiana* ($D = 0.093$). Im ersten Fall handelt es sich um zwei Arten, im zweiten hingegen um zwei Unterarten. Gleiches gilt für den Vergleich von *Capra i. ibex* mit *Capra i. pyrenaica* ($D = 0.023$) und *R. r. rupicapra* mit *R. r. cartusiana* ($D = 0.013$). In beiden Fällen ist die Genetische Distanz nahezu gleich, obwohl es sich einerseits um Arten und andererseits um Unterarten handelt. Generell gilt, daß die Genetische Distanz im Bereich von 0.0 bis 0.1 von der Größe des Stichprobenumfangs massiv beeinflusst wird.

In diesem Zusammenhang muß berücksichtigt werden, daß es verschiedene Möglichkeiten gibt, eine Art zu definieren, wie auch unterschiedliche Verlaufsformen der Entstehung einer Art. In jedem Fall müssen ökologische, geographische, verhaltensbiologische, morphologische etc. Aspekte gemeinsam mit den molekularbiologischen Daten diskutiert werden.

Die Divergenzzeiten wurden aus den Distanzwerten zwischen den gefundenen mtDNA-Haplotypen bei *R. rupicapra* und *R. p. pyrenaica* geschätzt (Wilson et al., 1985) und umfassen einen Zeitraum von 275 000 bis 330 000 Jahren. Diese Divergenzzeiten sind deutlich höher als jene innerhalb von *R. rupicapra* (vgl. Tabelle III.6. und IV.1.3.) und unterstützen die Hypothese der Trennung von *Rupicapra* in zwei Gruppen während des späten oder mittleren Pleistozäns. Von Asien ausgehend kolonialisierten diese beiden Gruppen den europäischen Kontinent und begannen nach dem Ende der Eiszeit, die heute bekannten Verbreitungsgebiete zu besiedeln (siehe I.3.).

3.2. RFLP-ANALYSE DES CYTOCHROM b-GENS

Bei 16 untersuchten Gamsen aus den alpinen Regionen, aus den italienischen Abruzzen sowie von den spanischen Pyrenäen konnte eine genetische Differenzierung des Cytochrom b-Gens beobachtet werden. Die RFLP-Analyse mit 4- und 5-Basenschneidern ergab die vier Cytochrom b-Haplotypen 1 bis 4 (III.2.). Die Typen 1 und 2 waren ausschließlich auf die Vertreter von *R. rupicapra* beschränkt, Typ 3 trat nur bei *R. p. pyrenaica* und Typ 4 nur bei *R. p. ornata* auf. Daraus ergibt sich eine eindeutige Zuordnung der gefundenen Cytochrom b-Haplotypen zu den Herkunftsgebieten der untersuchten Gamsen. Weiters konnten für die Genetische Distanz und die Divergenzzeit zwischen den bei *R. rupicapra* und *R. pyrenaica* gefundenen Cytochrom b-Haplotypen ähnliche Werte ermittelt werden, wie bei der RFLP-Analyse der gesamten mitochondrialen DNA (Tabelle IV.9.).

Für eine umfangreichere Aufklärung der Differenzierung des Cytochrom b-Gens zwischen *R. rupicapra* und *R. pyrenaica* müßten weitere Vertreter von *R. pyrenaica ornata* und zusätzlich Individuen von *R. pyrenaica parva* (Nordspanien) untersucht sowie die Anzahl der Merkmale erhöht werden.

	Genetische Distanz	Divergenzzeit
<i>R. r. rupicapra/R. p. pyrenaica</i>	0.0058	290 000
<i>R. r. rupicapra/R. p. ornata</i>	0.0189	945 000
<i>R. p. pyrenaica/R. p. ornata</i>	0.0112	560 000

Tabelle IV.9.: Genetische Distanz (Nei & Li, 1979) und Divergenzzeit (Wilson et al., 1985) in Jahren zwischen den gefundenen Cytochrom b-Haplotypen von *R. r. rupicapra*, *R. p. pyrenaica* und *R. p. ornata*

Wie schon unter IV.2. erwähnt, befinden sich diese beiden Subspezies in Nationalparks, sodaß hier vermutlich nur Blut- oder Haarproben zur Verfügung stehen würden. Sequenzvergleiche z.B. der kleinen Untereinheit des Cytochrom b-Gens würden eine größere Aussagekraft bezüglich der genetischen Differenzierung ermöglichen. Bei einer Studie, auf der Basis dieser Methode, wurde zwischen Kojoten (*Canis latrans*) und Grauwölfen (*Canis lupus*) eine Genetische Divergenz von 5.3 bis 6.1% festgestellt (Wayne & Jenks, 1991).

