

Aus dem Institut für Tierhaltung und Tierzucht
der Universität Hohenheim
Fachgebiet Tierzucht und Biotechnologie
Prof. Dr. H. Geldermann

**UNTERSUCHUNG DER INFORMATIVITÄT
NEUER MIKROSATELLITENLOCI
BEIM KAMEL**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Agrarwissenschaften

vorgelegt der Fakultät IV (Agrarwissenschaften II)

von
Dmitri Evdotchenko
aus Barnaul, Russland
2001

Die vorliegende Arbeit wurde von der Fakultät IV – Agrarwissenschaften II - der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung:

21.12.2001

Dekan:

Prof. Dr. S. Dabbert

Berichterstatter, 1. Prüfer:

Prof. Dr. H. Geldermann

Mitberichterstatter, 2. Prüfer:

Prof. Dr. A. Valle Zárate

3. Prüfer:

Prof. Dr. W. Drochner

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 EINLEITUNG	8
2 LITERATURÜBERSICHT	9
2.1 Genetische Ressourcen beim Kamel	9
2.1.1 Zoologische Klassifikation	9
2.1.2 Genetische Unterschiede zwischen Kameliden-Spezies und -Gattungen	12
2.2 Nachweis der Informativität eines Locus anhand von Populationsstichproben	13
2.2.1 Parameter für die Informativität genetischer Polymorphismen	13
2.2.2 Erfassung von Populationsstichproben für die Untersuchung von Markerloci	14
2.3 Entstehung und Struktur von Mikrosatelliten	16
2.4 Funktionen von Mikrosatellitenloci	17
2.5 Vorkommen und Häufigkeit	19
2.6 Zahl der Allele und Häufigkeit	19
2.6.1 Art und Häufigkeit von Mutationen in Mikrosatellitenloci	21
2.7 Anwendungsmöglichkeiten der Mikrosatellitenloci	23
2.7.1 Genomkartierung	23
2.7.2 Elternschaftskontrollen	24
2.7.3 Analysen der Populationsstruktur	24
2.8 Kenntnisstand über Mikrosatellitenloci beim Kamel	24
3 MATERIAL UND METHODEN	27
3.1 Tiermaterial	27
3.1.1 Trampeltiere aus Rußland und Deutschland	28
3.1.2 Dromedarrassen aus Kenia	28

3.2	Primer-Sequenzen	33
3.3	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial	35
3.4	Lösungen und Puffer	36
3.5	Geräte	37
3.6	Probengewinnung	38
3.7	Isolierung genomischer DNA	38
3.7.1	Schnelle Aufarbeitung aus Blut	38
3.7.2	Aufarbeitung von salzkonservierten Proben	38
3.7.3	Phenol-Chloroform-Extraktion	39
3.7.4	Präzipitation mit Ethanol	39
3.8	Kontrolle der DNA-Qualität	40
3.9	Überprüfung und Messung der DNA-Konzentration	40
3.10	PCR-Amplifikation der Mikrosatelliten	40
3.10.1	Durchführung der PCR	41
3.10.2	Optimierung der PCR-Bedingungen pro Locus	42
3.11	Fragmentlängenanalysen der PCR-Produkte	43
3.11.1	Herstellung von Fragmenten als Längenstandards	43
3.11.2	Herstellung der Gele	44
3.11.3	Probenvorbereitung und Probenauftrag	45
3.11.4	Elektrophorese	45
3.11.5	Auswertung der Gele nach Elektrophorese	45
3.12	Statistische Methoden	46
3.12.1	Berechnung der Allel- und Genotypfrequenzen	46
3.12.2	Berechnung von Heterozygotiegraden	47
3.12.3	Berechnung der effektiven Allelzahl	48
3.12.4	Berechnung des PIC-Wertes je Locus	48

3.12.5	Berechnung der Ausschlusswahrscheinlichkeiten	49
3.12.6	Bestimmung des Variabilitätsniveaus in Populationen	49
3.12.7	Berechnung der genetischen Distanzen	50
4	ERGEBNISSE	52
4.1	Darstellung alleler Fragmentlängen für neue Mikrosatellitenloci	52
4.1.1	Werte der DNA-Extraktion	52
4.1.2	Primerprüfung	53
4.1.3	PCR mit genomischer DNA verschiedener Tiere und Loci	53
4.1.4	Fragmentlängenanalysen	56
4.2	Analyse der Polymorphie	70
4.2.1	Spezies spezifische Allel- und Genotypfrequenzen	71
4.2.2	Parameter der Heterozygotie	75
4.2.3	Parameter für die Informativitätsschätzung	79
4.3	Genetische Distanzen zwischen den Spezies	82
4.4	Untersuchungen der Dromedar- und Trampeltierrassen	83
4.4.1	Fragmentlängenanalyse	83
4.4.2	Anzahl und Frequenzen von Allelen und Genotypen	84
4.4.3	Heterozygotiegrade	97
4.4.4	Schätzung der Inzucht	99
4.4.5	Genetische Distanzen zwischen Dromedarrassen	101
4.4.6	Genetische Distanzen zwischen Altweltkameliden	103
5	DISKUSSION	105
5.1	Tiermaterial für die Untersuchung der Informativität neuer Mikrosatellitenloci	105
5.2	Tiergruppen für Populationsuntersuchungen	106
5.3	Gewinnung genomischer DNA von Kamelen	107
5.4	PCR-Amplifikation von Mikrosatellitenloci	107

5.5	Auswahl und Herstellung der Längenstandards für die Fragmentanalyse	108
5.6	Fragmentlängenanalyse mit dem A.L.F. DNA-Sequenzierautomaten	109
5.7	Polymorphismen der neuen Mikrosatellitenloci in verschiedenen Spezies	111
5.8	Informativitätsparameter der neuen Mikrosatellitenloci	113
5.9	Genetische Distanzen zwischen Spezies und Rassen	114
5.10	Beurteilung der genetischen Struktur von Dromedar-Rassen	114
6	ZUSAMMENFASSUNG	116
7	LITERATURVERZEICHNIS	118

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2n	Chromosomenzahl, diploid
A	Adenin
A.L.F.	Automated Laser Fluorescence (Sequenzierautomat)
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CEP	Cumulated Exclusion Probability
cM	Zentimorgan
CMS	Camel Microsatellite
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Exclusion Probability
G	Guanin
HW	Hardy-Weinberg (Gleichgewicht)
IGF	Insulin-like growth factor
kbp	Kilobasenpaare
MHC	Major Histocompatibility Complex
n=	Anzahl der Tiere
NOR	Nucleolar Organizer Region
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIC	Polymorphism Information Content
QTL	Quantitative Trait Loci
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RT	Raumtemperatur
T	Tymin
TEMED	Tetramethylethyldiamid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ü.N.	Über Nacht
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats

1 EINLEITUNG

Seit etwa 1982 werden Mikrosatelliten aufgrund der Vielzahl der Loci und ihres hohen Polymorphiegrades in vielen Bereichen der Genomanalytik als Marker eingesetzt, z.B. bei der Genkartierung, Analysen von Populationsstrukturen, Elternschaftskontrollen, forensischen Untersuchungen, Populationsvergleichen und QTL-Analysen. Mikrosatellitenloci lassen sich mittels PCR amplifizieren, so dass die Varianten mit Hilfe elektrophoretischer Verfahren anhand ihrer Fragmentlängen einfach zu unterscheiden sind. Inzwischen wurden auch bei wichtigen Nutztieren viele Mikrosatellitenloci beschrieben. So sind ca. 1900 Loci beim Rind und ca 1500 Loci beim Schwein bekannt (wie z.B. <http://sol.marc.usda.gov>) und jedes Jahr werden Hunderte von Mikrosatellitenloci neu analysiert.

Obwohl Kamele in der Wirtschaft arider Gebiete eine große Rolle spielen, gibt es zur Zeit kaum Kenntnisse über Mikrosatelliten bei Altwelt-Kameliden. Nur bei Neuwelt-Kameliden wurden einige wenige Mikrosatelliten beschrieben. Für die Kamelzüchter wäre es jedoch nützlich, solche polymorphen Marker beispielsweise für Elternschaftskontrollen oder Rassenvergleiche verwenden zu können. Von wissenschaftlichen Interesse sind auch phylogenetische Vergleiche der Kameliden-Spezies und deren Rassen anhand von DNA-Polymorphismen.

Ziel der Arbeit war die Etablierung und Verwendung neuer Primer für die Darstellung polymorpher Mikrosatellitenloci beim Kamel. In diesem Zusammenhang erfolgte die Darstellung verschiedener Allele sowie eine Untersuchung der Informativität neuer Loci. Beispielhaft sollten vier Dromedarpopulationen aus Kenia auf ihre genetische Verwandtschaft untersucht werden. Im Einzelnen wurden in Bezug auf die betrachteten Mikrosatellitenloci folgende Beiträge angestrebt:

- Optimierung der PCR-Bedingungen für neu definierte Primer in zwei Spezies (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius*),
- Verwendung der Primer in vier Kamelspezies,
- Prüfung der Informativität neuer Loci in vier Kamelspezies und
- Untersuchung der Allel- und Genotypfrequenzen in einigen Dromedarrassen.

LITERATURÜBERSICHT

2.1 Genetische Ressourcen beim Kamel

2.1.1 Zoologische Klassifikation

Die Klassifikation der Kameliden ist in [Abb. 1](#) (S. 10) dargestellt. Alle rezenten Kamele gehören zur Familie *Camelidae*. Es werden drei Gattungen unterschieden, die Gattung *Camelus*, die zwei Spezies der Altweltkamele umfasst, die Gattung *Lama*, zu der drei Spezies der Neuweltkamele gehören, und die Gattung *Vicugna*. Noch diskutiert wird, ob *Lama*, Alpaka, Guanako und *Vicugna* als vier Spezies der Gattung *Lama* betrachten werden sollten, oder ob *Vicugna* der einzige Vertreter der Gattung *Vicugna* ist ([Vidal-Rioja et al. 1994](#), [Semorile et al. 1994](#), [Stanley et al. 1994](#), [Ojasti 1996](#)). Außerdem ist davon auszugehen, dass *Lama*, Alpaka und Guanako als Subspezies zu bezeichnen sind, da sie bei Kreuzung untereinander fertile Nachkommen erzeugen ([Romero 1927](#), zit. nach [Vidal-Rioja et al. 1987](#)).

Phylogenetische Untersuchungen an mtDNA ([Honeycutt et al. 1995](#)) sowie Untersuchungen der Konservierung der AATA-Unterbrechung im IGF-1-Mikrosatelliten verschiedener Spezies der Ordnung Artiodactyla zeigten, dass die Familie *Camelidae* keine Unterbrechung im IGF-1-Mikrosatelliten aufweist ([Abb. 2](#), S. 11). Dies legt den Schluss nahe, dass Kameliden vor ca. 35 Mill. Jahren von der Hauptlinie der Ordnung Artiodactyla divergierten ([Shariflou u. Moran 2000](#)).

Die rezenten Kameliden stammen von gemeinsamen Vorfahren ab, die im nordamerikanischen Kontinent im Obereozän vor ca. 40 Mill. Jahre existierten. Im Obermiozän spalteten sich die Kameliden in mehrere Formen ([Stanley et al. 1994](#), [Semorile et al. 1994](#), [Vidal-Rioja et al. 1994](#), [Keßler 1997](#), [Skidmore et al. 1999](#)). Die Evolution der Kameliden ist schematisch in der [Abb. 3](#) (S.11) dargestellt ([Keßler 1997](#)). Spätere Untersuchungen am mitochondrialen Cytochrom-*b*-Gen der Kameliden zeigten, dass die Spaltung zwischen den Alt- und Neuweltkameliden vor ca. 11 Mill. Jahren stattgefunden haben könnte und die Spaltung zwischen *Lama* und *Vicugna* vor ca. 2 Mill. Jahren ([Stanley et al. 1994](#)).

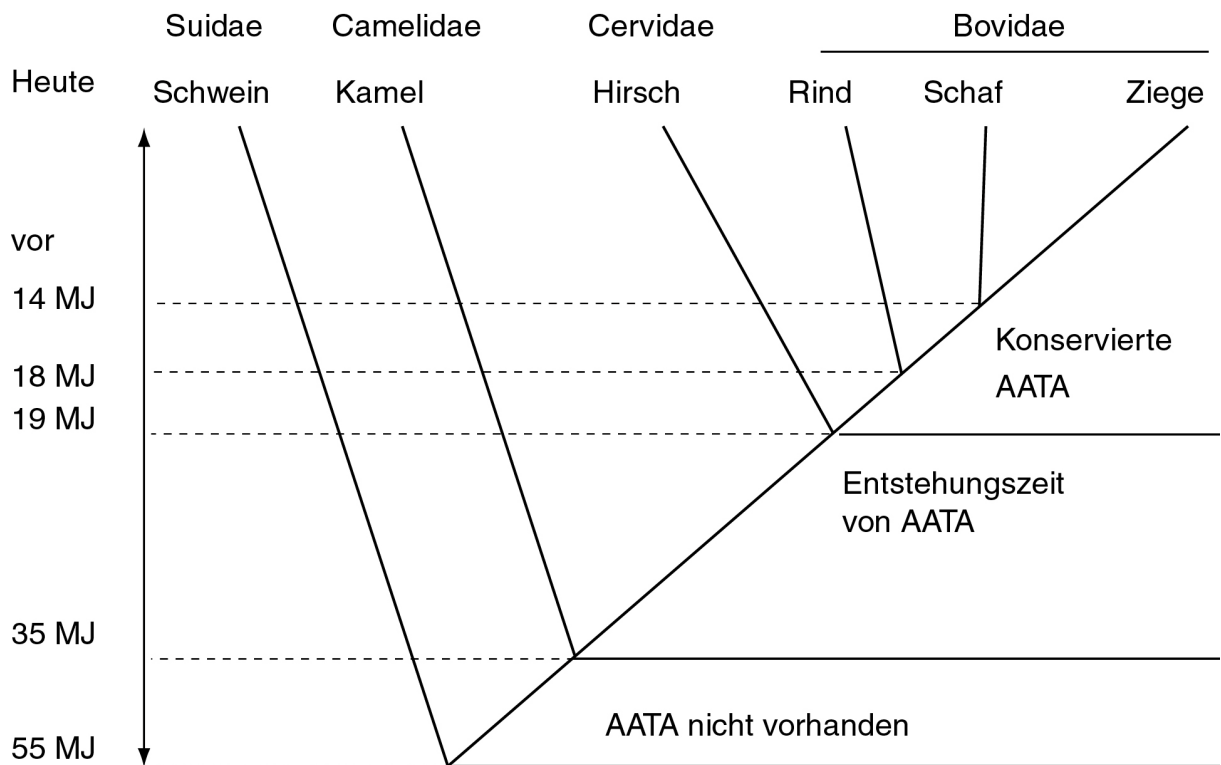


Abb. 2: Divergenzzeit der Familie *Camelidae* (modifiziert nach Shariflou u. Moran 2000)

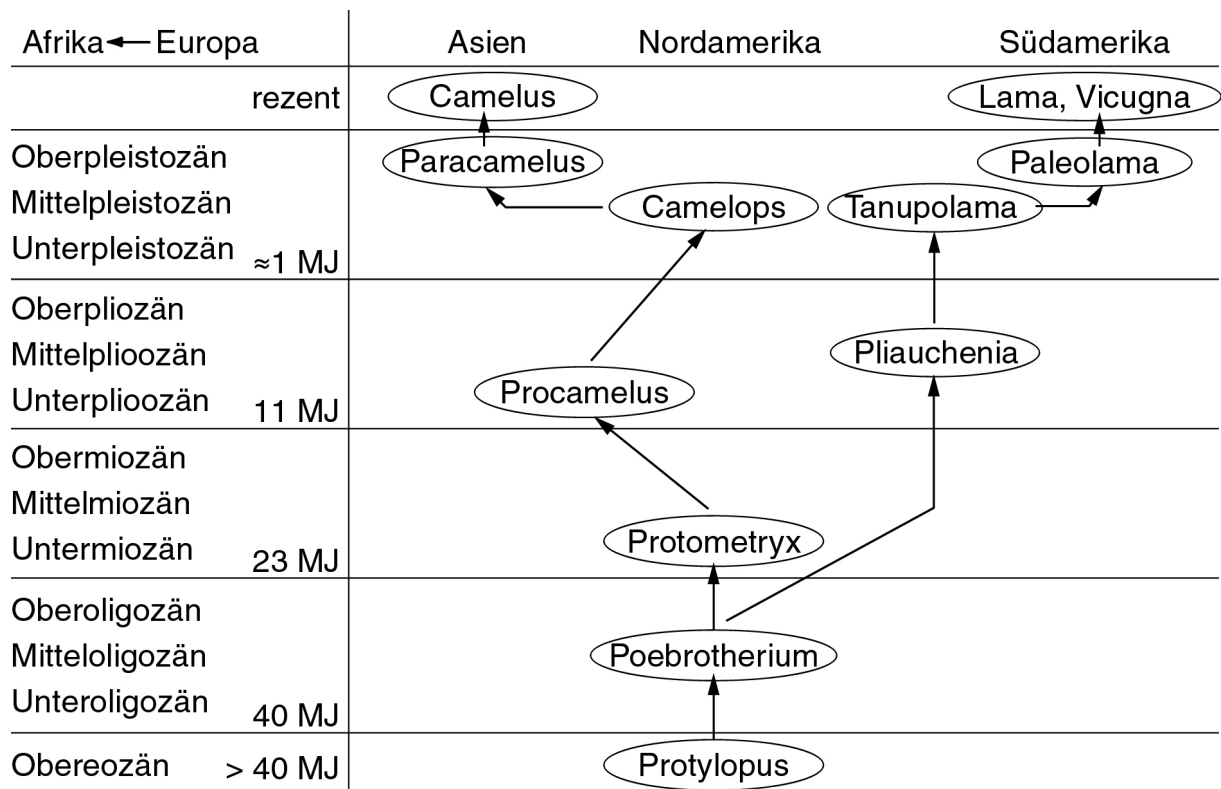


Abb. 3: Evolution der Kameliden (modifiziert nach Keßler 1997)

Das Dromedar wurde vor 3000 - 4000 Jahren in Arabien und Turkmenistan domestiziert. Heute gibt es keine wilde Dromedare mehr. Das Trampeltier wurde in der Mongolei vor ca. 3000 Jahren domestiziert (Lensch 1999). Das zweihöckrige Kamel existiert noch als Wildform *Camelus bactrianus ferus* in China und der Mongolei. Die geschätzte Zahl der Tiere variiert zwischen 900 - 1500 (Tan 1996, Schaller 1998, Hare 1998, zit. nach <http://www.animalinfo.org/species/artiperi/comebact.htm>)

2.1.2 Genetische Unterschiede zwischen Kameliden-Spezies und -Gattungen

Bei Restriktionskarten der rDNA (nach Verdau mit Endonukleasen *EcoRI* und *BamHI*) von südamerikanischen Kameliden und dem zweihöckrigen Kamel waren von 17 Restriktionsfragmenten sechs in allen untersuchten Spezies gleich. Die übrigen elf Restriktionsfragmente sind mit Spacer-Regionen verbunden und unterscheiden sich zwischen den Kamel-Gattungen. Auch Southern-Blot-Hybridisierungsmuster mit Proben für 18S- und 28S-rDNA-Sequenzen zeigen in den betreffenden Genen verschiedene Längen bei Neuwelt-Kameliden und beim Trampeltier. Die Daten weisen auf mindestens zehn Mutationen hin, die seit der Trennung der Neuwelt-Kameliden vom gemeinsamen Vorfahren zur Divergierung beigetragen haben (Semorile et al. 1994).