3.3. UNTERSCHIEDE IN MORPHOLOGIE UND VERHALTEN

Die in I.3.1. vorgeschlagene taxonomische Klassifizierung innerhalb der Gattung *Rupicapra* wird zusätzlich durch morphologische, biometrische sowie verhaltensbiologische Daten (Tabelle IV.10., Abbildung IV.4.) gestützt. Betrachtet man nun diese Befunde zusammen mit jenen der molekularbiologischen Untersuchungen, so scheint es sich bei *R. pyrenaica* und *R. rupicapra* tatsächlich um zwei Arten innerhalb der Gattung *Rupicapra* zu handeln. Hier sei kurz angemerkt, daß man in Erwägung ziehen könnte, Kreuzungsversuche zwischen *R. pyrenaica* und *R. rupicapra* durchzuführen. Denn es ist nicht auszuschließen, daß sich diese Vertreter dieser beiden Gruppen aufgrund der verhaltensbiologischen Unterschiede nicht mehr paaren können (vgl. Lovari, 1985; Tabelle IV.10.). Würde dieser Fall zutreffen, so wäre dies ein konkreter Aspekt, der für einen separaten Artstatus spricht.

	<i>R. pyrenaica</i>	<i>R. rupicapra</i>	Ref
Craniometrics			
Ethmoidal vacuity	always absent	Usually present	1
Distance between horns and base	smaller	larger	
Skull length	smaller	larger	
Skull width (parietals)	smaller	larger	
Angle horn cores/ frontal bones	greater ⁺	smaller	2
Behaviour			
	conflict posture	conflict posture absent	3
	3 courtship patterns	2 courtship patterns	
	- dynamic headdown	- herding	
	- flank stroke	- kick	
	- mock suck		
Morphology			
	winter coat pattern with five large and one small spot	winter coat pattern with three small spots	3

Tabelle IV.10.: Unterscheidungsmerkmale zwischen *R. pyrenaica* und *R. rupicapra* modifiziert nach Masini & Lovari (1988); ⁺ nur für *R. p. ornata* ermittelt; Ref Referenz; 1) Lovari & Scala (1980), 2) Fondi, Lovari & Scala (nicht publiziert), 3) Lovari (1985)

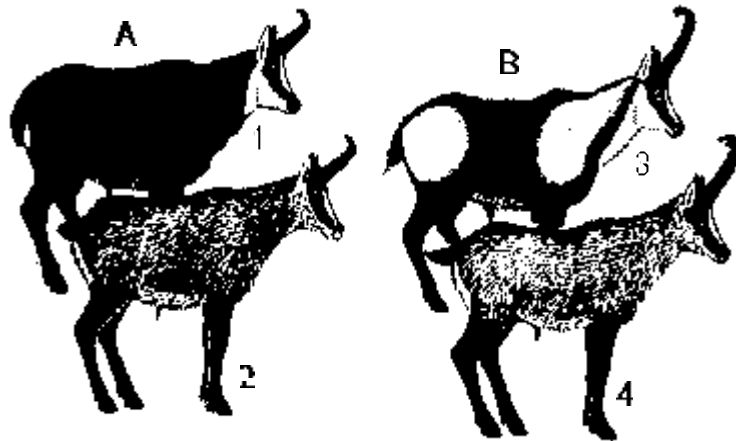


Abbildung IV.4.: Unterschiedliche Zeichnung der Winter- und Sommerdecke bei *Rupicapra rupicapra* und *Rupicapra pyrenaica* nach Lovari (1987); (A) *Rupicapra r. rupicapra*; (B) *Rupicapra p. ornata*; 1 und 3 Winterdecke; 2 und 4 Sommerdecke; *R. pyrenaica* ssp. haben eine rötliche, *R. rupicapra* ssp. eine bräunliche Decke

3.4. ZUSAMMENFASSUNG

- U Zwischen *R. rupicapra* und *R. p. pyrenaica* konnte genetische Variabilität und Differenzierung der gesamten mtDNA wie auch des Cytochrom b-Gens beobachtet werden.
- U Bei der RFLP-Analyse der Gesamt-mtDNA wie auch des Cytochrom b-Gens wurden jeweils mtDNA-Haplotypen gefunden, die entweder nur innerhalb der alpinen Populationen oder der Population aus Katalonien vertreten waren.
- U Die Genetische Divergenz der Gesamt-mtDNA reicht von 0.50 bis 0.71% und wird in der Literatur auch bei anderen Großsäugetierarten gefunden.
- U Die Genetische Divergenz der RFLP-Analyse des Cytochrom b-Gens ergab zwischen den alpinen Gemsen und jenen aus Spanien 0.58%.
- U Die Netto-Nukleotiddiversität zwischen *R. rupicapra* und *R. p. pyrenaica* beträgt aufgrund der RFLP-Analyse der kompletten mtDNA 1.14%; jene zwischen den untersuchten lokalen Populationen von *R. rupicapra* und den Gemsen aus Katalonien umfaßt den Bereich von 1.13 bis 1.33%.
- U Die Divergenzzeit von 275 000 bis 330 000 Jahren, die sowohl bei der RFLP-Analyse der gesamten mtDNA wie auch bei jener des Cytochrom b-Gens errechnet wurde, ist ein weiterer Befund für das Modell der beiden getrennten Einwanderungslinien von *Rupicapra* aus Asien nach Europa während des Pleistozäns.
- U Für eine umfangreichere Aufklärung der genetischen Variabilität und Differenzierung

zwischen *R. rupicapra* und *R. p. pyrenaica* sind zusätzliche Proben von Individuen der vermuteten Subspezies *R. pyrenaica ornata* und *R. pyrenaica parva* notwendig.