Alle Neuwelt-Kameliden haben Ähnlichkeiten in der Satelliten-DNA und der Verteilung der Satelliten-DNA in den Chromosomen (Vidal-Rioja et al. 1987). Southern-Hybridisierungen mit Restriktionsfragmenten vom Trampeltier als Sonden zeigen, dass Satelliten-DNA von Kameliden große Ähnlichkeiten aufweisen können. Die Hybridisierungsmuster zwischen Alt- und Neuwelt-Kameliden jedoch variieren zwischen identisch (*MspI*-sat) bis hoch unterschiedlich (*PstI*-sat und *EcoRI*-sat) (Vidal-Rioja et al. 1994).

Auch zytogenetische Untersuchungen zeigen, dass die vier Kameliden aus Südamerika – Guanaco, Alpaca, Lama und Vicuna - nahe verwandt sind (Vidal-Rioja et al. 1994, Bunch et al. 1985). Altwelt-Kamele weisen ebenfalls zytogenetische Ähnlichkeiten zu ihren südamerikanischen Verwandten auf (Capanna u. Civitelli 1965,

zit. nach [Semorile et al. 1994](#), [Bunch et al. 1985](#)). Beispielweise haben alle Kameliden identische Karyotypen (gleiche Chromosomenzahl $2n = 74$) sowie G-, C- wie auch NOR-Färbungsmuster der Chromosomen ([Vidal-Rioja et al. 1989](#)).

Trotz gleicher Chromosomenzahl bei Alt- und Neuwelt-Kameliden ist eine Paarung der homologen Chromosomen während der Meiose unmöglich. Beispielsweise wurde im Kreuzungsversuch zwischen *Camelus dromedarius* und *Lama guanicoe* ([Skidmore et al. 1999](#)) ein lebender, jedoch nicht fertiler männlicher Hybrid nach 328 Tagen der Trächtigkeit geboren. Seine Abstammung von den Elterntieren wurde mit Hilfe von acht Mikrosatelliten bestätigt. Dieses Tier ist wahrscheinlich der erste lebende Hybrid, der zwischen Alt- und Neuwelt-Kameliden produziert wurde.

2.2 Nachweis der Informativität eines Locus anhand von Populationsstichproben

Um die Chromosomen möglichst schnell und umfassend kartieren zu können, werden Marker, also Fixpunkte in der Karte, verwendet. Bei der Auswahl eines Markers ist entscheidend, dass dieser in der betrachteten Population in verschiedenen Ausprägungen vorkommt. Nur wenn Marker in der Elterngeneration unterschiedlich sind, also in verschiedenen Allelen vorliegen, kann eine Neukombination der Marker in der F1-Generation nachgewiesen werden. Marker, die in verschiedenen Allelen vorkommen, werden üblicherweise als polymorph bezeichnet, wenn das häufigste Allel eine Frequenz von unter 95 % aufweist ([Lottspeich u. Zorbas 1998](#)). Bei der Untersuchung eines Markers werden mehrere Tiere einbezogen, um möglichst viele Allele nachzuweisen und die Frequenzen abschätzen zu können. Im Idealfall sollten Tiere aus verschiedenen Populationen oder der zu untersuchenden Spezies als Zufallsstichprobe einbezogen werden.

2.2.1 Parameter für die Informativität genetischer Polymorphismen

Die Qualität von genetischen Markern wird durch ihre Heterogenität in der betrachteten Population oder Spezies bestimmt. Dies beinhaltet die Anzahl der Allele und ihre relative Häufigkeit (Frequenz) in der Population. Je mehr verschiedene Allele ein Marker besitzt und je gleichmäßiger diese Allele in der Population verteilt sind, desto hilfreicher ist der Marker für die genetische Analyse. Marker, die in einem

individuellen Fall zu einer genetischen Analyse herangezogen werden können, z.B. die bei einer Elternchaftskontrolle vorkommenden verschiedenen Allele der Eltern, werden als informativ bezeichnet. Es sollten viele Markerloci vorhanden sein, so dass in jedem Fall eine Untersuchung vorgenommen werden kann und eine umfassende Analyse des Genoms erreicht wird. Ein Marker sollte selektiv neutral sein. Die Allele eines Markerlocus sollten codominant oder intermediär vererbt werden, damit alle möglichen Genotypen differenziert werden können. Insbesondere Mikrosatellitenloci entsprechen diesen Voraussetzungen ([Lottspeich u. Zorbas 1998](#)).

Als Parameter für die Informativität eines Locus werden die Zahl der Allele, deren Fragmentlängen, Heterozygotiegrade und der PIC-Index benutzt.

2.2.2 Erfassung von Populationsstichproben für die Untersuchung von Markerloci

Bei der Untersuchung der Informativität eines Mikrosatellitenlocus spielt die Zahl der einbezogenen Rassen sowie der jeweils untersuchten Tiere eine zentrale Rolle. Mit der Zahl der untersuchten Tiere steigt die Wahrscheinlichkeit, dass alle existierenden Allele eines Locus entdeckt werden. Bei Nutzung mehrerer Primerpaare pro Locus können Probleme mit Null-Allelen vermieden werden und darüber hinaus weitere Allele entdeckt werden ([Lehmann et al. 1996](#)). Die Zahl der berücksichtigten Tiere ist in verschiedenen Untersuchungen unterschiedlich und liegt normalerweise zwischen 20 ([Kemp et al. 1993](#)) und 50 ([Ostrander et al. 1993](#)). Je mehr Tiere in die Untersuchungen einbezogen werden, desto zuverlässiger können Heterozygotiegrad und PIC-Index geschätzt werden. Einige Beispiele für die Charakterisierung der Mikrosatellitenloci sind in der [Tab. 1](#) dargestellt (S. 15).

Tab. 1: Beispiele für die Untersuchung der Informativität von Mikrosatellitenloci

Spezies	Zahl der Rassen	Zahl der Tiere pro Rasse	Zahl der Loci	Betrachtete Repeatmotive	Informativitätsparameters						Autor	
					FL[bp]	N	ENA	H [%]	PIC	EP[%]		
Rind	4	5										
Schaf	1	5	6	(CA) _n	92-271	4-8	-	35-90	-	-		Kemp et al. 1993
Ziege	1	5										
Rind	4	2	45	(CA) _n	88-262	2->18	-	-	-	-		Ma et al. 1996
Rind	4	50	23	-	73-313	3-14	1,4 -8,5	27-88	0,25-0,86	13-74		Peelman et al. 1998
Schwein	5	1-2	7	(TG) _n	94-198	3-5	-	-	-	-		Robic et al. 1995
Schwein	5	1-3	414	(GT:CA) _n	67-274	2-45	-	-	-	-		Alexander et al. 1996
Huhn	4	2	29	(TG/AC) _n	-	91-352	-	-	-	-		Khatib et al. 1993
Pferd	4	18-55	9	(TG) _n	93-188	4-7	-	-	-	17-54		Marklund et al. 1994
Hund	-*	40-50	33	(CA) _n	-	-	-	-	0,00-0,78	-		Ostrander et al. 1993
Hund	-*	12	101	(CA) _n	100-250	2->5	-	-	-	-		Ostrander et al. 1995
Hund	1	48	8	-	119-282	4-8	-	60-90	-	71-91		Sutton et al. 1998

FL: Fragmentlänge; N: Zahl der Allele; ENA: Effektive Anzahl der Allele; H: Heterozygotiegrad; PIC: Polymorphism Information Content; EP: Erwartete Ausschlusswahrscheinlichkeit bei der Abstammungskontrolle; *: Proben aus mehreren Rassen; -: keine Angaben.

2.3 Entstehung und Struktur von Mikrosatelliten

Mikrosatelliten gehören zur repetitiven DNA. Soweit sie in der Population polymorph sind, werden sie auch als VNTR (Variable Number of Tandem Repeats – [Nakamura et al. 1987](#)), SSLP (Simple Sequence Length Polymorphisms - [Tautz 1989](#)) oder STRP (Short Tandem Repeat Polymorphisms - [Weber und Wong 1993](#)) bezeichnet. Mikrosatelliten weisen im allgemeinen Längen von bis zu 150 bp auf und besitzen kurze Wiederholungseinheiten, die selten mehr als 4 bp betragen. Dinucleotidwiederholungen (CA/GT) sind im Genom sehr verbreitet und machen etwa 0,5 % des gesamten Genoms bei Säugtieren aus ([Tautz 1989](#)). Mononucleotidwiederholungen aus A/T nehmen weitere 0,3 % ein ([Tóth et al. 2000](#)).

Mikrosatelliten lassen sich nach den Motiven ihrer Wiederholungseinheiten in Kategorien einteilen ([Goldstein u. Schlötterer 1999](#)):

- Perfekte Mikrosatelliten, die aus einfachen Repeats ohne Unterbrechungen bestehen (z.B. CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT).
- Imperfekte Mikrosatelliten, die von einem kurzen Nucleotidmotiv unterbrochen sind (z.B. CTCTCTCTCTCTGTCTCTCTCTCT).
- Unterbrochene Mikrosatelliten mit einer Insertion von mehreren Nucleotiden, die nicht zur Mikrosatellitenstruktur gehören (z.B. CTCTCTCTGGGCTCTCTCTCTCTCT).
- Zusammengesetzte Mikrosatelliten, die verschiedene Wiederholungssequenzen mit oder ohne Unterbrechung enthalten (z.B. CTCTCTCTCTCTGATGATGATGATGAT).

Für die Entstehung von Mikrosatelliten werden zwei verschiedene Mechanismen angenommen. Die erste Hypothese geht davon aus, dass Mikrosatelliten zufällig aus kurzen so genannten „Proto-Mikrosatelliten“ entstehen ([Levinson u. Gutman 1987b](#)). [Rose und Falush \(1998\)](#) haben ein „Threshold Model“ entwickelt, wonach eine minimale Zahl an Repeats zum „Slippage“ während der DNA-Replikation führen, d.h. Abschnitte der Matrizen-DNA werden wiederholt synthetisiert. Slippage-Effekte können auch in kurzen Mikrosatelliten-Sequenzen (≤ 4 bp) auftreten ([Pupko u. Graur 1999](#)), werden aber in längeren Bereichen häufiger beobachtet ([Schlötterer 2000](#)).

Untersuchungen an Primaten zeigten, dass „Proto-Mikrosatelliten“ gewöhnlich kurze Sequenzen, wie z.B. ATGTGTGT, aufweisen (Messier et al. 1996; Pupko u. Graur 1999; Gordon 1997). Nach Transversion von G zu A ändert sich diese Sequenz zu ATGTATGT. Damit ist ein Mikrosatellit mit zwei Wiederholungseinheiten (ATGT)₂ entstanden. Dieser Mikrosatellit entwickelte sich je nach Spezies weiter, z.B. zu (ATGT)₅ beim Mensch oder (ATGT)₄ bei Afrikanischen Affen. Die mögliche Entstehung von Mikrosatelliten wurde von Messier et al. (1996) für den η -Globin-Locus in Affenlinien (Gorilla, Bonobo, Schimpanse, Mensch einerseits und Neuwelt-Affen andererseits) verifiziert. In einer anderen Affenlinie (Eulenaffen) führte eine Mutation von A nach G im selben Gen zu einer Sequenzänderung von GTATGTGTGT zu GTGTGTGTGT und somit zur Entstehung des Mikrosatellites (GT)₅, der sich weiter zu (GT)₆ entwickelt hat (Gordon 1997).

Ein anderer Mechanismus für die Erzeugung von Mikrosatelliten wird mit retrotransponierten Elementen in Verbindung gebracht (Nadir et al. 1996). Die Autoren gehen davon aus, dass A-reiche Mikrosatelliten durch eine 3'-Extension des Retrotranskripts erzeugt wurden, ähnlich der mRNA-Polyadenylylation. Die Hypothese einer Retrotransposition als Mechanismus der Mikrosatellitengnese wird von mehreren Autoren gestützt (z.B. Jurka u. Klonowski 1996).

2.4 Funktionen von Mikrosatellitenloci

Mikrosatelliten-Sequenzen werden in funktionell kodierenden und regulatorischen Elemente in eukaryotischen Genomen gefunden. So enthalten Exonsequenzen in den Genen, die Proteine mit homopolymeren Aminosäuren codieren, wie z.B. Histone, auch repetitive DNA-Motive. Mikrosatellitensequenzen sind ebenfalls in regulatorischen DNA-Bereichen lokalisiert, so in Response- und Enhancerelementen. Eine Variation in der Repeatzahl solcher Mikrosatelliten kann ihre regulatorischen und kodierenden Funktionen beeinflussen und somit potentiell mit Genfunktionsänderungen verbunden sein. Aufgrund ihrer hohen Mutationsraten können Mikrosatelliten dann eine Hauptquelle für genetische Veränderungen in eukaryotischen Genomen sein (Tautz et al. 1986).

Mikrosatellitenmotive u.a. in 5'-flankierenden Bereichen eukaryontischer Gene sind oft Kennzeichen eines Gens in verschiedenen Spezies. Beispielweise gibt es poly(TG)-Abschnitte stromaufwärts von der rRNA-Transkriptionseinheit bei der Maus, der Ratte und dem Menschen (Braaten et al. 1988) und stromaufwärts von Somatostatin-Gen bei der Ratte und dem Menschen (Shen u. Rutter 1984; Hayes u. Dixon 1985). Eine in hohem Grade polymorphe Pentanucleotidwiederholung (CCTTT) innerhalb der 5'-flankierenden DNA-Region des menschlichen Stickstoffoxyd synthase-Gens (*iNOS*, *NOS2*) wurde auch in den 5'-wärts gelegenen Regionen der entsprechenden Gene von Schimpansen, Orang-Utan, Makake und Gorilla gefunden (Xu et al. 1997). Die CGG-Wiederholung in der 5'-Region von FMR1-Genen wurde in 44 Säugetierspezies gefunden, was auf eine wichtige Funktion dieser Sequenz hindeutet (Eichler et al. 1995, zit. nach Kashi u. Soller 1999). Zahlreiche andere Untersuchungen dokumentieren eine evolutionäre Konstanz von Mikrosatelliten-DNA-Sequenzen in unterschiedlichen Säugetiergenomen (Moore et al. 1991, Hino et al. 1993).

Mikrosatelliten in 5'-flankierenden Genbereichen können als Enhancer-Elemente die Genexpression verstärken (Koller et al. 1991). Ein experimentelle Insertion von Mikrosatelliten-DNA kann zur Bildung expressionsverstärkender Promotorelemente führen. Zum Beispiel stimulierte ein 48 bp langes synthetisches Oligonucleotid, das nur den poly(T)-reichen Abschnitt der DED1-Promotorsequenz enthielt, die Transkription in einem *In-vitro*-Expressionsystem (Lue et al. 1989). Jedoch konnte von der DNA-Sequenz der Mikrosatelliten alleine nicht auf eine Enhancer-Funktion geschlossen werden (Kashi u. Soller 1999).

Mikrosatelliten werden auch weitere regulatorische Funktionen zuerkannt. So wird in Zellen, wie z.B. Fibroblasten, die Wiederholungssequenzvariation als Mechanismus vermutet, mit dem das Teilungspotential der Zelle limitiert wird (Naveilhan et al. 1994). In Telomerensequenzen wird jeweils eine Kopie einer Wiederholungseinheit pro Zellzyklus deletiert, so dass Repeats zur Zählereinheit der Zellverdoppelungen werden.

Für eine begrenzte Zahl der Mikrosatelliten, besonders für Trinucleotide, ist bekannt, dass sie zur Entwicklung bestimmter menschlicher Krankheiten (Myotonische Dystrophy, Huntingtons Krankheit, fragiles X-Syndrom) führen. Eine Expansion von

Trinucleotiden wurde in elf menschlichen Loci gefunden, von denen neun mit Krankheiten assoziiert sind (Freudenreich et al. 1997; Sutherland et al. 1995).