- U** Aufgrund der von Masini und Lovari beobachteten Unterscheidungsmerkmale bei *R. pyrenaica* und *R. rupicapra* bezüglich Morphologie, Verhalten und craniometrischen Daten (Tabelle IV.10. und Abbildung IV.4.) können *R. rupicapra* und *R. pyrenaica* als zwei verschiedene Arten betrachtet werden.

V. ANHANG

1. ABKÜRZUNGEN

SI-Einheiten sind in dieser Auflistung nicht angeführt.

A	Adenin, Österreich
A.dest.	zweifach destilliertes Wasser (Aqua dest.)
bp (kb)	Basenpaare (Kilobasenpaare)
C	Cytosin
CaCl	Calciumchlorid
CH	Schweiz
Cyt b	Cytochrom b
CsCl	Caesiumchlorid
D	Deutschland
dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Deoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Deoxyguanosin-5'-triphosphat
D-Loop	Displacement-Loop
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxynukleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig, Doppelstrang
E	Spanien
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Frankreich
f.	facies
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid reduzierte Form
G	Guanin
HCl	Hydrochloridsäure
I	Italien
IUCN	International Union for Conservation of Nature
K ₂ HPO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mt	mitochondrial(e)
n	Nukleotid (A, C, G oder T), Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid

NADH	Nicotinamidadenindinukleotid reduzierte Form
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCR	Polymerasekettenreaktion
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Dodecylsulfat-Natriumsalz
SK	Slowakei
SLO	Slowenien
sspp.	Subspezies (Mehrzahl)
T	Thymin
T _A	Annealing-Temperatur
T _m	Schmelztemperatur
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TTP	Thymin-5'-triphosphat
U	Unit
UV	Ultraviolett

Abkürzungen für Aminosäuren	3-Buchstabencode
-----------------------------	------------------

Alanin	Ala
Arginin	Arg
Asparagin	Asn
Asparaginsäure	Asp
Asparagin o. Asparaginsäure	Asx
Cystein	Cys
Glutamin	Gln
Glutaminsäure	Glu
Glutamin o. Glutaminsäure	Glx
Glycin	Gly
Histidin	His
Isoleucin	Ile
Leucin	Leu
Lysin	Lys
Methionin	Met
Phenylalanin	Phe
Prolin	Pro
Serin	Ser
Threonin	Thr
Tryptophan	Trp
Tyrosin	Tyr
Valin	Val

2. LITERATURVERZEICHNIS

- AAIJ, C. and BORST, P. (1971) The gel electrophoresis of DNA. *Biochem.Biophys.Acta.* 269:192-200.
- ALLENDORF, F.W., MITCHELL, N., RYMAN, N. and STAHL, G. (1977) Isoenzyme loci in Brown trout (*Salmo trutta* L.): Detection and interpretation from population data. *Hereditas.* 86:179-190.
- ANDERSON, S., BANKIER, A.T., BARRELL, B.G., DE BRUIJN, M.H.L., COULSON, A.R., DROUIN, J., EPERON, I.C., NIERLICH, D.P., ROE, B.A., SANGER, F., SCHREIBER, P., SMITH, A.H.J., STADEN, R. and YOUNG, I.G. (1981) Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290:457-465.
- AVISE, J.C. and LANSMAN, R. (1983) Polymorphism of mitochondrial DNA of island and mainland harvest mice *Reithrodontomys megalotis*. *Journal of Mammalogy.* 70:383-386.
- AVISE, J.C., ARNOLD, J., BALL, R.M., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J.E., REEB, C.A. and SAUNDERS, N.C. (1987) Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann.Rev.Ecol.Syst.* 18:489-522.
- AVISE, J.C. (1991) Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annu.Rev.Genet.* 25:45-69.
- AVISE, J.C. (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution.* Chapman & Hall, Inc., London.
- AYALA, F.J. (1977) The genic structure of populations. In: *Evolution* (eds. DOBZHANSKY, T., AYALA, F.J., STEBBINS, G.L., VALANTINE, J.W.). San Francisco: W.H. Freeman. pp.20-56.
- AYALA, F.J. (1982) Genetic variation in natural populations: Problem of electrophoretically cryptic alleles. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 79:550-554.
- BAKER, C.S., PALUMBI, S.R., LAMBERTSEN, R.H., WEINRICH, M.T. CALAMBOKIDIS, J. and O'BRIEN, S.J. (1990) Influence of seasonal migration on geographic distributions of mitochondrial DNA haplotypes in humpback whales. *Nature.* 344:238-240.
- BANDELT, H.-J. (1992) Generating median graphs from Boolean matrices. In: *L₁-statistical analysis* (ed. DODGE, Y.). North-Holland, Elsevier. pp.305-309.
- BARRELL, B.G., ANDERSON, S., BANKIER, A.T., DE BRUIJN, M.H.L., CHEN, E., COULSON, A.R., DROUIN, J., EPERON, I.C., NIERLICH, D.P., ROE, B.A., SANGER, F., SCHREIBER, P., SMITH, A.H.J., STADEN, R. and YOUNG, I.G. (1980) Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 77:3164-3166.
- BIBB, M.J., VAN ETTEN, R.A., WRIGHT, C.T., WALBERH, M.W. and CLAYTON, D.A. (1981) Sequence and organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell.* 26:167-180.
- BIJU-DUVAL, C., ENNAFAA, H., DENNEBOUY, N., MONNEROT, M., MIGNOTTE, F., SORIGUER, R., EL GAAIED, A., EL HILI, A. and MOUNOLOU, J.-C. (1991) Mitochondrial DNA evolution in lagomorphs: Origin of systematic heteroplasmy and organization of diversity in European rabbits. *Journal of Molecular Evolution.* 33:92-102.
- BOWEN, B.W., MEYLAN, A.B., ROSS, J.P., LIMPUS, C.J., BALAZS, G.H. and AVISE, J.C. (1992) Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. *Evolution.* 46:865-881.