2.5 Vorkommen und Häufigkeit

Bei Eukaryonten treten pro Genom 50.000 – 100.000 Mikrosatellitenloci auf, die über das Genom verteilt vorkommen. Es wurde gezeigt, dass pro 10 - 50 kbp des Genoms mindestens ein Mikrosatellit zu finden ist (Tautz 1989, Bachtrog et al. 1999, sh. auch Schlötterer 2000). Die Verteilung von Mikrosatelliten im Genom scheint mehr oder weniger zufällig zu sein, obwohl es Beweise dazu gibt, dass bestimmte Regionen eine starke Reduktion in der Mikrosatellitendichte zeigen (z.B. Zentromerregion). Die meisten Mikrosatelliten liegen außerhalb codierender Bereiche. Jedoch können bestimmte Mikrosatelliten, wie Tri- oder Hexanucleotide, auch innerhalb von Genbereichen liegen. Die relativen Häufigkeiten der unterschiedlichen Mikrosatelliten schwanken zwischen den Spezies. Während bei Säugetieren und *Drosophila* GT-Mikrosatelliten am häufigsten sind, sind AT-Mikrosatelliten der häufigste Wiederholungstyp bei *Arabidopsis thaliana* und *Saccharomyces cerevisiae*. GA-Mikrosatelliten sind der vorherrschende Wiederholungstyp bei *Caenorhabditis elegans* (Schlötterer 2000). Analysen bei *Drosophila* zeigen, dass die Frequenz eines bestimmten Sequenzmotivs mit der Basenkomposition der genomischen Sequenzen verbunden ist (Bachtrog et al. 1999), d.h. eine Genomregion mit hohem AT-Gehalt zeigt eine höhere Frequenz an AT/TA-Mikrosatelliten als Regionen mit niedrigem AT-Gehalt.

2.6 Zahl der Allele und Häufigkeit

Mikrosatellitenloci sind oft sehr polymorph. Insbesondere die Zahl der Wiederholungseinheiten ist variabel (Nakamura et al. 1987, Weber and May 1989). Eine mögliche Ursache für die Entstehung von Längenpolymorphismen könnte ein Slippage während der Replikation sein (Strand et al. 1995, Weber u. Wong 1993). Garza et al. (1995) und Blanquer-Maumont u. Crouau-Roy (1995) zeigten, dass Unterschiede zwischen den Mikrosatelliten-Allelen bei verschiedenen Spezies nicht immer mit Änderungen der Wiederholungszahl zu beschreiben sind, sondern auch durch eine Änderung der Zusammensetzung der Wiederholungseinheit oder durch

Insertion oder Deletion (Grimaldi u. Crouau-Roy 1997, Viard et al. 1998, Lehmann et al. 1996).

Mikrosatelliten weisen einen hohen Polymorphiegrad auf, der wahrscheinlich mit der Struktur der Wiederholungseinheit (GC-Gehalt, Basenkomposition, Basenzahl) und mit Wiederholungszahl zusammenhängt (Schlötterer 2000, Bull et al. 1999). Es gibt Beweise dafür, dass Dinucleotide 1,5- bis 2-fach höhere Mutationsraten als Tetranucleotide haben und die Mutationsraten von Trinucleotiden ungefähr dazwischen liegen. Das betrifft aber nur solche Mikrosatelliten, die nicht mit Krankheiten assoziiert sind. Mit genetischen Krankheiten assoziierte Trinucleotide haben 3,9- bis 6,9-fach höhere Mutationsraten als andere Mikrosatelliten (Chakraborty et al. 1997).

Aufgrund ihrer höheren Mutationsraten ist zu erwarten, dass Dinucleotid-Mikrosatelliten die höchsten Polymorphiegrade aufweisen. Der Polymorphiegrad ist aber auch mit der Mikrosatellitenstruktur assoziiert. Perfekte Mikrosatelliten haben einen größeren Polymorphiegrad als solche mit Unterbrechungen (Bull et al. 1999, Zhu et al. 2000). Untersuchungen an der Ziege (Pepin et al. 1995) zeigten, dass die Zahl der Allele von Dinucleotid-Mikrosatelliten, die Unterbrechungen enthalten, stark vermindert ist. Bei Schaf und Rind zeigten Mikrosatelliten, die eine AATA-Unterbrechung enthalten, im Mittel drei Allele (Adams u. Maddox 1994, Kirkpatrick 1992), während die Zahl der Allele für Mikrosatellitenloci ohne AATA-Unterbrechung mindestens bei fünf bzw. sechs liegt (Kirkpatrick 1992, Caetano u. Bowling 1998). Die Unterbrechung TT innerhalb des $(GT)_n$ -Motivs bei *Apis mellifera* (Honigbiene) (Estoup et al., 1995) und die Unterbrechung CAT innerhalb des $(CAG)_n$ -Motivs beim Menschen (Chung et al. 1993, zit. nach Shariflou u. Moran 2000) führen ebenso zu einer Erniedrigung der Variabilität der Allelzahl (sh. auch Shariflou u. Moran 2000).

Die Allelzahl variiert auch je nach Lokalisation der Mikrosatelliten im Genom. Besonders polymorph sind die Mikrosatellitenloci, die mit dem MHC-Komplex gekoppelt sind (Schwaiger u. Epplen 1995). Solche Loci können mehr als 50 Allele haben. Normalerweise liegen die Allele in einem bestimmten Längenbereich.

Bei kurzen Allelen wird kein Slippage erzeugt und lange Allele werden durch Punktmutationen unterbrochen, die nach Akkumulation weiterer Mutationen ihre

Mikrosatelliteneigenschaften verlieren (Zhu et al. 2000). Bell und Jurka (1997) stellten fest, dass 30 Wiederholungseinheiten eine kritische Grenze darstellen und fast alle Mikrosatellitenallele innerhalb dieser Grenze liegen. Die häufigsten Allele enthalten 5 bis 10 Wiederholungseinheiten.

2.6.1 Art und Häufigkeit von Mutationen in Mikrosatellitenloci

Die Mutationsraten der Mikrosatelliten variieren zwischen 10^{-6} bis 10^{-2} pro Generation und Locus (Schlötterer 2000). Sie sind somit bedeutend höher als Basensubstitutionen. Experimente in *Escherichia coli* zeigten, dass Mikrosatelliten, die in M13 kloniert wurden, Wiederholungseinheiten verlieren oder gewinnen (Levinson u. Gutman 1987a). Zwei Mechanismen können den Mutationsablauf in Mikrosatelliten-DNA erklären: DNA-Polymerase-Slippage (Moore 1983, Tautz u. Renz 1984, Levinson u. Gutman 1987b) sowie ungleiches Crossing over (Smith 1976). Interessant ist, dass DNA-Bereiche mit bzw. ohne funktionelles Rekombinationssystem sehr ähnliche Mutationsraten in Mikrosatelliten haben, was dafür spricht, dass die Rekombination nicht der primäre Mechanismus der Generierung der Mikrosatellitenvariabilität ist (Schlötterer 2000). Abb. 4 (S. 22) stellt schematisch das Slippage-Modell dar. Es ist von Bedeutung, an welchem DNA-Strang Slippage stattfindet. Findet er an dem Leitstrang statt, dann verliert der Mikrosatellit eine Wiederholungseinheit. Findet Slippage jedoch am Folgestrang statt, gewinnt der Mikrosatellit bei der weiteren Extension eine Wiederholungseinheit hinzu. *In-vitro*-Experimenten beweisen, dass Slippage in Mikrosatelliten mit sehr hohen Raten stattfinden (Hentschel 1982, Streisinger u. Owen 1985, Schlötterer u. Tautz 1992). Die Diskrepanz zwischen den hohen Mutationsraten bei *In-vitro*-Experimenten und den *in-vivo* beobachteten Mutationsraten von 10^{-6} bis 10^{-2} kann durch Wirkung des Mismatch-Reparatur-Systems erklärt werden (Schlötterer 2000).

Verschiedene Faktoren können die Mutationsrate von Mikrosatelliten beeinflussen:

- Repeatzahl: Verschiedene Beobachtungen sprechen dafür, dass eine positive Korrelation zwischen der Wiederholungszahl und der Mutationsrate gegeben ist (Weber u. Wong 1993, Brinkmann et al. 1998, Schlötterer et al. 1998, Schug et al. 1998, Falush u. Iwasa 1999).

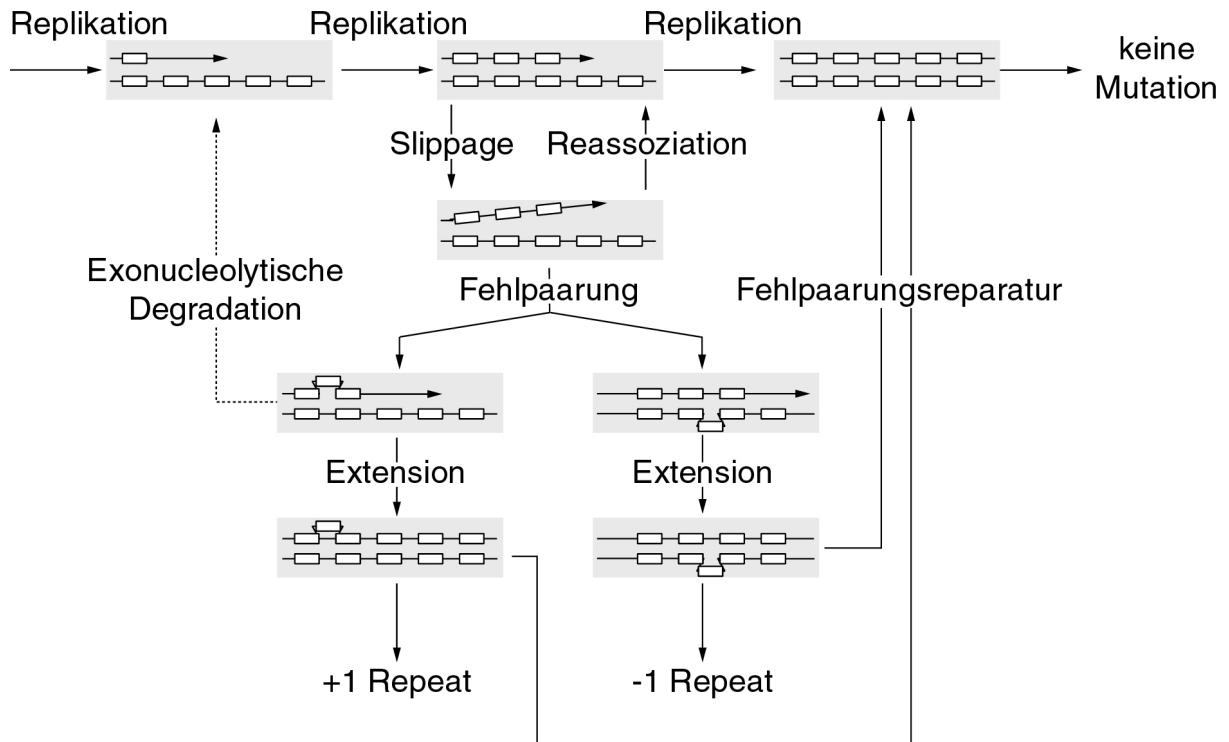


Abb. 4: Darstellung der Mutationsprozesse in Mikrosatellitenloci durch Slippage (nach Eisen 1999)

- Repeatlänge: Mikrosatelliten mit Dinucleotid-Wiederholungen haben im Allgemeinen eine größere Mutationsrate als solche mit Tri- oder Tetranucleotiden (Chakraborty et al. 1997, Kruglyak et al. 1998).
- Repeatsequenz: Der GT-Gehalt in der Mikrosatellitensequenz korreliert positiv mit der Mutationsrate (Wierdl et al. 1997, Schlötterer 1998). Unterbrechungen in Mikrosatellitensequenzen erhöhen die Stabilität der Mikrosatelliten-DNA (Macaubas et al. 1997, Garza et al. 1995, Zhu et al. 2000).
- Effizienz des Mismatch-Reparatur-Systems: Eine zunehmende Instabilität von Mikrosatelliten wurde bei Individuen beobachtet, die Mutationen in Proteinkodierenden Gene aufweisen, die für die Expression von Mismatch-Reparatur-System-Proteinen verantwortlich sind (Sia et al. 1997, Wierdl et al. 1997, Schlötterer 1998).

- Geschlecht: Männliche Individuen haben höhere Mutationsraten in der Mikrosatelliten-DNA im Vergleich zu weiblichen (Brinkmann et al. 1998).
- Flankierende DNA-Sequenzen: Vermutlich korreliert der GC-Gehalt in den flankierenden Sequenzen der Mikrosatelliten negativ mit der Mutationsrate der Mikrosatelliten (Glenn et al. 1996). Allerdings fanden Balloux et al. (1998) keine Korrelation zwischen dem GC-Gehalt in flankierenden Sequenzen und der Mutationsrate.

Aufgrund der Einflussfaktoren variiert die Mutationsrate nicht nur zwischen verschiedenen Typen von Wiederholungen sowie zwischen verschiedenen Loci mit dem gleichen Wiederholungstyp, sondern auch zwischen verschiedenen Allelen des gleichen Locus (Schlötterer 1998).

2.7 Anwendungsmöglichkeiten der Mikrosatellitenloci

Wegen ihrer hohen Polymorphiegrade und ihres häufigen Vorkommens im Genom werden Mikrosatelliten für viele genetische und medizinische Untersuchungen verwendet. Nicht zuletzt, weil der Einsatz von Mikrosatellitenmarker wenig Zeit- und Materialaufwand erfordert, haben sie die klassischen RFLP-Marker fast vollständig ersetzt (Lottspeich u. Zorbas 1998). Mikrosatelliten sind die hauptsächlichen Marker für die Genomkartierung, Elternschaftskontrollen und Populationsanalysen.

2.7.1 Genomkartierung

Marker für die Genomkartierung sollen homogen im Genom verteilt, einfach darzustellen, informativ und vergleichbar sein. Mikrosatelliten erfüllen diese Kriterien (z. B. Litt u. Luty 1989). Gegenwärtig gibt es das ganze Genom abdeckende genetische Karten mit Mikrosatelliten-Markern in Abständen von 0,5 - 2 cM. Mikrosatelliten werden daher häufig für Kopplungsanalysen benutzt, so z. B. für die Durchführung einer QTL-Kartierung (z.B. Yue et al. 1999) und die ungefähre Chromosomenlokalisierung von Krankheitsgenen (z.B. Riquet et al. 1999, Bennet 2000). Der aktuelle Status der genetischen Karten ist für die einzelne Spezies im Internet verfügbar (z.B. für Rind: <http://www.locus.jouy.inra.fr>, für Schaf: <http://sol.mare.usda.gov>)

2.7.2 Elternschaftskontrollen

Mikrosatelliten werden intensiv für Elternschaftskontrollen in vielen Spezies verwendet. Ein Vorteil der Mikrosatelliten-Methode besteht in der Möglichkeit, DNA aus verschiedenen Quellen benutzen zu können. Sehr kleine DNA-Menge können ausreichen, weil die PCR-Amplifikation sensitiv ist. Die Multiplex-PCR erlaubt es zudem, verschiedene Systeme simultan zu entwickeln, indem mehrere Mikrosatelliten (bis zu 12 Loci in einem Multiplexansatz) gemeinsam analysiert werden (z.B. [Binns et al. 1995](#), [Heyen et al. 1997](#)). Unter der Annahme, dass jedes Individuum einen einmaligen Satz von Allelen trägt, werden Mikrosatelliten-Allelmuster zwischen Nachkommen und möglichen Eltern verglichen und damit die Elternschaft bestimmt. Ein prominentes Beispiel ist die Bestätigung der Herkunft des Schafes Dolly – dem ersten geklonten Säugetier, mit Hilfe von zehn Mikrosatellitenloci ([Ashworth et al. 1998](#)). Mikrosatelliten erlauben sogar einen Speziesübergreifende Einsatz für Elternschaftskontrollen. Ein Beispiel dafür ist die Verwendung von elf polymorphen Mikrosatelliten, die zunächst für Schaf und Rind definiert wurden, für Elternschaftskontrollen beim Nordamerikanischen Elch ([Talbot et al. 1996](#)).

2.7.3 Analysen der Populationsstruktur

Als genetische Marker werden Mikrosatelliten für den Vergleich von Populationen benutzt und stellen wertvolle Werkzeuge für Dokumentation gefährdeter Rassen sowie der Domestikation und Migration von wichtigen Nutztieren dar ([MacHugh et al. 1994](#)).

Mit Hilfe von Mikrosatelliten gewinnt man Information über die genetische Variabilität (Allelzahl, Allelfrequenz und Heterozygotiegrad) innerhalb einer Population und kann somit z.B. die genetische Drift schätzen ([Roy et al. 1994](#)).

2.8 Kenntnisstand über Mikrosatellitenloci beim Kamel

Mehrere Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der Sequenzierung und Prüfung neuer Mikrosatellitenmarker bei Kameliden ([Tab. 2, S. 26](#)). [Lang et al. \(1996\)](#) charakterisierten 15 polymorphe dinucleotide Mikrosatelliten in Lama und Alpaka und prüften diese in 50 unverwandten Tieren. Eine andere Gruppe ([Obreque et al. 1998a, u. b 1999](#)) analysierte insgesamt 23 Mikrosatellitenloci beim Alpaka. [Penedo et al.](#)

(1999a, 1999b) untersuchten 14 Mikrosatellitenloci beim Lama. McPartlan et al. (1998) charakterisierten zwei weitere Mikrosatellitenloci beim Alpaka. Mehrere Mikrosatellitenloci wurden erfolgreich bei der Charakterisierung von Neuweltkameliden-Rassen eingesetzt (Rieder et al. 2000).

Eine weitere Zielrichtung ist die Prüfung der Verwendungsmöglichkeiten von Alpaka- und Lama-Mikrosatellitenloci bei Altwelt-Kamelen. Sasse et al. (2000) testeten 37 neue Mikrosatellitenloci, die bei Lama und Alpaka charakterisiert wurden, beim Dromedar. Jianlin et al. (2000) setzten 20 neue Neuweltkameliden-Primer beim Dromedar und Trampeltier ein. 19 Loci wurden erfolgreich amplifiziert. Mit den Arbeiten wurde eine speziesübergreifende Verwendung von Primern zwischen Neu- und Altweltkameliden bewiesen.

Tab. 2: Untersuchungsbeispiele an Mikrosatellitenloci bei Kameliden

Spezies	Zahl der Tiere	Zahl der Loci	Zahl der Allele	Fragmentlängen(bp)	Heterozygotie [%]	PIC	EP [%]	Autoren
Lama Alpaka	30 20	15	2-13	86-290	-	0,269-0,845	14-70	Lang et al. (1996)
Alpaka	57	2	3 3	142-201 195-201	43 53	0,352 0,443	19-28 25-30	McPartlan et al. (1998)
Alpaka	36	10	2-12	129-247	8-80	0,077-0,802	-	Obreque et al. (1998a)
Alpaka Guanaco Lama Vicugna	32 16 14 16	19	-	-	-	-	-	Obreque et al. (1998b)
Alpaka	30	13	3-13	136-256	15-77	0,249-0,863	-	Obreque et al. (1999)
Alpaka Lama Guanaco	70 70 70	8	6-24	133-263	56-86	-	-	Penedo et al. (1999a)
Lama Alpaka	50 50	6	5-14	108-263	29-78	-	-	Penedo et al. (1999b)
Lama Alpaka Guanako Vicugna	70 15 4 2	6	3-13	-	23-90	0,21-0,89	13-85	Rieder et al. (2000)
Dromedar Trampeltier	34 34	20 (19*)	1-18 1-15	105-268 101-262	52-55	-	-	Jianlin et al. (2000)
Dromedar	52	37 (24*)	1-19	90-114 290-304	0-87	0,00-0,858	0-65	Sasse et al. (2000)
Dromedar Trampeltier Lama Alpaka	20 26 6 4	61	-	-	-	-	-	Han et al. (2000)

*) : Zahl der Loci mit spezifischen PCR-Amplifikationen bei speziesübergreifender Verwendung der Primer; PIC: Polymorphism Information Content, EP:Exclusion Probability; -: keine Angaben.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiermaterial

Das Tiermaterial für die Untersuchung der Informativität neuer Mikrosatellitenloci bestand aus insgesamt 57 Tieren. Die Einteilung der untersuchten Tiere nach Spezies und Herkunftsregion ist in Tab. 3 zusammengefasst. Für Populationsuntersuchungen wurden zusätzlich 200 Dromedare verschiedener Rassen aus Kenia einbezogen (Tab. 4, S. 28).

Tab. 3: Tiermaterial für den Informativitätstest

Spezies	Tierzahl	Herkunft (Population)	Verwandtschaft ^{*)}
Trampeltier (<i>Camelus bactrianus</i>)	20	Russland (Altaj-Gebirge)	-
	1	Deutschland (Zoo Wilhelma, Stuttgart)	-
	2	Deutschland (Zoo München)	-
	4	Deutschland (Heidelberg-Tiergarten)	-
	27	Insgesamt	-
Dromedar (<i>Camelus dromedarius</i>)	6	Kenia (Rasse Turkana)	Nicht verwandt
	5	Kenia (Rasse Somali)	Nicht verwandt
	4	Kenia (Rasse Pakistan)	Nicht verwandt
	5	Kenia (Rasse Pokot)	Nicht verwandt
	20	Insgesamt	
Lama (<i>Llama glama</i>)	6	Deutschland (Oberer Hardthof- Tiergarten, Universität Gießen)	-
Alpaka	4	Deutschland (Hellabrunn-Tiergarten)	-

-: keine Angaben; ^{*)} – zwischen Tieren einer Population/Spezies

Tab. 4: Dromedare für Populationsuntersuchungen

Rasse	Geschlecht				insgesamt
	weiblich	männlich	Kastrat	unbekannt	
Turkana	30	12	9	1	52
Somali	32	21	0	0	53
Rendille	23	20	0	0	43
Gabra	23	8	21	0	52
Insgesamt	107	61	30	1	200

3.1.1 Trampeltiere aus Rußland und Deutschland

Die Trampeltiere aus Deutschland stammten aus verschiedenen Zoos und Tiergärten. Nähere Angaben waren für diese Tiere nicht verfügbar. Eine Beschreibung der russischen Trampeltiere ist in [Tab. 5](#) (S. 29) zu finden. Die Tiere spielen in der Wirtschaft der Region eine wichtige Rolle als Milch- und Fleischproduzenten. Die 20 russischen Trampeltiere stammen aus dem Gebiet Kosch-Agach, ca. 100 km von der mongolischen Grenze entfernt ([Abb. 5](#), S. 30). Das Gebiet liegt auf einem Gebirgsplateau ca. 2000 ü.d.M. Die klimatischen Bedingungen des Gebietes sind extrem und zeigen Temperaturabweichungen von -40°C im Winter bis zu $+30^{\circ}\text{C}$ im Sommer. Die Vegetationsperiode dauert vier Monate von Mai bis August.

Alle Trampeltiere wurden in einem landwirtschaftlichen Betrieb erfasst, der mehrere Trampeltierherden hält. Jeweils 10 ml Blut wurden von Tieren aus zwei verschiedenen Herden (Chapaewo und Ortolik) entnommen.

3.1.2 Dromedarrassen aus Kenia

In die Untersuchungen wurden insgesamt 220 Dromedare aus Kenia einbezogen ([Tab. 4](#)). Die einbezogenen Rassen kommen in den Regionen Marsabit und Turkana im Norden Kenias vor ([Abb. 6](#), S. 32). Die Rasse Turkana wird in der gleichnamigen Region gehalten, die anderen Rassen sind in der Region Marsabit zu finden. Die Rassenbeschreibungen sind in [Tab. 6](#) (S. 31) zusammengefasst. Die Rasse Gabra wird von der FAO als Subrasse von Rendille aufgefasst (<http://dad.fao.org>), so dass keine Angaben für diese Rasse verfügbar sind.

Tab. 5: Eigenschaften der russischen Trampeltiere (<http://dad.fao.org>)

Allgemeine Information	Spezies	Camelus bactrianus
	Name	Mongolisches Trampeltier
	Domestikationsstatus	Domestiziert
	Land	Russische Föderation
	Region	Altaj Republik; Kosch-Agach
	Nutzung (in der Reihenfolge der Bedeutung)	Lasttiere; Arbeitstiere; Milch; Fleisch; Wolle
	Risikostatus	Gefährdet
Morphologie (Durchschnittswerte)	Gewicht der erwachsenen Tiere [kg]	525 (m), 493 (w)
	Größe der erwachsenen Tiere [cm]	172 (m), 167 (w)
	Farbe	Weiß bis dunkel-braun
Leistungen (Durchschnittswerte)	Geburtsgewicht [kg]	37 (m), 36 (w)
	Milchleistung pro Laktation [kg]	548
	Laktationslänge [Tage]	528
	Milchleistung pro Tag [Liter]	max. 14
	Milchfett [%]	5,6
	Vliesgewicht [kg/Jahr]	5
	Länge der Wollfaser [mm]	100
	Faserdurchmesser [μm]	25
	Reitleistung [km/Tag]	60-70
	Transportleistung mit Gepäck [km/Tag]	30-40

m: männlich; w: weiblich

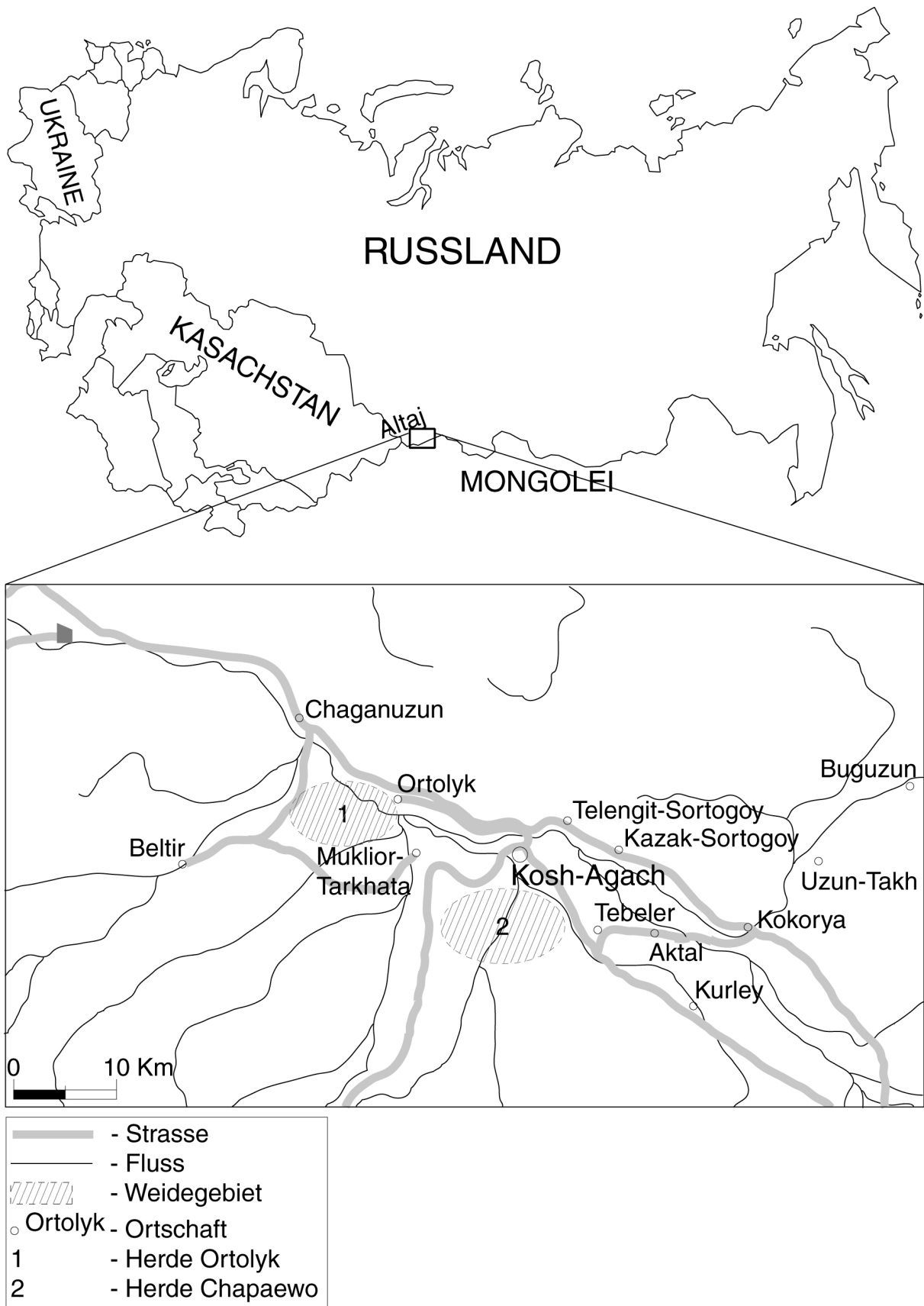


Abb. 5: Karte der Kosh-Agach-Region mit dem Weidegebiet der untersuchten Trampeltier-Herden

Tab. 6: Eigenschaften der Dromedar-Rassen Kenias (<http://dad.fao.org>)

Region Nutzung (in der Reihenfolge der Bedeutung)	Turkana Lasttiere; Milch	Marsabit Arbeitstiere; Lasttiere; Milch	Marsabit Lasttiere; Milch
Gewicht der erwachsenen Tiere [kg]	425 (m), 350 (w)	650 (m), 575 (w)	450 (m), 400 (w)
Größe der erwachsenen Tiere [cm]	200 (m), 170 (w)	200 (m)	180 (m), 170 (w)
Farbe	Dunkelfarbig	Hellfarbig mit vielen kleinen Haaren auf dem Höcker und der Schulter	Weiß, hellgrau, beige und rot-braun
Spezifische sichtbare Eigenschaften	Stark behaart, kleine Fußballen	Große Fußballen, langsame Bewegungen,	
Geburtsgewicht [kg]	25 (m), 22 (w)	35 (m), 30 (w)	30 (m), 25 (w)
Milchleistung pro Laktation [kg]	850	1650	1000
Laktationslänge [Tage]	300	425	365
Milchfett [%]	4,9	4,2	3,9

m: männlich; w: weiblich

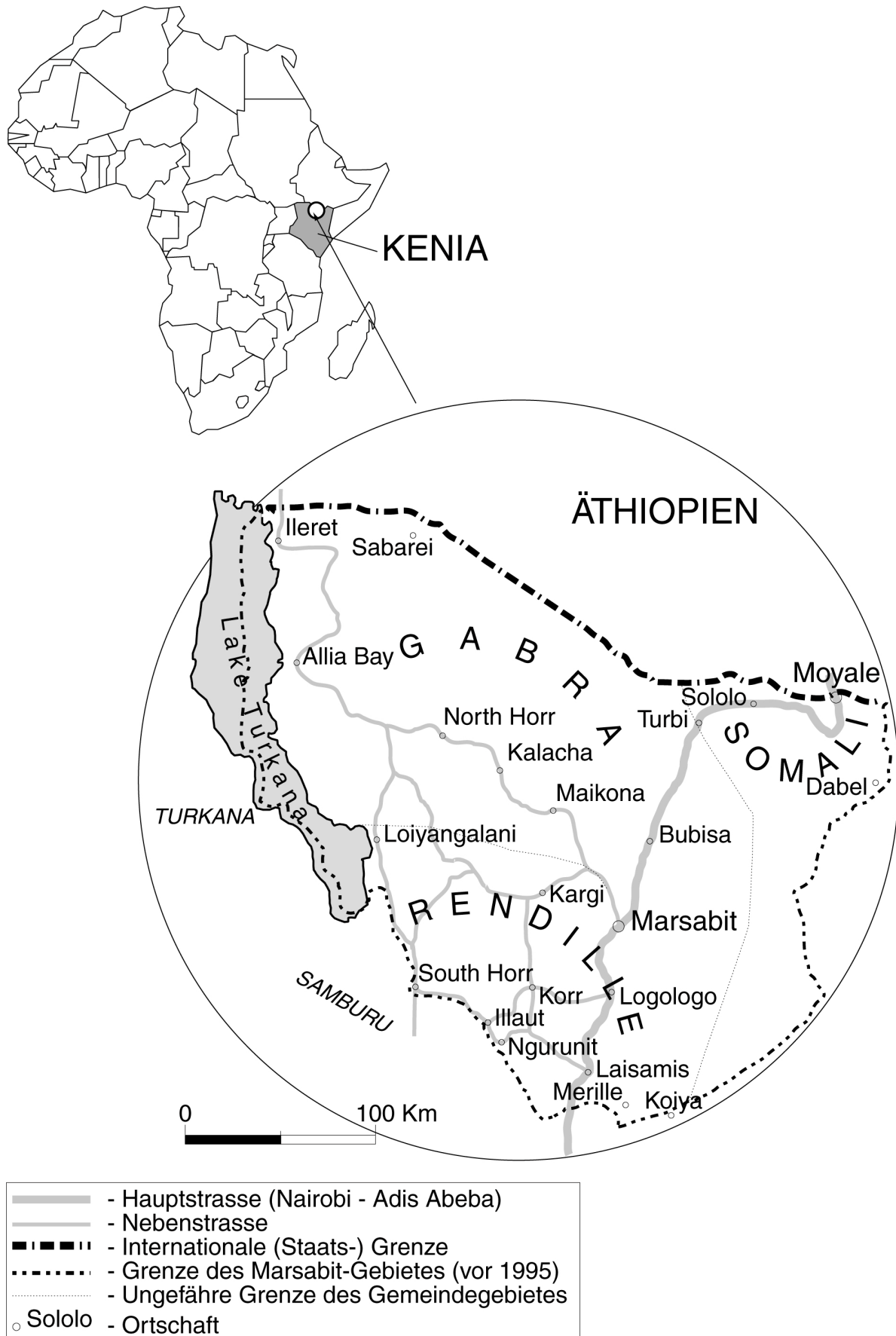


Abb. 6: Ausschnitt Nord-Kenias mit den Verbreitungsgebieten der untersuchten Dromedarrassen

3.2 Primer-Sequenzen

Es wurden Primerpaare für 34 Mikrosatellitenloci getestet. Die Mikrosatellitensequenzen, ihre Primer sowie die Zugriffsnummer für jeden Locus sind in der Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7: Untersuchte Mikrosatellitenloci und deren Primersequenzen (Angaben nach Han 2001)

Locus und ZN	Wiederholungs-Motiv	Primersequenz ^{*)} (5'=>3')
CMS1 AF329137	(AC) ₃ ..(AC) ₃ ..(AC) ₅	Blu-GTT CGC TCA GAG AAG GCA CT CTG CCT GGG ATT CTC TCT TG
CMS3 AF329138	(AC) ₃ ..(AC) ₃ ..(AC) ₅	Cy5-GCT CTC TGT GCC TCA ATA TG ACC ATA GTT CTG GGT AGC A
CMS9 AF329160	(CA) ₂ ..(CA) ₂₁	Cy5-TGC TTT AGA CGA CTT TTA CTT TAC ATT TCA CTT TCT TCA TAC TTG TGA T
CMS10 AF329145	(CA) ₇ ..(CA) ₅	Cy5-ATC AAC CTC TTT ATT TGG ACA T ATA TTT CCT TTC ATG CCT TAA TT
CMS13 AF329158	(CA) ₂₁ (CA) ₆	Cy5-TAG CCT GAC TCT ATC CAT TTC TC ATT ATT TGG AAT TCA ACT GTA AGG
CMS15 AF329151	(TG) ₂₁	Cy5-AAA TAC TTA AAG GTT CCC AGA TTG TAA ACT AAA GCC AGA AAG
CMS16 AF329157	(TG) ₁₇	Cy5-ATT TTG CAA TTT GTT CGT TCT TTC GGA GTT TAT TTG CTT CCA ACA CTT
CMS17 AF329147	(CA) ₁₀ (TA) ₃ CA(TA) ₄	Cy5-TAT AAA GGA TCA CTG CCT TC AAA ATG AAC CTC CAT AAA GTT AG
CMS18 AF329148	(TG) ₁₄	Cy5-GAA CGA CCC TTG AAG ACG AA AGC AGC TGG TTT TAG GTC CA
CMS23 AF329156	(TG) ₁₁ ..(TGTC) ₅ (T ₃ A) ₂ (TG)..(TGTC) ₅	AGA AAG GAT TTG ACA AGT TAA TCA Cy5-TCT AGA TTT TGT AGG GTT CAT TGT
CMS25 AF380345	(CT) ₂₇	Cy5-GAT CCT CCT GCG TTC TTA TT CTA GCC TTT GAT TGG AGC AT
CMS31 AF329139	(GT) ₃ ..(TTA) ₄	GAT CCT AAT CAA TAA AAG GGA GA Cy5-GGA AGG TAA GAT GGA CAG GA
CMS32 AF329146	(CT) ₄ ..(CA) ₁₃	Cy5-ACG GAC AAG AAC TGC TCA TA ACA ACC AAT AAA TCC CCA TT
CMS36 AF329144	(AC) ₉	AAA TTA CTG AAT TCC CCC CCT A Cy5-GTT ACA ACG CTC TCA TTC ATC

ZN: Zugriffsnummer; *) Erste Zeile: 5'-Primer, zweite Zeile: 3'-Primer.; Cy5-, Blu-: Markierungsfarbstoffe.