- BREWER, G.J. and SING, CH.F. (1970) An introduction to Isoenzyme Techniques. New York Academic Press.
- BROWN, W.M., GEORGE jr., M. and WILSON, A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 76:1967-1971.
- BROWN, W.M., PRAGER, E.M., WANG, A. and WILSON, A.C. (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. Journal of Molecular Evolution. 18:225-239.
- BROWN, W.M. (1983) Evolution of animals mitochondrial DNA. In: Evolution of genes and proteins. (eds. NEI, M. & KOEHN, R.K.). Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Mass. pp.63-88.
- BROWN, W.M. (1985) The mitochondrial genome of animals. In: Plenum.Molecular evolutionary genetics (ed. McINTYRE, R.J.). New York. pp. 95-130.
- CAMERANO, L. (1914) Ricerche intorno ai camosci (Parte Ia, Ila, IIIa). Memorie della Regia Acc. di Scienze di Torino (Cl. Scienze Fisiche Matematiche Naturali). 64(4):1-82, 64(12):1-88, 65(14):1-82.
- COUTURIER, M.A.J. (1938) Le Chamois. Arthaud. Grenoble.
- CRONIN, M.A. (1991) Mitochondrial-DNA phylogeny of Deer (Cervidae). Journal of Mammalogy. 72(3):533-566.
- CSAIKL, F., ENGEL, W. and SCHMIDTKE, J. (1980) On the biochemical systematics of three *Apodemus* species. Comp.Biochem.Physiol. 65B:411-414.
- DARLEY-USMAR, V.M., RICKWOOD, D. and WILSON, M.T. (1987) Mitochondria. A practical approach. Irl Press Ltd., Oxford.
- DOLAN, J.M. (1963) Beitrag zur systematischen Gliederung des Tribus Rupicaprini Simpson 1945. Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung.1:311-407.
- EDWARDS, A.W.F. and CAVALLI-SFORZA, L.L. (1963) The reconstruction of evolution. Heredity.18:553.
- EFRON, B. (1982) The jackknife, the bootstrap and other resampling plans. Society for industrial and applied mathematics. Philadelphia.
- FELSENSTEIN, J. (1993) PHYLIP - Phylogeny Inference Package, version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- FERRIS, S.D., WILSON, A.C. and BROWN, W.M. (1981) Evolutionary tree for apes and humans based on cleavage maps of mitochondrial DNA. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 78:2432-2436.
- FERRIS, S.D., SAGE, R.D., HUANG, C.-M., NIELSEN, J.T., RITTE, U. and WILSON, A.C. (1983) Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 80:2290-2294.
- FITCH, W.M. and MARGOLIASH, E. (1967) Construction of phylogenetic trees. Science. 155:279-284.
- FUCHS, R. and BLAKESLEY, R. (1983) Guide to the use of tyrell restriction endonucleases. Meth.Enzym. 100:3-39.
- GEIST, V. (1987) On the evolution of the Caprinae. In: The biology and management of *Capricornis* and

- related mountain Antelopes. (ed. SOMA, H.). Croom Helm London. pp.3-40.
- GEORGE, M.Jr. and RYDER, O.A. (1986) Mitochondrial DNA Evolution in the genus *Equus*. Mol.Biol.Evol. 3(6):535-546.
- GILES, R.E., BLANC, H., CANN, H.M. and WALLACE, D.C. (1980) Maternal inheritance of mitochondrial DNA. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 77:6715-6719.
- HAMMER, S., NADLINGER, K. and HARTL, G.B. (1995) Mitochondrial-DNA differentiation in chamois (genus *Rupicapra*): implications for taxonomy, conservation, and management. In: Ecological Genetics in Mammals II (eds. HARTL, G.B. and MARKOWSKI, J.). Acta Theriologica. Supplement 3:145-155.
- HARRIS, H. and HOPKINSON, D.A. (1976) Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. Amsterdam. North Holland.
- HARRIS, H. (1980) The principles of human biochemical genetics. Amsterdam. North Holland.
- HARTL, G.B. (1986) Steinbock und Gemse im Alpenraum - genetische Variabilität und biochemische Differenzierung zwischen den Arten. Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung. 24:315-320.
- HARTL, G.B. and HÖGER, H. (1986) Biochemical variation in purpured and crossbred strains of domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus* L.). Gent.Res. 48:27-34.
- HARTL, G.B., BURGER, H., WILLING, R. and SUCHENTRUNK, F. (1990) On the biochemical systematics of the Caprini and the Rupicaprini. Biochemical Systematics and Ecology.18:175-182.
- HARTL, G.B., MENEGUZ, P.G., APOLLONIO, M., MARCO-SANCHEZ, I., NADLINGER, K. and SUCHENTRUNK, F. (1992) Molecular systematics of ibex in western Europe. Proc. Internat. Congress on the genus *Capra* in Europe, 20.-22.10.1992, Ronda, Spain.
- HARTL, G.B., SUCHENTRUNK, F., NADLINGER, K. and WILLING, R. (1993) An integrative analysis of genetic differentiation in the brown hare (*Lepus europaeus*) based on morphology, allozymes and mitochondrial DNA. Acta Theriologica.38. Supplement 2:33-57.
- HARTL, G.B., NADLINGER, K., APOLLONIO, M., MARKOV, G., KLEIN, F., LANG, G., FINDO, S. and MARKOWSKI, J. (1995) Extensive mitochondrial-DNA differentiation among European Red deer (*Cervus elaphus* L.) populations: implications for conservation and management. Zeitschrift für Säugetierkunde. 60:41-52.
- HATEFI, Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Annu.Rev.Biochem. 54:1015-1069.
- HERRMANN, B. and HUMMEL, S. (eds.) (1994) Ancient DNA. Recovery and analysis of genetic material from paleontological, archeological, museum, medical and forensic specimens. Springer Verlag New York Inc.
- HUNTER, R.L. and MARKERT, C.L. (1957) Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science. 125:1295-1295.
- IRWIN, D.M., KOCHER, T.D. and WILSON, A.C. (1991) Evolution of the Cytochrome b Gene of Mammals. Journal of Molecular Evolution. 32:128-144.
- JOHNSON, M.J., WALLACE, D.C., FERRIS, S.D., RATTOZZI, M.C. and CAVALLI-SFORZA, L.L. (1983) Radiation of human mitochondrial DNA types analyzed by restriction endonuclease

- patterns. *Journal of Molecular Evolution*. 19:255-271.
- JUKES, A.J. and CANTOR, C.R. (1969) Evolution in protein molecules. In: *Mammalian Protein Metabolism* (ed. MUNRO, H.N.). Academic Press New York. pp.21-123.
- KIMURA, M. (1983) *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press. Cambridge.
- KLUGE, A.G. and FARRIS, J.S. (1969) Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst.Zool.* 18:1-32.
- KNAUS, W. und SCHRÖDER, W. (1983) *Das Gamswild*. Paul Paray Verlag.
- KNIPPERS, R. (1985) *Molekulare Genetik*. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag.
- KOCHER, T.D., THOMAS, W.K., MEYER, A., EDWARDS, S.V., PÄÄBO, S., VILLABLANCA, F.X. and WILSON, A.C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 86:6196-6200.
- KUROIWA, T., OHTA, T., KUROIWA, H. and SHIGEYUKI, K. (1994) Molecular and cellular mechanisms of mitochondrial nuclear division and mitochondriokinesis. *Microskopy Res.Technique*. 27:220-232.
- LANSMAN, R.A., SHADE, R.O., SHAPIRA, J.F. and AVISE, J.C. (1981) The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in nature populations: III Techniques and potential applications. *Journal of Molecular Evolution*. 17:214-226.
- LEHMAN, N., EISENHAWER, A., HANSEN, K., MECH, L.D., PETERSON, R.O., GOGAN, P.J.P. and WAYNE, R.K. (1991) Introgression of coyote mitochondrial DNA into sympatric north american gray wolf populations. *Evolution*. 45:104-119.
- LOVARI, S. and SCALA, C. (1980) Revision of *Rupicapra* genus. I. A statistical re-evaluation of Couturier's data on the morphometry of six chamois subspecies. *Bollettino di Zoologia*. 47:113-124.
- LOVARI, S. (1985) Behavioural repertoire of the Abruzzo Chamois (*Rupicapra pyrenaica ornata*). *Säugetierkundliche Mitteilungen*. 32:113-136.
- LOVARI, S. (1987) Evolutionary aspects of the biology of Chamois, *Rupicapra* spp. (Bovidae, Caprinae). In: *The biology and management of Capricornis and related mountain Antelopes* (ed. SOMA, H.). Croom Helm London. pp.51-61.
- LYDEKKER, R. (1913) *Catalogue of the Ungulate Mammals of British Nat. History Museum, London*.
- MANLOVE, M.N., AVISE, J.C., HILLESTAD, H.O., RAMSEY, P.R., SMITH, M.H. and STRANEY, D.O. (1975) Starch gel electrophoresis for the study of population genetics in White-tailed deer. In: *Proc. 29th Ann.Conf. S.E. Game and Fish Comm.* (ed. ROGERS, V.A.). St.Louis. Mo. pp.392-403.
- MASINI, F. and LOVARI, S. (1988) Systematics, Phylogenetic Relationships and Dispersal of the Chamois (*Rupicapra* spp.). *Quaternary Research*.30:339-349.
- MILLER, CH. and HARTL, G.B. (1986) Genetic variation in two alpine populations of chamois, *Rupicapra rupicapra* L. *Zeitschrift für Säugetierkunde*. 51:114-121.
- MILLER, CH. and HARTL, G.B. (1987) Genetische Variation bei Gamsen der Alpen (*Rupicapra rupicapra rupicapra* L.). *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*. 33:220-227.