Tab. 7: Untersuchte Mikrosatellitenloci und deren Primersequenzen (Angaben nach Han 2001) (Fortsetzung)

Locus und ZN	Wiederholungs-Motiv	Primersequenz ^{*)} (5'=>3')
CMS43 AF329143	(TC) ₃ ..(CAA) ₂ ..-(CAA) ₂	Cy5-ATC ACC CTT CTC TCC CAG G GTC TTA GGC TCT TTT CCA TCT G
CMS44 AF329141	(TC) ₃ ..(CTT) ₂ ..-(TGG) ₂	GAA GTC AGT GGG GGT TTT GTC Cy5-GCC CTT TAC ACC AGA CCA GA
CMS50 AF329149	(GT) ₁₁ ..(GTCT) ₄	Cy5-TTT ATA GTC AGA GAG AGT GCT G TGT AGG GTT CAT TGT AAC A
CMS58 AF329142	(CA) ₁₈	Cy5-AAT ATA CAT CCT CCC AAC TGG T TTA TTT CTC TTA ACC CCT CTC TAA
CMS66 AF329150	(TG) ₂ ..(CCT) ₂ ..(AAGG) ₂	Cy5-ATCATAGAAGCCAGGGTTTG CGATACAACTTGCTCCAG
CMS102 AF329155	(AC) ₆ ..(AC) ₃ ..(CA) ₅	Cy5-TTC ATG TTT ATT TTC CCT CCT CA TGG CCT ATG TAT GCT GTG TAT CTT
CMS104 AF329154	(CA) ₇ ..(CA) ₅	TTA GGT CCC TGG GCT TTA TG Cy5-AAA TTG TGC ATT CTC TTG CAT C
CMS113 AF329152	(TGTC) ₃ (TC) ₄ (GT) ₂₁	Cy5-TTG GAA TTC AAC TGT AAG GAA GA GCT CTC ACT TTT CCA CTT TCT CT
CMS121 AF329159	(TG) ₁₁ ..(TG) ₅ ..(AG) ₈	Cy5-CAA GAG AAC TGG TGA GGA TTT TC AGT TGA TAA AAA TAC AGC TGG AAA G
CMS142 AF329140	(CAG) ₂ (GAG) ₂ ..(CA) ₃	CTG GAC AGG GGA GGT ATT TA Cy5-GCA GAA AGA AGA CGG ACC T
CMS144 AF329153	(TG) ₂ (TCCC) ₂	CTT CAA AAC TGC TGT GGA CT Cy5-CCC CAC CCT TAT GAC CTC
CMS27 ^{**))}	(CA) ₃ (CG) ₄ (CA) ₁₄	AGA AAT CCA ACT AAA AAC ACC A Cy5-ACA CAT TCC AGA ATT CAT TGC
"	"	CAG AAT TCA TTG CAT TTG ATT TAC GC Cy5-AGA AAT CCA ACT AAA AAC ACC ATG CA
CMS99	(CA) ₄ ..(TC) ₃	Cy5-TCA CAA AGT TAA ACC TGA GTC T CTG AGA AAG CAG AGA AAA AGT
CMS105	(GT) ₉	GGG ATG TAT AAT TCC TTA CAT TTC AT Cy5-CTG CAG AAC AGT ATT TCC ATA GTC A
CMS108	(TG) ₇ ..(TG) ₇	TCA CAG GGA AGT TCA TAA GAC T Cy5-TTG CTT AAT AGT AGA GAA CTA ACA T
CMS110	(TC) ₃ C(CT) ₄ (AC) ₁₅	TTT AAT CAA TGA GAC TTC ATT GA Cy5-TGT CAG ATG CAT GAG AAG C

ZN: Zugriffsnummer; ^{*)} Erste Zeile: 5'-Primer, zweite Zeile: 3'-Primer.; Cy5-, Blu-: Markierungsfarbstoffe.

Tab. 7: Untersuchte Mikrosatellitenloci und deren Primersequenzen (Angaben nach Han 2001), (Fortsetzung)

Locus und ZN	Wiederholungs-Motiv	Primersequenz ^{*)} (5'=>3')
CMS116	(CA) ₉	TGC CGC ATC AGG GAT AAA CGT TCA TA Cy5-TGT CTG TCA ATG AAT GGG TAA AGA CA
CMS1212	(TC) ₃ ..(AC) ₄	Cy5-CCA CTG CAT ATG CCT TTT TGT A CCA TGA GCC TCA GCT GTA ATA CT
R3	(AC) ₄ ..(AC) ₃ ..(AC) ₄	AGT ATG AAC GCC AGG GTA GC Cy5-AAA CTC TGA ATG GGG CCT GT
CAG5	(GA) ₃ ..(GGT) ₂	Cy5-CAG GTA GGG CTT GTT CAT AG ATC ATG CGG CAA ACA CAT

ZN: Zugriffsnummer; *) Erste Zeile: 5´-Primer, zweite Zeile: 3´-Primer.; Cy5-, Blu-: Markierungsfarbstoffe.

3.3 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

Alconox, Inc. New York:	Alconox
Appligene, Heidelberg:	Proteinase K
Biozym Diagnostik, Hess.Oldendorf:	Hydrolink Long Ranger™ Gel Solution (50%-ige Stammlösung)
Costar, Bodenheim:	Pipettenspitzen
Eppendorf, Hamburg:	Polyethylen-Reaktionsgefäße (2,0 ml, 1,5 ml, 0,5 ml und 0,25 ml)
Gibco, Eggenstein:	Harnstoff
InViTek, Berlin:	InViTAQ™-DNA-Polymerase, 10x PCR- Buffer
MBI Fermentas, St. Leon-Rot:	Lambda-DNA

Merck, Darmstadt:	Essigsäure, Borsäure, EDTA, Ethanol, HCl, KCl, MgCl ₂ , NaCl, NaOH, Saccharose, Tris
Pharmacia, Freiburg:	dNTP-Set, Harnstoff, EDTA, Bindsilan, Borsäure, Dextranblau
Roth, Karlsruhe:	Phenol, Chloroform, Sacharose, TEMED, Tris, APS
Schleicher & Schuell, Dassel:	Sterilfilter, Membranfilter
S-Monovette, Nümbrecht	Blutentnahmesysteme, Multiadapter, Kanülen
Serva, Heidelberg:	APS, Ethidiumbromid, Triton-X-100
Sigma, Deisenhofen:	DTE, Formamid, Mineralöl, Nonidet P40 (NP40)

3.4 Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Puffer und Lösungen mit entmineralisiertem ($\leq 18,2$ Mega-Ohm) und ultrafiltriertem Wasser hergestellt und bei 4 °C aufbewahrt.

Hydrolink-Stammlösung:	0,5 % (v/v) Hydrolink Long Ranger Gel Solution; 42 % (w/v) Harnstoff; 6 % (v/v) 10xTBE-Puffer
A.L.F.-Stopp-Puffer:	50 ml Formamid, 6 mg/ml Dextranblau, 1µl 1M EDTA, pH 8,3
APS-Stammlösung:	10 % (w/v) APS
Bindsilan-Stammlösung:	40 ml 98 % Ethanol, 150 µl Bindsilan

Bindesilan-Lösung:	160 µl Bindesilan-Stammlösung, 40 µl Essigsäure (10 %, v/v)
Citrat-Lösung:	2 % (w/v) Na-Citrat; 0,5 % (w/v) NaCl
Lysis-Puffer:	10 mM Tris-HCl; 320 mM Saccharose; 5 mM MgCl ₂ ; 10% (v/v) Triton-X-100; pH 7,5
PCR-Buffer:	50 mM KCl; 2,5 mM MgCl ₂ ; 0,1 mg/ml Gelatine; 0,45 % (v/v) Tween 20 TM ; 45 % (v/v) Triton-X-100; pH 7,5
Proteinase K-Lösung:	1 % (w/v) in H ₂ O
Ethidiumbromid-Lösung:	50 µg/µl in H ₂ O
10xTBE-Puffer:	1000 mM Tris-HCl, 830 mM Borsäure, 10 mM EDTA; pH 8,2
10xTE-Puffer:	100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH 7,8

3.5 Geräte

Applingen, Heidelberg:	Thermocycler (Crocodile II)
Beckman, München:	J2-21 Kühlzentrifuge mit Rotor JA-20
Biometra, München:	PTC-200 Thermocycler
Heraeus Sepatech, Osterode:	Biofuge A mit Rotor 1386
Perkin Elmer, Überlingen:	UV-VIS Lambda 5 Photometer
Pharmacia, Freiburg:	A.L.F.-DNA-Sequenzierautomat

3.6 Probengewinnung

Genomische DNA wurde aus Vollblut bzw. aus angereicherten Leukozytenfraktionen gewonnen. Für die DNA-Isolierung aus Vollblut wurden 10 ml venöses Blut pro Tier in einer Monovette gewonnen und danach entweder eingefroren oder mit ca. 5 g NaCl vorsichtig gemischt und bei +4 °C gelagert. Aus dem Blut der kenianischen Kamele wurde die Leukozytenfraktion gewonnen. Dabei wurde das Blut 20 min bei 4000 - 6000 x g zentrifugiert. Die Leukozytenfraktion wurde anschließend abgenommen (ca. 1,5 ml), davon wurde 0,75 ml mit 0,75 g NaCl gemischt und bei +4°C gelagert. Alle Blutproben wurden danach zur Universität Hohenheim transportiert und bei -20°C gelagert.

3.7 Isolierung genomischer DNA

Für die DNA-Isolierung wurden je nach Konservierungsmethode verschiedene Protokolle benutzt.

3.7.1 Schnelle Aufarbeitung aus Blut

Dieses Protokoll ist für die Isolierung der DNA aus gefrorenem Vollblut ohne Konservierungsstoffe geeignet. Nach dem Auftauen wurden 0,5 ml des Blutes und 0,5 ml Lysis-Puffer mit Hilfe einer Pipette gemischt, 2 bis 3 min geschüttelt und dann 2 min bei 8600 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgegossen. Das Pellet wurde mit frischem Lysis-Puffer (0,5 ml) resuspendiert. Die Suspension wurde mit Lysis-Puffer auf 1 ml aufgefüllt und in der Biofuge 1 min bei 8600 x g zentrifugiert. Der Waschschrift mit Lysis-Puffer wurde zweimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugierungsschritt wurde die Flüssigkeit abgegossen und das Pellet mit 0,5 ml PCR-Puffer resuspendiert. Der proteolytische Abbau der Zellproteine erfolgte durch Zugabe von 10 bis 30 µl (je nach Pelletgröße) Proteinase-K-Lösung und anschließender einstündiger Inkubation im Wasserbad bei 55 °C.

3.7.2 Aufarbeitung von salzkonservierten Proben

Für die DNA-Extraktion aus salzkonserviertem Blut bzw. aus der angereicherten Leukozytenfraktion wurde ein modifiziertes Protokoll benutzt. Die Änderungen betrafen zusätzliche Schritte für die Salzentfernung. Zunächst wurde 0,5 ml

salzkonservierte Blutprobe mit 10 ml Lysis-Puffer gemischt und 30 min rehydriert. Danach wurde die Lösung 5 min bei 7700 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und dann erneut 10 ml Lysis-Puffer zugegeben. Die Proben wurden bei gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Nach dem dritten Waschschrift wurde das Pellet mit 0,5 ml Lysis-Puffer resuspendiert und 2 min bei 8600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und danach das Pellet mit 0,5 ml PCR-Puffer resuspendiert. Der Abbau der Zellproteine durch Proteinase K wurde entsprechend dem Protokoll „Schnelle Aufarbeitung aus Blut“ durchgeführt.

3.7.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Proteinase K wurde durch Phenolextraktion inaktiviert und entfernt. In der wässrigen Phase gelöstes Phenol wurde durch erneute Extraktion mit Chloroform beseitigt. Nach Abschluss der Inkubation mit Proteinase-K-Lösung wurden zu jeder Probe 400 µl Phenol und 400 µl Chloroform zugegeben und die Proben 2 min geschüttelt, dann 5 min stehen gelassen und nach weiterem einminütigem Schütteln 10 min bei 8600 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reagiergefäß pipettiert. Es wurden danach 800 µl Chloroform zugegeben, 2 min geschüttelt und 10 min bei 8600 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen (ca. 400 µl), in ein neues Reagiergefäß pipettiert und dann im Kühlschrank gelagert.

3.7.4 Präzipitation mit Ethanol

Als Methode zur Konzentrierung und weiteren Reinigung von DNA wurde die Präzipitation mit Ethanol angewendet.

Zunächst wurden alle Proben mit Wasser auf dasselbe Volumen eingestellt. Dazu wurden 10% v/v 3 M Na₂CO₃-Lösung (pH 5,2) gegeben. Der Ansatz wurde geschüttelt und mit dem 2,5-fachen Volumen eiskalten 98 %-igem Ethanol versetzt. Die Proben wurden ü.N. bei -20 °C aufbewahrt. Nach 45-minütiger Zentrifugation bei 8600 x g wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und 0,5 ml eiskaltes 70%-iges Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde 8 min bei 8600 x g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgegossen und das Pellet mit 0,5 ml eiskaltem 70%-igem Ethanol vermischt. Dann wurde wiederum unter gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Die Proben wurden 15 min bei RT getrocknet und danach in 100 µl einfach konzentriertem TE-Puffer (pH 8) ü.N. bei RT gelöst. Die Langzeitlagerung erfolgte bei 4 °C.

3.8 Kontrolle der DNA-Qualität

Die Kontrolle der DNA-Qualität erfolgte mit Hilfe der Elektrophorese im 1 %igen Agarosegel. Zu diesem Zweck wurden 10 µl DNA-Lösung von jeder Probe genommen, mit 3 µl Stopppuffer gemischt und danach im Gel aufgetragen. Es folgte eine Elektrophorese bei 70 V für 1 h. Das Gel wurde nach der Elektrophorese 30 min in Ethidiumbromid-Lösung gelegt und danach unter UV-Licht photographiert.

3.9 Überprüfung und Messung der DNA-Konzentration

Für die Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit wurde jede Probe mit TE-Puffer 1:20 verdünnt und danach photometrisch bei 260 und 280 nm gemessen. Aus den Messwerten wurden die Konzentrationen von DNA und Protein wie folgt errechnet. Hierbei wurde die Formel benutzt:

$$OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnung}/1000 = \mu\text{gDNA}/\mu\text{l}$$

3.10 PCR-Amplifikation der Mikrosatellitenloci

Die Mikrosatelliten wurden mit Hilfe der PCR dargestellt. Für eine PCR wurden folgende Komponenten verwendet:

- Locusspezifisches Primerpaar (flankierende Sequenzen der jeweiligen Mikrosatellitenloci), wobei ein Primer mit Cy-5 oder Blu markiert war,
- DNA-Template (genomische DNA, die aus Blutproben von Kamelen isoliert worden war, einer Konzentration von 70 - 110 µg/µl),
- Taq-DNA-Polymerase,
- ein Gemisch der vier Deoxynucleotide (dNTPs),
- Reaktionspuffer, 10-fach konzentriert, sowie
- 50 mM MgCl₂-Lösung.

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mit der Agarosegel-Elektrophorese.

3.10.1 Durchführung der PCR

Zuerst wurde ein Reaktionsgemisch hergestellt, das alle Komponenten für die Reaktionsansätze außer der DNA-Matrize enthielt (Tab. 8). Die PCR-Programme folgten einem bestimmten Temperaturprofil, das pro Locus separat optimiert worden war. Die Ausgangsbedingungen für ein solches PCR-Programm werden in Tab. 9 dargestellt und das PCR-Reaktionsgemisch Loci ist Tab. 10 (S. 42) zu entnehmen.

Tab. 8: Beispiel für die Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsgemisches für ein Volumen von 25 µl

Komponente	Menge bzw. Konzentration
Primer 1	10-50 pMol
Primer 2	10-50 pMol
DNTPs	0,1-0,5 mM
MgCl ₂	0,5-5 mM
Taq-Polymerase	0,5-2,5 U
Reaktionspuffer	1x

Tab. 9: Ausgangs-PCR-Programm

Vorgang	Temperatur (C°)	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung	95	5 min	1
Denaturierung	95	45 sec	} 25-34
Primer-Hybridisierung	48-60	0,5-1 min	
Synthese	72	30 sec	
Synthese	72	5 min	1

Tab. 10: PCR-Reaktionsgemisch für die Ausgangsbedingungen

Zusammensetzung	Volumen (μl)	
H ₂ O	18,25	} Premix
10xPCR-Puffer	2,5	
MgCl ₂ (50 mM)	0,75	
DNTPs (100 mM)	0,25	
Primer 1 (10-50 pMol/ μl)	1	
Primer 2 (10-50 pMol/ μl)	1	
Taq-Polymerase (5U/ μl)	0,25	
DNA (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1	

Jeweils 24 μl Premix wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben. Danach wurde 1 μl DNA-Lösung (70 - 110 μg DNA/ μl) zugegeben und mit dem Premix gemischt. Dann wurden die Reaktionsgefäße in den Thermocycler platziert, und das Programm wurde gestartet. Nach Beendigung der PCR wurden die Produkte entweder sofort elektrophoretisch analysiert oder zunächst bei +4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.10.2 Optimierung der PCR-Bedingungen pro Locus

Dem PCR-Ausgangsprotokoll wurde pro Locus die Schmelztemperatur (Temperatur der Primer-Hybridisierung) auf Grund der Primerzusammensetzung zugrunde gelegt. Als Ausgangsprotokoll wurden die Bedingungen aus [Tab. 9](#) (S. 41) benutzt. Mit diesem Protokoll erfolgten Untersuchungen der DNA von sechs Testtieren (zwei Trampeltiere, zwei Dromedare, ein Lama und ein Alpaka). Nach Auftrennung der PCR-Produkte im Hydrolink-Gel war aus der Fragmentanalyse zu erkennen, ob die PCR-Bedingungen für den Locus passten oder weiter zu optimieren waren. Hierbei wurde folgende Optimierungsstrategie verwendet, und jeweils pro Versuch ein Parameter geändert:

- Wenn nach der ersten PCR bei keinem der sechs Tiere eine spezifische Amplifikation stattgefunden hatte, wurde die PCR für dieselben sechs Tiere mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen durchgeführt. Die Temperaturunterschiede zwischen den Gradient-Schritten betragen 1,3 bis 1,5 °C im Temperaturbereich zwischen 48 und 60 °C.