- MORITZ, C., DOWLING, T.E. and BROWN, W.M. (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology systematics. *Annu.Rev.Ecol.Syst.* 18:269-292.
- NADLINGER, K.F. (1994) Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen mitochondrialer DNA in *Lepus europaeus*, *Cervus elaphus* und *Bison bonasus*. Dissertation, Wien 1994.
- NASCETTI, G., LOVARI, S., LANFRANCHI, P., BERDUCOU, C., MATIUCCI, S., ROSSI, L. and BULLINI, L. (1985) Revision of the *Rupicapra* genus. III. Electrophoretic studies demonstrating species distinction of chamois populations of the Alps from those of the Apennines and Pyrenees. In: *Biology and Management of mountain Ungulates.* (ed. LOVARI, S.). Croom Helm London. pp.56-62.
- NASCETTI, G., LANFRANCHI, P., RATTI, P., PERACINO, V., MATIUCCI, S., MENEGUZ, P.G., ROSSI, L. and BULLINI, L. (1987) Studi elettroforetici sulla variabilità e divergenza genetica di *Capra ibex ibex* e *Capra aegagrus hircus* delle Alpi. In: *Lo stambecco delle Alpi: Realtà attuale e prospettive.* (eds. BALOBO, T., DeMENEGHI, D., MENEGUZ, P.G. and ROSSI, L.). Università di Torino. pp.11-15.
- NEI, M. (1972) Genetic distance between populations. *American Naturalist.* 106:283-292
- NEI, M. (1975) *Molecular Population Genetics and Evolution.* Amsterdam & New York. North-Holland.
- NEI, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small numbers of individuals. *Genetics.* 89:583-590.
- NEI, M. and LI, W.H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 76:5269-5273.
- NEI, M. and TAJIMA, F. (1981) DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics.* 97:145-163.
- PEMBERTON, J.M., KING, P.W., LOVARI, S. and BAUCHAU, V. (1989) Genetic variation in the Alpine chamois with special reference to the subspecies *Rupicapra rupicapra cartusiana* Couturier, 1938. *Zeitschrift für Säugetierkunde.* 54:243.
- QAVI, H. and KIT, S. (1980) Electrophoretic patterns of aminoacylase (ACY-1) isoenzymes for detecting ACY-1 activity. *Biochem.Genet.* 18:669-679.
- QUINN, T.W. and WHITE, B.N. (1987) Analysis of DNA sequence variation. In: *Avian genetics.* (eds. COOKE, F. and BUCKLEY, P.A.). Academic Press. London.
- RANDI, E., GENTILE, L., BOSCAGLI, G., HUBER, D. and ROTH, H.U. (1994) Mitochondrial DNA divergence among some west European brown bear (*Ursus arctos* L.) populations. Lessons for conservation. *Heredity.* 73:480-489.
- RICKWOOD, D. (1986) *Centrifugation. A practical approach.* 2nd ed. Irl. Press Ltd., Oxford.
- RICKWOOD, D. and HAMES, B.D. (1982) *Gel electrophoresis of nucleic acids. A practical approach.* Irl Press Ltd., Oxford.
- ROGERS, J.S. (1972) Measure of genetic similarity and genetic distance. In: *Studies in Genetics, Vol.7* (Univ.Texas Publ. 7213).
- ROGERS, J.S. (1986) Deriving phylogenetic trees from allele frequencies: A comparison of nine genetic distances. *Syst.Zool.* 35 (3):297-310.

- RUBIN, A. (1992) Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen Alloenzym-Polymorphismen und Kupfergehalten von Leber und Niere bei Wiederkäuern. Diplomarbeit, Wien 1992.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. and EHRlich, H.K. (1988) Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239:487-491.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. (1989) *Molecular cloning - a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory press.
- SELANDER, R.K., SMITH, M.H., YANG, S.Y., JOHNSON, W.E. and GENTRY, J.B. (1971) Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus* L. Variation in the Old-Field Mouse (*Peromyscus polionotus*). In: *Studies in Genetics*, Vol.6 (Univ.Texas Publ. 7103). pp.49-90.
- SHAW, C.R. and PRASAD, R. (1970) Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. *Biochem.Genet.*4:297-320.
- SHIELDS, G.F. and KOCHER, T.D. (1991) Phylogenetic relationships of north american Ursids based on analysis of mitochondrial DNA. *Evolution*. 45(1):218-221.
- SICILIANO, M.J. and SHAW, C.R. (1976) Separation and visualization of enzymes on gels. In: *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, Vol.2: Zone Electrophoresis (ed. SMITH, I.). London. William Heinemann Medical Books. pp.185-209.
- SICILIANO, M.J., ADAIR, G.M. and HUMPHREY, R.M. (1984) Enzyme electrophoresis in mutation analysis. In: *Electrophoresis* (ed. NEUHOFF, V.). Weinheim. Verlag Chemie. pp.185-209.
- STRASSBURGER, E. (1978) *Lehrbuch der Botanik*. Gustav Fischer Verlag.
- STRYER, L. (1988) *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, New York.
- STÜWE, M., SCRIBNER, K.T. and ALKON, P.U. (1992) A comparison of genetic diversity in Nubian ibex (*Capra ibex nubiana*) and Alpine ibex (*Capra ibex ibex*). *Zeitschrift für Säugetierkunde*. 57:120-123.
- SWOFFORD, D.L. and SELANDER, R.B. (1989) BIOSYS-1. A computer program for the analysis of allelic variation in popular genetics and biochemical systematics. Release 1.7. User's manual. Illinois Natural History Survey, Champaign.
- THORUP, O.A., STROLE, W.B. and LEAVELL, B.S. (1961) A method for the localization of catalase on starch gels. *J. of Laboratory and clinical Medicine*. 58:122.
- THUESEN, I. and ENGBERG, J. (1990) Recovery and analysis of human genetic material from mummified tissue and bone. *Journal Arch. Sciences*. 17:679-689.
- TIEDEMANN, R. (1994) Taxonomische und populationsgenetische Untersuchungen an der mitochondrialen DNA von Eiderenten (*Somateria mollissima* (L., 1758)) und Watvögeln der Familien Haematopodidae, Charadriidae und Scolopacidae. Dissertation, Kiel 1994.
- WAYNE, R.K. and JENKS, S.M. (1991) Mitochondrial DNA analysis implying extensive hybridization of the endangered red wolf (*Canis rufus*). *Nature*. 351:565-568.
- WATSON, J.D., HOPKINS, N.H., ROBERTS, J.W., ARGETSINGER-STEITZ, J. and WEINER, A.M. (1987) *The molecular biology of the gene*. 4th ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- WEIR, B.S. (1990) *Genetic Data Analysis. Methods for discrete population genetic data*. Sinauer

Associates, Inc. Publishers. Sunderland. Mass. pp.261-289.

WILSON, A.C., CANN, R.L., CARR, S.M., GEORGE, M., GYLLENSTEIN, U.B., HELM-BYCHOWSKI, K.M., HIGUCHI, R.G., PALUMBI, S.R., PRAGER, E.M., SAGE, R.D. and STONEKING, M. (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol.J.Linn.Soc.* 26:375-400.

WRIGHT, S. (1978) *Evolution and the genetics of populations. Vol.4, Variability in and among natural populations.* Univ. Chicago Press. Chicago.

ZINK, R.M. (1991) The geography of mitochondrial DNA variation in two sympatric sparrows. *Evolution.* 45:329-339.

3. PUBLIKATIONEN

Sabine HAMMER, Karl NADLINGER and Günther B. HARTL (1995)

Mitochondrial-DNA differentiation in chamois (genus *Rupicapra*): implications for taxonomy, conservation, and management

In: *Ecological Genetics in Mammals II* (eds. HARTL, G.B. and MARKOWSKI, J.). *Acta Theriologica*.40. Supplement 3:145-155.