- Fanden in diesem Temperaturbereich keine Amplifikationen statt, wurden die Konzentrationen von MgCl₂, Primern und Taq-Polymerase jeweils separat in Schritten von jeweils ± 25% verändert.
- Wenn auch nach Änderungen der Konzentrationen keine Amplifikation stattgefunden hatte, wurde das Zeitprogramm der PCR verändert.

Für jeden zu optimierenden Locus wurde eine Negativkontrolle parallel durchgeführt, d.h. es wurde ein PCR-Premix ohne DNA-Matrize eingesetzt. Bei der Optimierung der PCR-Bedingungen wurde insbesondere auf zu geringe Amplifikation, Nebenprodukte und Slippage-Effekte geachtet. Nach ausreichender Optimierung der PCR-Bedingungen eines bestimmten Locus wurde die PCR mit allen Proben durchgeführt.

3.11 Fragmentlängenanalysen der PCR-Produkte

Die Fragmentlängenanalysen wurden mit dem A.L.F. DNA-Sequenzierautomaten (Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt.

3.11.1 Herstellung von Fragmenten als Längenstandards

Für die Bestimmung der Fragmentlängen mit dem A.L.F. DNA-Sequenzierautomaten wurden PCR-Produkte bekannter Fragmentlängen als Standard benutzt. Zu diesem Zweck wurden mit 5'-CY markierten Primern und Lambda-DNA als Template 80, 99, 119, 160, 198, 250, 300, 353 und 550 bp lange PCR-Produkte erzeugt. Die PCR-Bedingungen für die Herstellung der Längenstandards werden in [Tab. 11](#) und [12](#) (S. 44) beschrieben.

Die PCR-Produkte wurden mit Stopp-Puffer im Verhältnis 1:40 verdünnt und auf ein 5%-iges Hydrolink-Gel aufgetragen. Aus den Peakgrößen wurden Verdünnungen der Standards für die spätere Benutzung berechnet.

Tab. 11: PCR-Protokoll für die Herstellung der Längenstandards

PCR-Ansatz	Volumen (μ l)
H ₂ O	73,2
10xNH ₄ -Puffer	10,0
MgCl ₂ (50mM)	2,8
DNTPs (100mM)	1,0
Primer M0 (20 pmol/ μ l)	2,0
Primer MX (20 pmol/ μ l)	2,0
Template (λ -DNA, 0,3 mg/ml)	4,0
Taq-Polymerase (5U/ μ l)	1,0

Primer M0: markierter Primer, für jeden Längenstandard gleich.

Primer MX: jeweils ein spezifischer Primer für die gewünschte Fragmentlänge.

Tab. 12: PCR-Programm für die Herstellung der Längenstandards

Zyklus	Denaturierung	Hybridisierung	Synthese
1x	94°C (3 min)	58°C (1 min)	72°C (1 min)
30x	94°C (30 sec)	58°C (1 min)	72°C (1 min)
1x	94°C (30 sec)	58°C (1min)	72°C (5 min)

Die Standards wurden extern und auch intern benutzt. Der Abstand zwischen dem kleinsten und den größten Fragmenten des Standards lag meistens bei 100 bp und war nie größer als 250 bp.

3.11.2 Herstellung der Gele

Für die Elektrophoresen wurden 5%-ige denaturierende Hydrolink-Gele benutzt und zwei- bis dreimal verwendet. Für die Gelherstellung wurden zwei mit Wasser und Ethanol gründlich gereinigte Glasplatten benutzt. Der Bereich der Geltaschen wurde mit Bindsilan versehen, damit eine genügende Anbindung des Gels an die Glasplatten gesichert war. Die Glasplatten wurden seitlich mit Spacern (0,6 mm) versehen und abgedichtet. Im späteren Laserbereich wurden zwischen die Glasplatten spezielle Lichtkoppler eingelegt.

Nachdem die Glasplatten vorbereitet worden waren, wurden 60 ml Gellösung filtriert und dann 6 min entgast. Unmittelbar danach wurden der Gellösung 50 µl TEMED und 200 µl APS zugeben und mit Hilfe einer Spritze vorsichtig gemischt. Die Gel-Lösung wurde mit der Spritze zwischen die Platten eingefüllt. Abschließend wurde der Einsatzstellenformer platziert. Nach ca. 90-minütiger Polymerisation wurde die Gelplatte in die A.L.F.-Apparatur eingebaut und über einen 0,6xTBE-Puffer mit den Elektroden verbunden. Das Gel wurde dann auf 50 °C erwärmt und der Einsatzstellenformer entfernt.

3.11.3 Probenvorbereitung und Probenauftrag

Die PCR-Produkte (s. [3.10.1](#), S. 41) für einen bestimmten Locus wurden mit Längenstandards verdünnt. Dafür wurden 3 µl der Längenstandard-Lösung eingesetzt. Von den PCR-Produkten wurde zunächst 1 µl verwendet. Das Mischungsverhältnis von PCR-Produkt und Längenstandard-Lösung wurde aus den Ergebnissen der Elektrophorese abgeleitet. Der Ansatz wurde 2 min bei 95 °C denaturiert, dann sofort auf Eis gelegt und danach mit Hilfe einer Pipette in die Geltaschen gefüllt.

3.11.4 Elektrophorese

Die elektrophoretischen Bedingungen sind in [Tab. 13](#) (S. 46) wiedergegeben. Die Bedingungen wurden mit Hilfe der Software „ALF-Manager“ (Pharmacia Biotech, Freiburg) eingestellt.

3.11.5 Auswertung der Gele nach Elektrophorese

Die Auswertung des Gels wurde mit Hilfe des Programms „AlleleLinks“ (Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Dieses Programm erlaubte nach jedem Lauf eine Schätzung von Laufzeit (min), Peakhöhe (%), Peakfläche (%) und Fragmentlänge (bp).

Tab. 13: Bedingungen bei der Elektrophorese von PCR-Produkten am A.L.F.-DNA-Sequenzierautomaten

Parameter	Eingestellte Werte
Laufzeit	bis 210 min (bei DNA mit 550 bp)
Stromleistung	34 W
Stromspannung	1500 V
Stromstärke	45 mA
Temperatur	50° C
Detektionsintervall	2 sec

3.12 Statistische Methoden

Die für die untersuchten Mikrosatellitenloci gemessenen Fragmentlängen wurden mit Hilfe des Software-Paketes BIOSYS-1.7 (Swofford u. Selander 1989) ausgewertet. Lediglich für die Berechnung der effektiven Allelzahl, des PIC-Indexes sowie der Ausschlusswahrscheinlichkeit in der Abstammungskontrolle wurde ein im Fachgebiet durch H. Bartenschlager erstelltes Computerprogramm benutzt.

3.12.1 Berechnung der Allel- und Genotypfrequenzen

Die Berechnung der Allelfrequenzen erfolgte nach der Formel:

$$p_i = \frac{2A_iA_i + \sum_{j=1}^k A_iA_j}{2N}$$

mit

p_i : Frequenz des i 'ten Allels,

A_iA_i : Zahl der Tiere mit homozygotem Genotyp,

A_iA_j : Zahl der Tiere mit heterozygotem Genotyp mit den Allelen i und j ,

i, j : Laufindizes der Allele,

k : Anzahl der Allele eines Locus und

N : Anzahl der Individuen.

Unter Annahme eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts wurden die Erwartungswerte für die Genotypfrequenzen aus den Allelfrequenzen nach folgender Formel berechnet:

$$E_{ij} = (2 - \delta_i)(p_i p_j)N$$

mit

E_{ij} : Erwartungswert für den Genotyp mit den Allelen i und j ,

δ_i : Indikatorvariable: $\delta_i = 0$ wenn $i \neq j$, $\delta_i = 1$ wenn $i=j$,

p_i, p_j : Frequenzen der Allele i bzw. j und

N : Gesamtzahl der Tiere.

Für die Prüfung auf signifikante Abweichungen der beobachteten Genotypfrequenzen von ihren Erwartungswerten wurden χ^2 -Tests durchgeführt. Ein gepoolter χ^2 -Test wurde bei Loci mit mehr als zwei Allelen benutzt, wenn Erwartungswerte < 5 für einzelne Genotypen auftraten. Bei diesem Test wurden alle vorkommende Genotypen zu drei Klassen angeordnet, wobei die Homozygoten mit dem häufigsten Allel die erste Klasse bildeten, die Heterozygoten mit diesem Allel die zweite und alle andere Genotypen die dritte Klasse. Es wurden die erwarteten und beobachteten Frequenzen aller drei Genotypenklassen berechnet und auf Grund dieser Auswertungen χ^2 -Wert und die Irrtumswahrscheinlichkeit berechnet. Dabei wurde für die Berechnung des Freiheitsgrades folgende Formel benutzt:

$$df = k(k-1)/2$$

mit

df : Degree of freedom (Freiheitsgrad) und

k : Zahl der Allele.

3.12.2 Berechnung von Heterozygotiegraden

Der beobachtete Heterozygotiegrad für Locus I wurde ermittelt als:

$$h_I = \sum_{i=1, j=i+1, k}^{k-1} p_{ij}$$

mit

- h_i : Heterozygotiegrad am Locus I,
- p_{ij} : beobachtete Frequenz des Genotyps ij,
- k: Zahl der Allele und
- i: Laufindex für die Zeilen der Genotypfrequenzmatrix,
- j: Laufindex für die Spalten der Genotypfrequenzmatrix.

Dabei ergab sich der nach dem Hard-Weinberg-Gleichgewicht erwartete Heterozygotiegrad (Nei 1972) mit Korrektur für kleine Beobachtungszahlen:

$$h_i = \frac{2N \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)}{2N - 1}$$

mit

- N: Zahl der am Locus I getesteten Tiere,
- p_i : Frequenz des Allels i am Locus I,
- i: Laufindex für die Allele am Locus I und
- k: Zahl der Allele am Locus I.

3.12.3 Berechnung der effektiven Allelzahl

Die effektive Anzahl der Allele (ENA = Effective Number of Alleles) wurde nach der Formel von [Kimura u. Crow \(1964\)](#) berechnet:

$$ENA = 1 / \sum_{i=1}^k p_i^2$$

mit

- k: Zahl der Allele eines Locus,
- i: Laufindex der Allele und
- p_i : Frequenz des Allels i.

3.12.4 Berechnung des PIC-Wertes je Locus

Die Berechnung des PIC-Indexes (PIC: Polymorphism Information Content) erfolgte nach der Formel von [Botstein et al. \(1980\)](#):

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right) - \left(\sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2p_i^2 p_j^2 \right)$$

mit

k: Zahl der Allele,

$p_{i,j}$: Frequenz des Allels i bzw. j und

i,j: Laufindex der Allele.

3.12.5 Berechnung der Ausschlusswahrscheinlichkeiten

Die Ausschlusswahrscheinlichkeit, die mit einem Locus bei der Abstammungskontrolle erzielt werden konnte, wurde nach der Formel berechnet ([Jamieson 1994](#)):

$$EP = \sum_i^k p_i (1 - p_i)^2 - \sum_{i>j}^k (p_i p_j)^2 [4 - 3(p_i + p_j)]$$

mit

EP: Exclusion Probability,

k: Anzahl Allele pro Locus,

p_i, p_j : Frequenzen des Allels i bzw. j und

i,j: Laufindizes der Allele.

Für die Verwendung von mehreren polymorphen Loci bei der Abstammungskontrolle wurde folgende Formel benutzt ([Jamieson 1994](#)):

$$CEP = 1 - \prod_{i=1}^r (1 - EP_i)$$

mit

CEP: Cumulated Exclusion Probability und

r: Zahl der Loci.

3.12.6 Bestimmung des Variabilitätsniveaus in Populationen

Das Variabilitätsniveau in den Populationen wurde mit Hilfe der F-Statistik bestimmt. Die genetische Differenzierung der Populationen wurde nach [Wright \(1978\)](#) berechnet:

$$1-F_{IT} = (1-F_{IS})(1-F_{ST}),$$

wobei F_{IT} die genetische Differenzierung der Tiere im gesamten Tiermaterial ist. F_{IS} zeigt die Unterschiede zwischen den Tiere innerhalb einer Rasse, und F_{ST} lässt eine Aussage über die gesamte genetische Variabilität zu, die nur durch die Unterschiede zwischen den genetischen Gruppen entsteht. F_{IS} (Inzuchtkoeffizient) ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Gene an jedem Locus eines Individuums eine identische Abstammung haben. F_{IS} und andere Werte der F-Statistik wurden nach den Formeln von [Nei \(1977\)](#) berechnet:

$$F_{IS_{ik}} = \frac{P_{ik} - p_{ik}^2}{p_{ik}(1 - p_{ik})}$$

$$F_{IT_i} = \frac{P_i - \bar{p}_i^2}{\bar{p}_i(1 - \bar{p}_i)}$$

$$F_{ST_i} = \frac{\bar{p}_i^2 - \bar{p}_i}{\bar{p}_i - \bar{p}_i^2}$$

mit

$F_{IS_{ik}}$: F_{IS} -Wert des Allels i in der Subpopulation k ,

P_{ik} : Frequenz der Homozygoten des Allels i in Subpopulation k ,

p_{ik} : Frequenz des Allels i in Subpopulation k ,

F_{IT_i} : F_{IT} -Wert des Allels i ,

F_{ST_i} : F_{ST} -Wert des Allels i ,

P_i : durchschnittliche Frequenz der Homozygoten des Allels i in der Gesamtpopulation,

\bar{p}_i : durchschnittliche Frequenz des Allels i in der Gesamtpopulation und

\bar{p}_i^2 : Mittelwert der quadrierten Allelfrequenzen des Allels i in der Gesamtpopulation.

3.12.7 Berechnung der genetischen Distanzen

Die genetischen Distanzen zwischen den Rassen einer Spezies wurden nach der Formel von [Nei \(1972\)](#) berechnet:

$D = -\log_e I$

$$I = \frac{\sum_{l=1}^r \sum_{i=1}^k p_{lix} p_{liy}}{\sqrt{\sum_{l=1}^r \sum_{i=1}^k p_{lix}^2 \sum_{l=1}^r \sum_{i=1}^k p_{liy}^2}}$$

mit

D: Genetische Distanz nach [Nei \(1972\)](#),

I: Wahrscheinlichkeit für die Identität zweier zufällig aus zwei Populationen gezogener Allele an einem Locus (normalized identity of genes)

p_{lix}, p_{liy} : Frequenzen des Allels i am Locus l in Population x bzw. y ,

r : Anzahl der Loci und

k : Anzahl der Allele am Locus l .

Bei der Berechnung der genetischen Distanzen wurde auch die Formel von [Rogers \(1972\)](#) benutzt:

$$D_R = \frac{1}{r} \sum_{l=1}^r \left[\frac{1}{2} \sum_{i=1}^k (p_{lix} - p_{liy})^2 \right]^{1/2}$$

wobei

p_{lix}, p_{liy} : Frequenz des Allels i am Locus l in der Population x bzw. y ,

r : Anzahl der Loci,

k : Anzahl der Allele am Locus l

Die genetischen Distanzen werden in der Darstellungsform Dendrogramm nach der Methode UPGMA („Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages“) nach [Sneath u. Sokal \(1973\)](#) gezeigt. Jeweils genetisch ähnliche Populationen werden dabei paarweise geclustert. In den weiteren Schritten werden übergeordnete Cluster gebildet. Im nächsten Zyklus wird die genetische Gruppe für eine weitere Clustering ausgewählt, die zu den verbliebenen Gruppen bzw. zur mittleren Distanz der bereits geclusterten Gruppe den geringsten Abstand zeigt. Dies Verfahren wird solange fortgesetzt, bis alle Gruppen in ihrer Clustering festgelegt sind.

4 ERGEBNISSE

4.1 Darstellung alleler Fragmentlängen für neue Mikrosatellitenloci

4.1.1 Werte der DNA-Extraktion

Die DNA-Konzentrationen, die aus dem Probenmaterial isoliert werden konnten, werden in Tab. 14 dargestellt. Wie zu erkennen ist, waren die DNA-Konzentrationen je nach Probe teilweise sehr unterschiedlich. Im Mittel lagen die aus Leukozytenfraktionen isolierten DNA-Konzentrationen bedeutend höher als die aus Vollblut gewonnenen. Alle DNA-Lösungen wurden auf 0,1 µg/µl eingestellt, um gleichmäßige Bedingungen zu erreichen. DNA-Konzentrationen unter 0,1 µg/µl bei 37 Proben haben die PCR-Amplifikation nicht beeinflusst.