4. PERSÖNLICHE DATEN

Name	Sabine Hammer
Eltern	Ingrid und Peter Hammer
Geburtsdatum	14. Mai 1968
Geburtsort	Wien

1974-1978: Volksschule in Wien XV

1978-1986: Naturwissenschaftliches Realgymnasium in Wien XV

12.6.1986: Ablegung der AHS-Matura

19.9.1986-25.9.1989: Studium der Biochemie an der Universität Wien

25.9.1989: Beginn des Studium Irregulare Molekulargenetik an der Universität Wien

30.9.1992: 1. Diplomprüfung

November 1993: Beginn der Diplomarbeit am Institut für Wildtierkunde und Ökologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien mit dem Thema "Molekulargenetische Variabilität und Differenzierung in der Gattung *Rupicapra*".

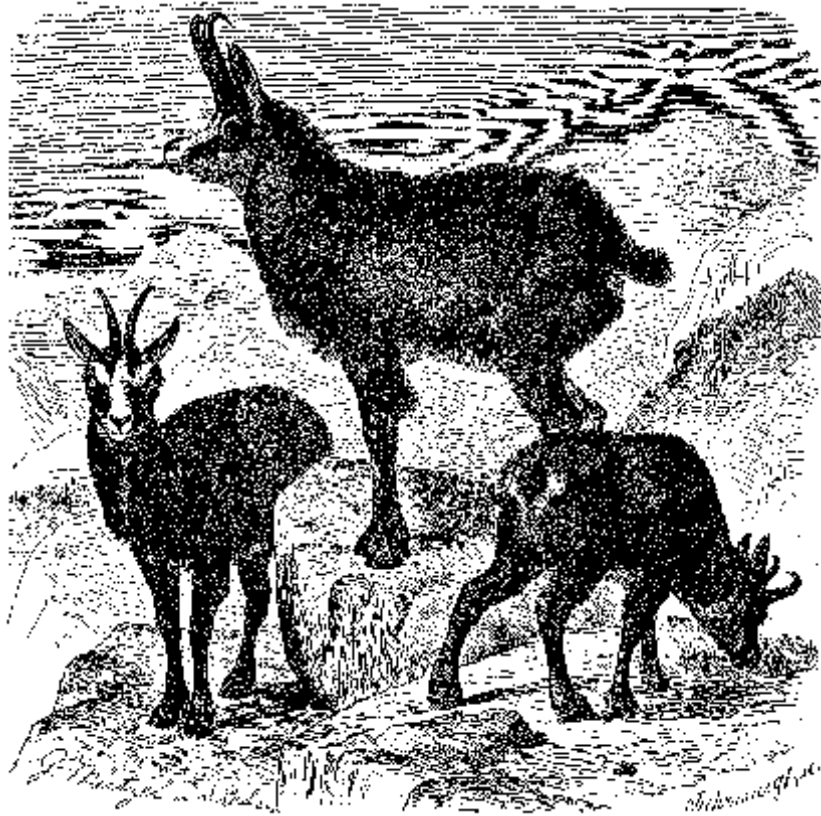
19.-22.9.1994: Teilnahme an dem Kongreß "Ecological Genetics in Mammals" an der Universität ^oódí in Polen mit einem Referat zu dem Thema "Conservation Genetics of Chamois (genus *Rupicapra*)"

7.-13.2.1995: Aufenthalt in der Abteilung von Prof.Dr. Günther B. Hartl am Institut für Haustierkunde an der Christian Albrechts Universität zu Kiel (BRD). Referat bei dem Mitarbeiter-Kolloquium des Institutes für Haustierkunde mit dem Thema "Populationsgenetische und systematische Untersuchungen an Gamsen mittels mitochondrialer DNA"

27.6.1995: Referat im Rahmen des Cytogenetischen Seminars des Instituts für Botanik an der Universität Wien über die Diplomarbeit mit dem Titel "Molekulargenetische Variabilität und Differenzierung bei Gamsen"

16.-29.10.1995: Aufenthalt am Institut für Haustierkunde an der Christian Albrechts Universität zu Kiel (BRD), um im Rahmen eines Projektes die Methode des nicht-radioaktiven DNA-Sequenzierens mittels des Digoxigenin-Systems zu erlernen.

23.1.1996: Präsentation der abgeschlossenen Diplomarbeit im Rahmen des Seminars am Institut für Wildtierkunde und Ökologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien



... Der Mensch lief einst, die Stirne schräger,
Durch graue Vorzeit als ein Jäger;
Noch heute ihm im Busen ruht -
Und wallt oft auf - das Jägerblut,
Und ganz besonders in den Alpen!
Wild wie die Rothaut nach den Skalpen
Sind hier die Burschen auf den Fährten
Der Gemsen, wegen ihren Bärten,
Mit denen sie die Hüte schmücken;
NB! Der "Bart" wächst auf dem Rücken!
Und würd man nicht behördlich bremsen,
Gäb's nirgends im Gebirg mehr Gemsen,
Wie's schon den Steinbock kaum mehr gibt,
Der wegen seines Horns beliebt ...

Eugen ROTH