Tab.14: Konzentration der isolierten DNA

Spezies	Tiergruppe/Ort ¹⁾	Zahl der Proben	Ausgangs-material	DNA-Konzentration(µg/µl)		
				min.	\bar{x}	max.
Dromedar	Turkana (K)	58	LF	0,075	0,780	3,393
	Somali (K)	58	LF	0,041	0,705	2,457
	Gabra (K)	52	LF	0,101	0,960	2,774
	Rendille (K)	43	LF	0,023	0,220	0,918
	Pakistan (K)	4	LF	0,825	1,065	1,194
	Pokot (K)	5	LF	0,704	1,102	2,145
Trampeltier	Chapaewo (R)	10	VS	0,075	0,270	0,822
	Ortolik (R)	10	VS	0,070	0,270	0,731
	Zoo-Wilhelma (D)	1	Vollblut	0,235	0,235	0,235
	Zoo-München (D)	2	Vollblut	0,106	0,123	0,139
	Zoo-Heidelberg (D)	4	Vollblut	0,075	0,105	0,128
Alpaka	Hellabrunn (D)	4	Vollblut	0,078	0,331	1,018
Lama	Oberer Hardthof (D)	6	Vollblut	0,091	0,113	0,143
Total		257		0,023	0,483	3,393

¹⁾: K – Probenmaterial aus Afrika (Kenia)

R – Probenmaterial aus Russland

D – Probenmaterial aus Deutschland (Angaben zu den Tiergruppen s. Tab. 3, S. 27)

\bar{x} : Mittelwert

LF: Leukozytenfraktion

VS: Vollblut mit Salz

4.1.2 Primerprüfung

Die Ergebnisse der Primerprüfung sowie die PCR-Bedingungen sind für alle untersuchten Loci in [Tab. 15](#) (S. 54) zusammengefasst. 25 Primerpaare ergaben bei der PCR spezifische Amplifikationen. Primerpaare für neun weitere Loci zeigten dagegen unspezifische oder keine Amplifikationen. Bei einem Locus (CMS27) waren starke Slippage-Effekte zu beobachten, die ein Ablesen der Genotypen unmöglich machten. Es wurde ein neues Primerpaar für diesen Locus definiert und geprüft. Auch damit waren die Slippage-Effekte nicht zu vermeiden. Drei andere Loci (CMS105, CMS108, CMS1212) führten unter verschiedenen PCR-Bedingungen (Veränderung der PCR-Temperatur und Konzentrationen der PCR-Ansatzkomponenten) zu keinen PCR-Produkten. Bei den übrigen fünf Loci (CMS99, CMS110, CMS116, R3 und CAG5) traten mehrere PCR-Produkte auf, die jedoch unspezifisch waren und keine Genotypisierung zuließen. Bei diesen Loci erbrachten weitere Optimierungen der PCR-Bedingungen (verschiedene Temperaturen und Konzentrationen der PCR-Ansatzkomponenten) keine Verbesserungen der Amplifikation. Nur Loci, die eine spezifische Amplifikation zeigten, wurden in die weiteren Untersuchungen eingeschlossen.

Für fast alle Loci wurden die auf Grund der Sequenzinformation ([Han 2001](#)) erwarteten Fragmentlängen auch aus den Messungen mit dem A.L.F. DNA-Sequenzierautomaten gefunden. Unterschiede zwischen den erwarteten und beobachteten Fragmentlängen lagen im Bereich 1 - 3 bp. Größere Abweichungen waren nur für die Loci CMS50 (7 bp) und CMS121 (6 bp) festzustellen.

4.1.3 PCR mit genomischer DNA verschiedener Tiere und Loci

Mit den optimierten PCR-Bedingungen wurde die DNA von 57 ausgewählten Tieren untersucht, um die Informativität der Loci zu analysieren. Nach der Elektrophorese wurden DNA-Proben, bei denen keine PCR-Produkte erzeugt worden waren, ein zweites Mal mittels PCR untersucht. Die Ergebnisse der PCR-Amplifikation werden in [Tab. 16](#) (S. 55 f.) gezeigt. An zwei Loci (CMS36 und CMS144) war es weder bei Lama- noch bei Alpaka-Proben möglich, PCR-Produkte zu erzeugen. Für den Locus CMS23 wurde kein PCR-Produkt bei Alpaka-Proben erzeugt, und für den Locus CMS58 fand keine Amplifikation bei Lama-Proben statt.

Tab. 15: Mikrosatellitenloci und deren PCR-Bedingungen

Locus	Schmelztemperatur (C°)	MgCl ₂ -Konzentration (mM)	Fragmentlängen (bp)	
			beobachtete ¹⁾	erwartete ²⁾
CMS1	60	1,5	181	183
CMS3	55	1,5	258	259
CMS9	55	1,5	233, 249	248
CMS10	55	1,5	126	127
CMS13	55	1,5	256, 265	255
CMS15	55	1,5	140, 146	148
CMS16	60	1,5	187, 193	193
CMS17	55	1,5	144	145
CMS18	60	1,5	161, 186	162
CMS23	55	1,5	384, 400	385
CMS25	58	1,5	118, 128	114
CMS31	55	1,5	161	163
CMS32	55	1,5	198	200
CMS36	55	1,5	141	143
CMS43	60	1,5	218	220
CMS44	55	1,5	168	171
CMS50	55	1,5	154, 170	161
CMS58	55	1,5	107	110
CMS66	57	1,3	192	194
CMS102	60	1,5	190	191
CMS104	52	1,6	105	108
CMS113	48	1,5	140, 150	138
CMS121	60	1,5	159	153
CMS142	55	1,3	148	149
CMS144	60	1,3	129	131
CMS27	48-60	1,0-1,5	Slippage	206
CMS99	48-60	1,3-1,5	NSA	294
CMS105	48-60	1,5-3,0	KA	196
CMS108	48-60	1,5-3,0	KA	126
CMS110	48-60	1,3-1,5	NSA	207
CMS116	48-60	1,3-1,5	NSA	126
CMS1212	48-60	1,5-3,0	KA	209
R3	48-60	1,3-1,5	NSA	291
CAG5	48-60	1,3-1,5	NSA	113

¹⁾: Aus Fragmentanalysen unter Vorlage von genomischer DNA des Trampeltieres, für das die Sequenzierung durchgeführt wurde.

²⁾: Auf der Basis der sequenzierten DNA eines Trampeltieres (Tab. 7, S. 33).

NSA: Nicht-spezifische Amplifikation; KA: Keine Amplifikation.

Tab. 16: Ergebnisse der PCR

Locus	PCR ¹⁾	Spezies und Zahl der Tiere			
		Trampeltier (27) ²⁾	Dromedar (20)	Lama (6)	Alpaka (4)
CMS1	+	25	20	6	4
	-	2	0	0	0
CMS3	+	24	18	6	4
	-	3	2	0	0
CMS9	+	26	20	6	4
	-	1	0	0	0
CMS10	+	26	20	6	4
	-	1	0	0	0
CMS13	+	26	20	6	4
	-	1	0	0	0
CMS15	+	26	19	6	4
	-	1	1	0	0
CMS16	+	26	20	1	0
	-	1	0	5	4
CMS17	+	26	20	6	4
	-	1	0	0	0
CMS18	+	26	20	6	4
	-	1	0	0	0
CMS23	+	26	20	4	0
	-	1	0	2	0
CMS25	+	26	20	6	4
	-	1	0	0	0
CMS31	+	26	20	6	4
	-	1	0	0	0
CMS32	+	25	20	6	4
	-	2	0	0	0
CMS36	+	27	20	0	0
	-	0	0	6	4
CMS43	+	26	18	6	4
	-	1	2	0	0
CMS44	+	25	20	6	4
	-	2	0	0	0
CMS50	+	26	20	6	4
	-	1	0	0	0

¹⁾ +: PCR-Produkt erzielbar; -: kein PCR-Produkt; ²⁾ Beim Trampeltier zeigte die Probe eines Tieres (Nr. 7.2) aus Russland lediglich am Locus CMS36 eine Amplifikation.

Tab. 16: Ergebnisse der PCR (Fortsetzung)

Locus	PCR ¹⁾	Spezies und Zahl der Tiere			
		Trampeltier (27) ²⁾	Dromedar (20)	Lama (6)	Alpaka (4)
CMS58	+	26	20	0	3
	-	1	0	6	1
CMS66	+	26	20	6	4
	-	1	0	0	0
CMS102	+	26	20	6	4
	-	1	0	0	0
CMS104	+	25	20	6	4
	-	2	0	0	0
CMS113	+	26	20	6	4
	-	1	0	0	0
CMS121	+	26	20	6	4
	-	1	0	0	0
CMS142	+	26	20	6	4
	-	1	0	0	0
CMS144	+	26	20	0	0
	-	1	0	6	4
Durchschnitt ³⁾		(94,5%)	(95,0%)	(45,8%)	(58,3%)

¹⁾ +: PCR-Produkt erzielbar; -: kein PCR-Produkt;

²⁾ Beim Trampeltier zeigte die Probe eines Tieres (Nr. 7.2) aus Russland lediglich am Locus CMS36 eine Amplifikation;

³⁾: Anteil DNA-Proben, aus denen für die verschiedene Loci PCR-Produkte zu gewinnen waren.

4.1.4 Fragmentlängenanalysen

Die Ergebnisse der Fragmentlängenanalysen der 25 Loci sind in der Tab. 17a (S. 63) und 17b (S. 65) zusammengefasst. Die Elektropherogramme von PCR-amplifizierten Genotypen der Kamel-Mikrosatellitenloci sind für einige Loci beispielhaft für je drei Tiere pro Spezies in den Abb. 7 bis 12 (S. 57 ff.) dargestellt. Die betreffenden Loci wurden in die weiteren Populationsuntersuchungen einbezogen.

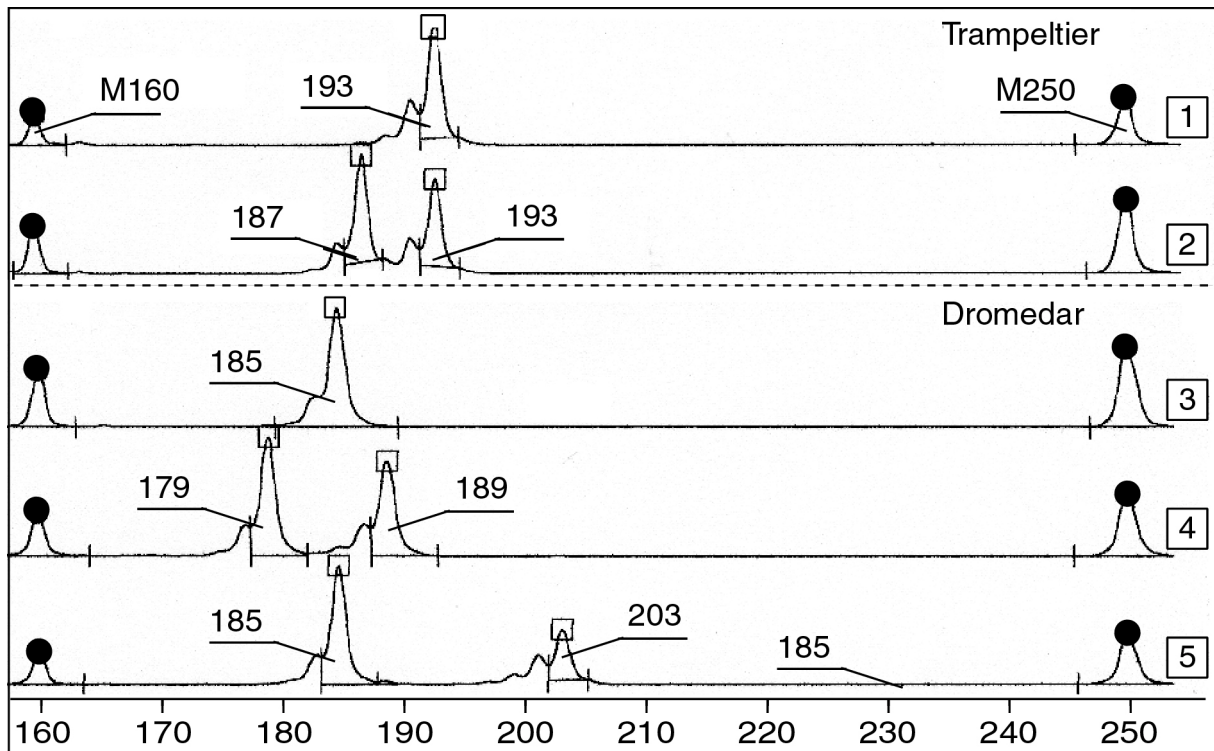
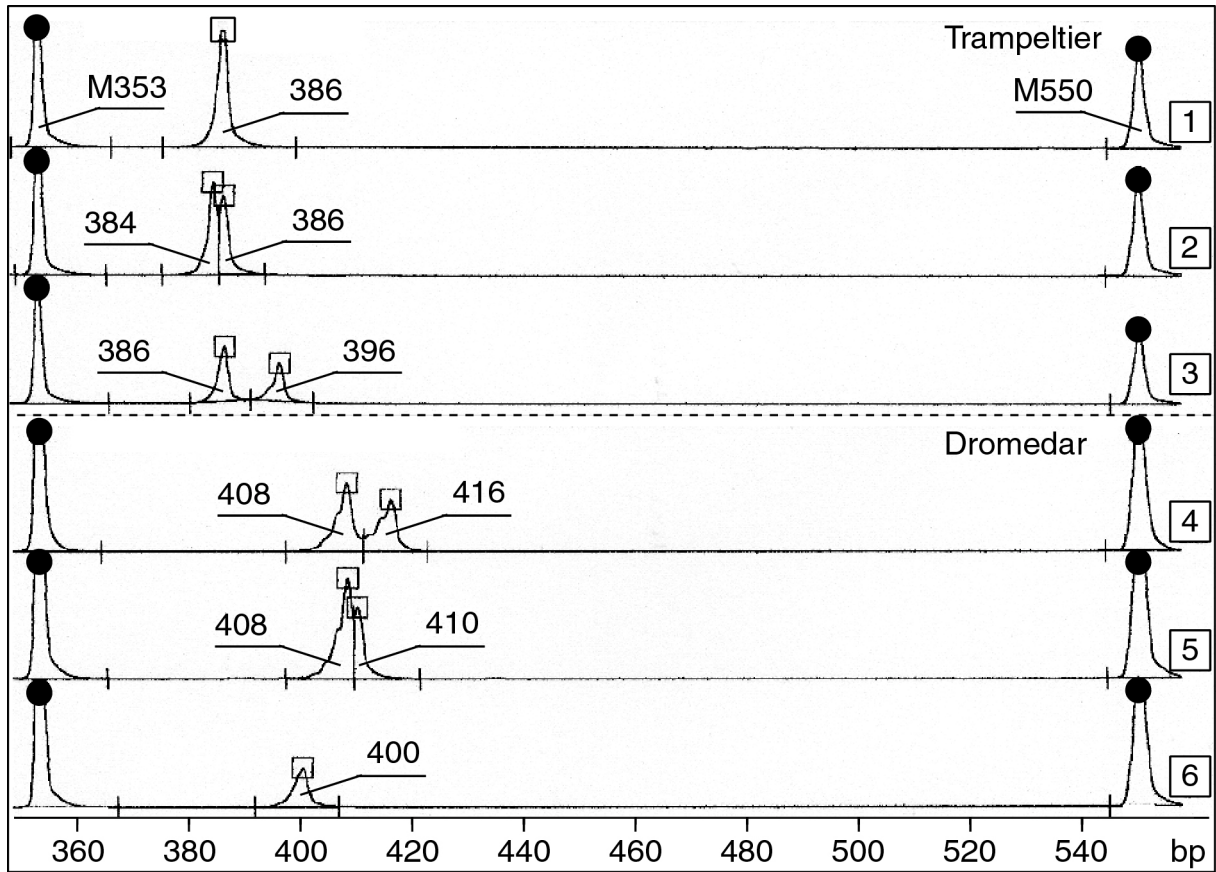


Abb. 7: Elektropherogramme für den Locus CMS16

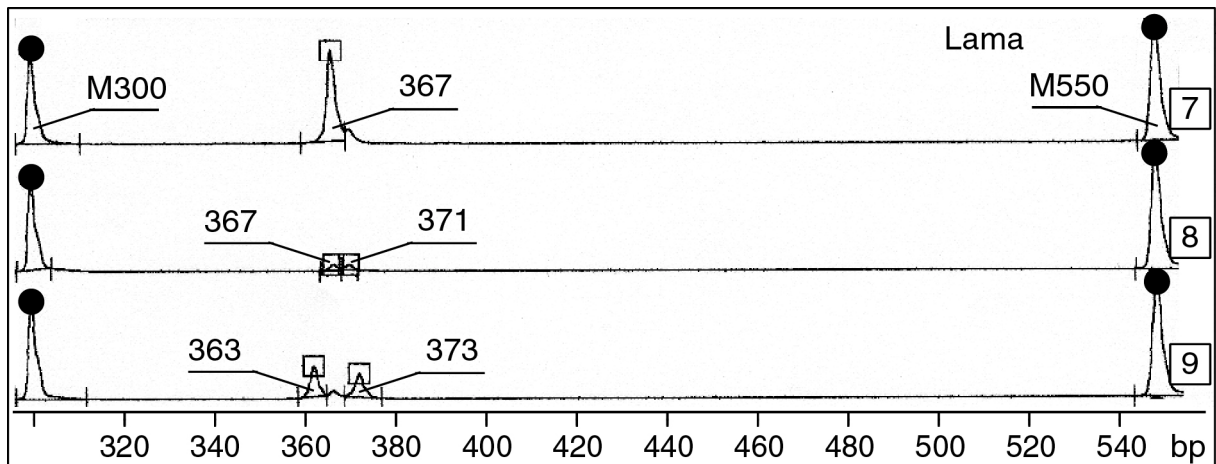
M: Interne Längenstandards mit 160 und 250 bp

Die Zahlen an den einzelnen Peaks bezeichnen die mittleren Allelfragmentlängen in bp, die aus mehreren Auftrennungen berechnet wurden.

Jede Linie in den Abb. 7 bis 12 gibt die elektrophoretische Auftrennung eines PCR-Produktes aus der DNA eines Tieres wieder. Ein Peak entspricht einem homozygoten Genotyp, zwei Peaks einem heterozygoten. Kleine Nebenfraktionen, die bei manchen Loci auftreten, weisen auf Slippageereignisse bei der PCR-Amplifikation hin. Diese blieben ohne Einfluss auf die Genotypenbestimmung. Die kleinen Peaks neben den 250- und 260-bp-Allelen (Locus CMS13, Alpaka, [Abb 12](#), S. 62). sind unspezifische PCR-Produkte.



a) Interner Längenstandard 353/550 bp



b) Interner Längenstandard 300/550 bp

Abb. 8: Elektropherogramme für den Locus CMS23

Erklärungen siehe [Abb. 7](#) (S. 57)

Spur 8 wurde mit 3 μ l PCR-Produkt hergestellt.

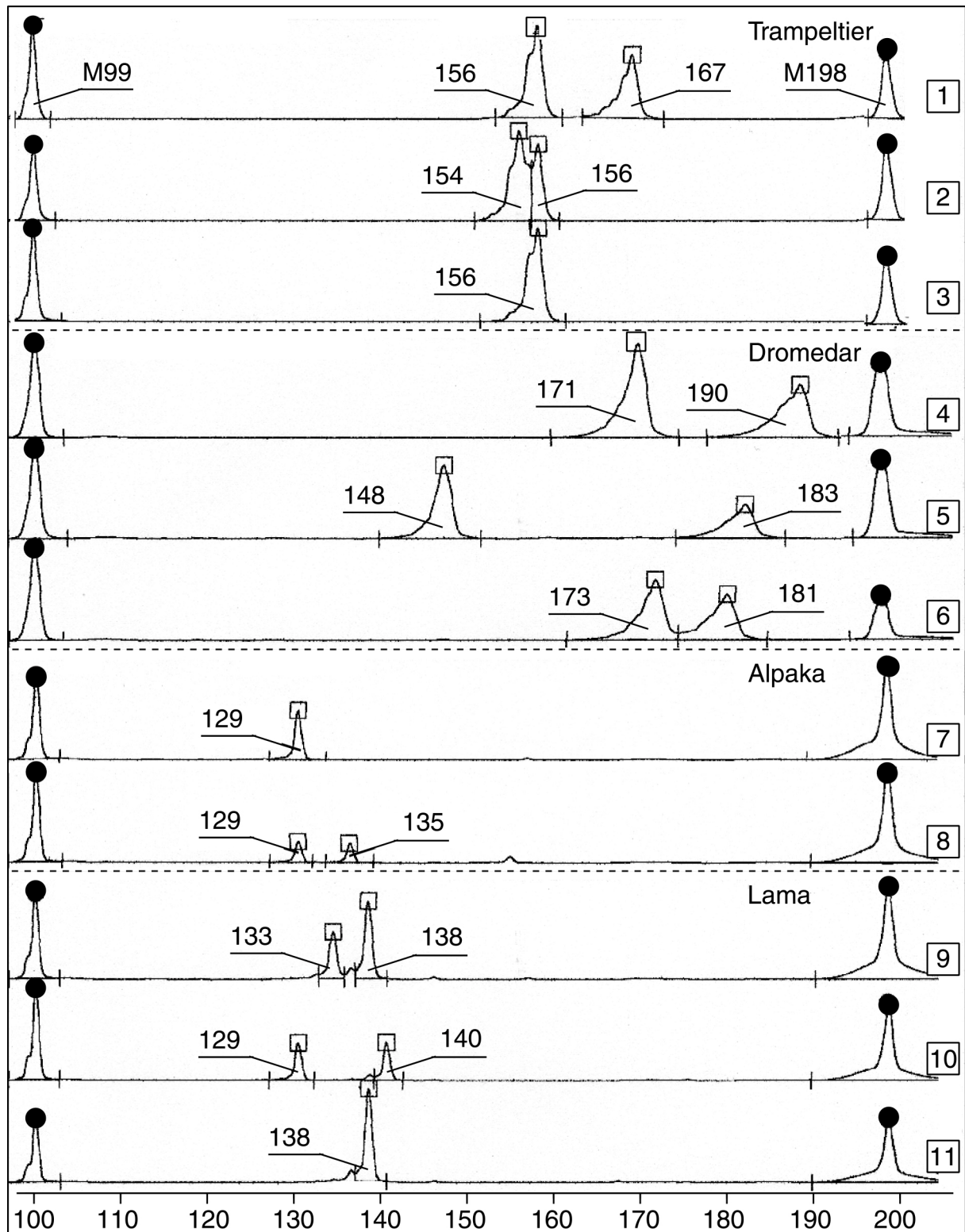


Abb. 9: Elektropherogramme für den Locus CMS50

Erklärungen siehe [Abb. 7](#) (S. 57)

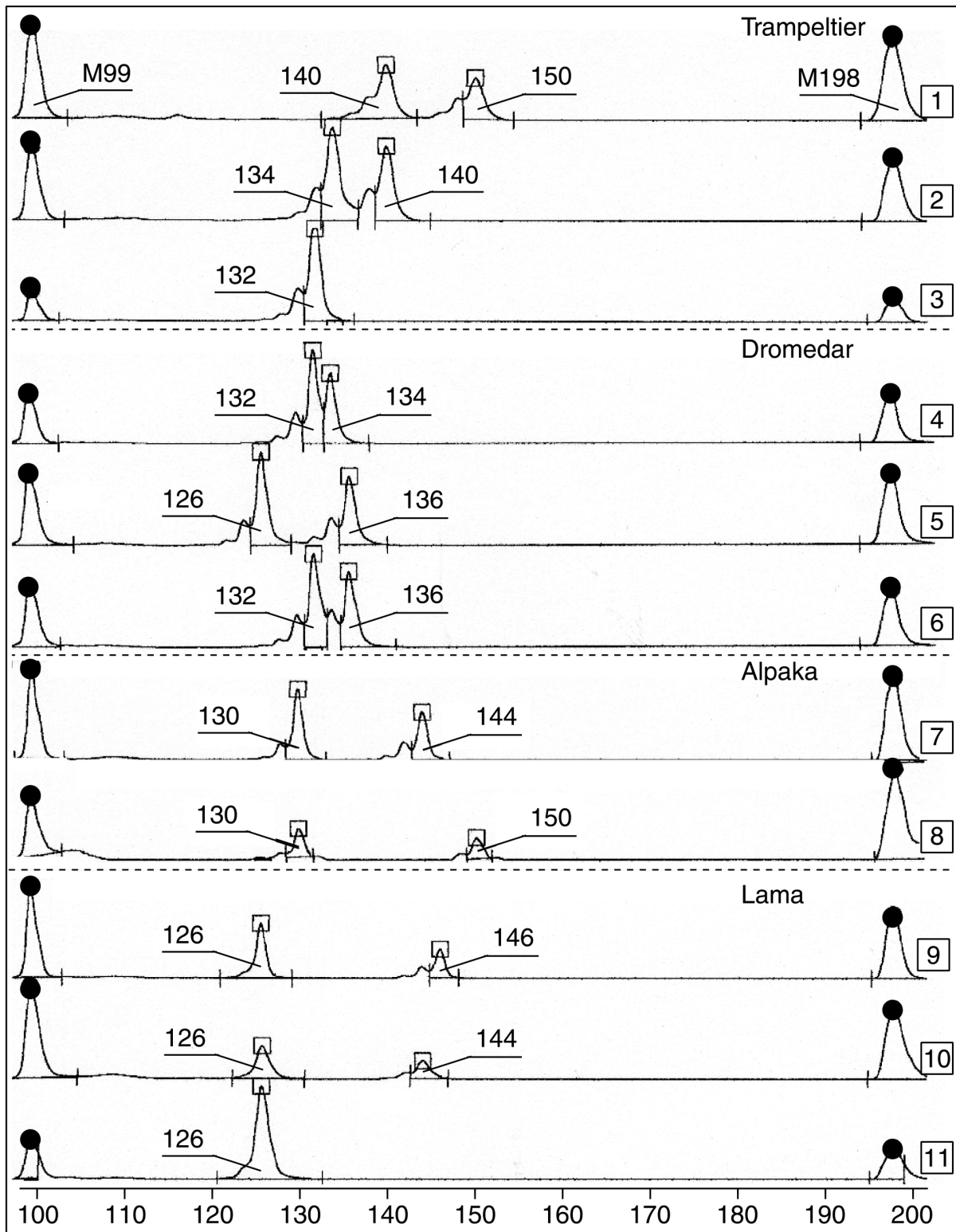


Abb. 10: Elektropherogramme für den Locus CMS113

Erklärungen siehe [Abb. 7](#) (S. 57)

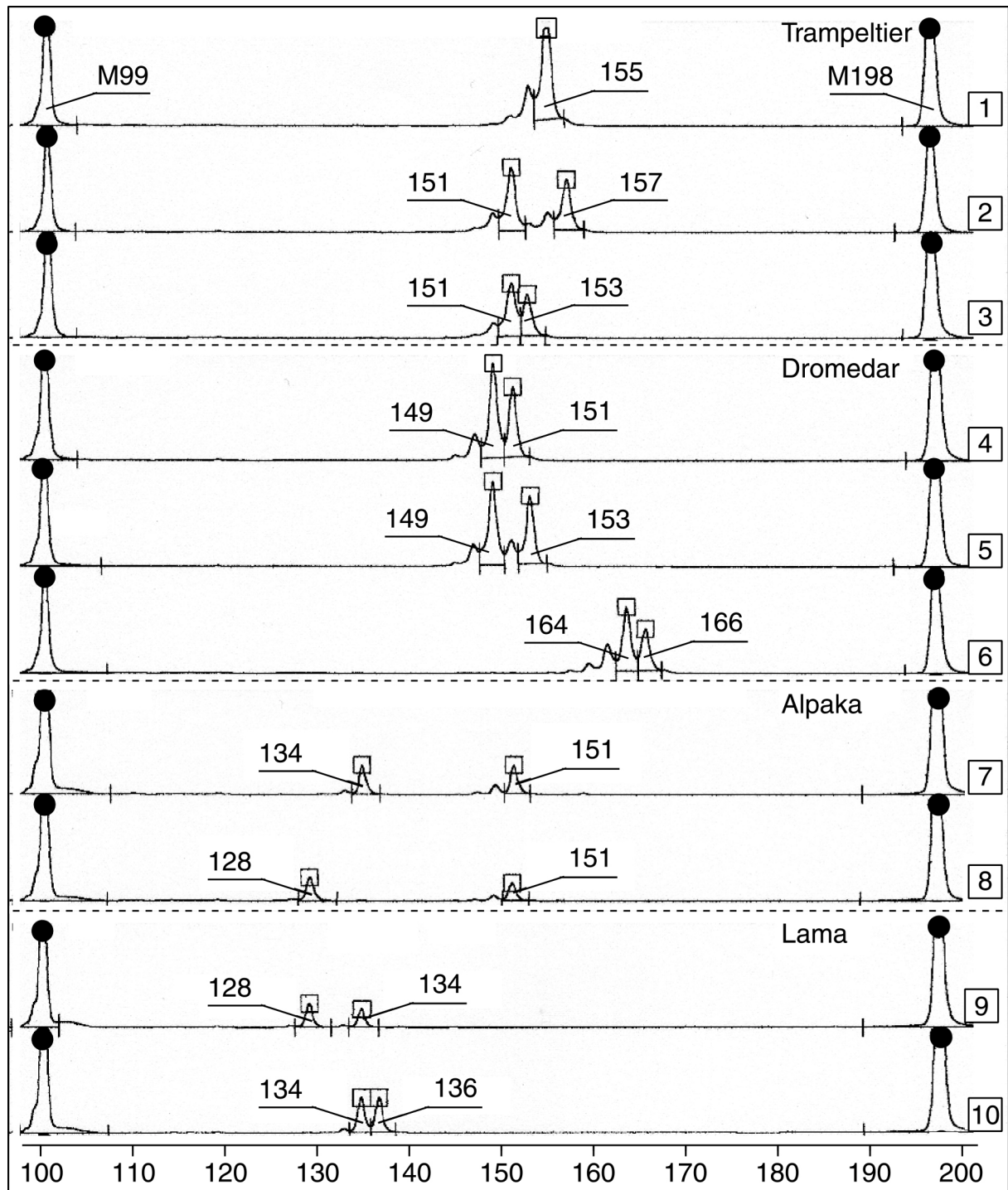


Abb. 11: Elektropherogramme für den Locus CMS121

Erklärungen siehe Abb. 7 (S. 57)

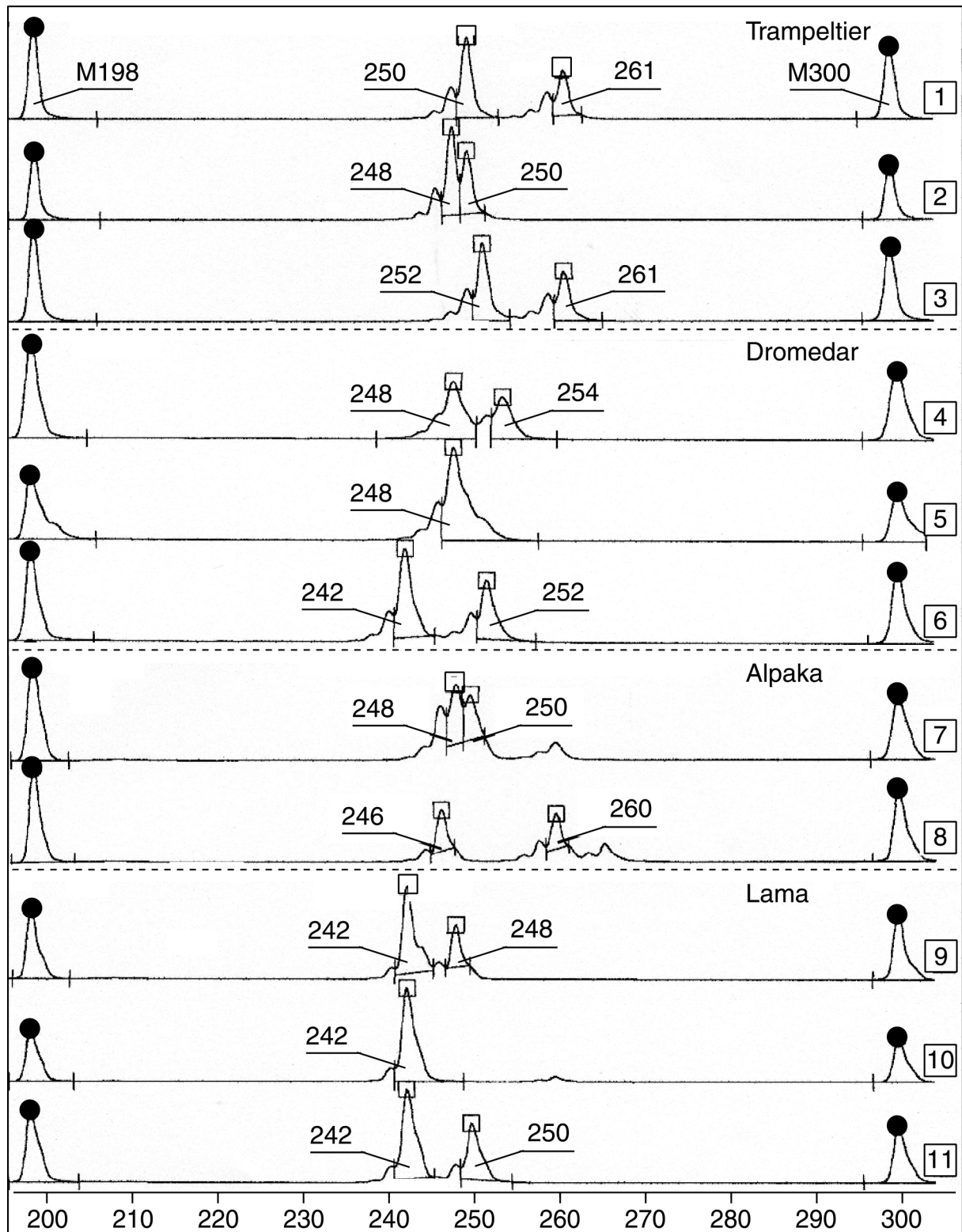


Abb. 12: Elektropherogramme für den Locus CMS13

Erklärungen siehe [Abb. 7](#) (S. 57)

Tab. 17a: Fragmentlängenanalysen

Locus	Fragmentlängen (bp)								M (bp)
	Trampeltier		Dromedar		Lama		Alpaka		
	B	S	B	S	B	S	B	S	
CMS1	181		181		181		181		80/216
CMS3	258		258		251-258	7	251-258	7	198/353
CMS9	233-256	23	231-243	12	227-247	20	229-237	8	198/300
CMS10	126		128		107		107		80/160
CMS13	248-265	17	238-254	16	242-261	19	246-265	19	198/300
CMS15	140-159	19	121-144	23	140-146	6	138-146	8	99/198
CMS16	183-193	10	179-207	28	-	-	-	-	160/250
CMS17	144-149	5	149-167	18	135-147	12	140-161	21	99/198
CMS18	157-186	29	157-163	6	165-188	23	165-182	17	119/250
CMS23	384-412	28	378-418	40	363-373	10	-	-	¹⁾
CMS25	118-128	10	93-102	9	93-95	2	93-118	25	80/160
CMS31	161		161		163		163		99/198
CMS32	198-204	6	198-209	11	167-169	2	167-169	2	119/250
CMS36	139-143	4	141-143	2	-	-	-	-	99/198
CMS43	218		218		218		218		119/250
CMS44	168		168		168		168		119/250
CMS50	154-183	29	170-190	20	129-140	11	129-135	6	99/198
CMS58	107-115	8	98-116	18	-	-	137-142	5	²⁾
CMS66	192		192		192		192		160/250
CMS102	190		190		190		190		160/250
CMS104	105-124	19	93		94-102	8	100-108	8	80/160
CMS113	132-150	18	122-138	16	126-146	20	130-150	20	99/198
CMS121	151-159	8	147-166	19	128-151	23	128-157	29	99/198
CMS142	148		146		148		148		99/198
CMS144	129		129		-	-	-	-	99/198
ZPL	15		14		13		13		
MS (bp)	15,5		17,0		12,5		13,5		

¹⁾ 353/550 bp für Trampeltier und Dromedar, 300/550 bp für Lama; ²⁾ 80/160 bp für Trampeltier und Dromedar, 80/198 bp für Alpaka; M: interner Längenstandard; B: Bereich; S: Spanne; ZPL: Zahl polymorpher Loci; MS: Mittlere Fragmentlängenspannweite

Die Fragmentlängen lagen zwischen 93 bp (Locus CMS25 bei Dromedar, Lama und Alpaka; Locus CMS104 beim Dromedar) und 418 bp (Locus CMS23 beim Dromedar). Die größte allele Fragmentlängenspannweite trat mit 40 bp beim Dromedar am Locus CMS23 auf. Die allelen Fragmentlängenspannweiten pro Spezies sind für alle polymorphen Loci in [Abb. 13](#) (S. 64) dargestellt. In [Tab 18](#) (S. 66 ff.) werden die Allele entsprechend ihrer Fragmentlängen pro Spezies und Locus aufgelistet.

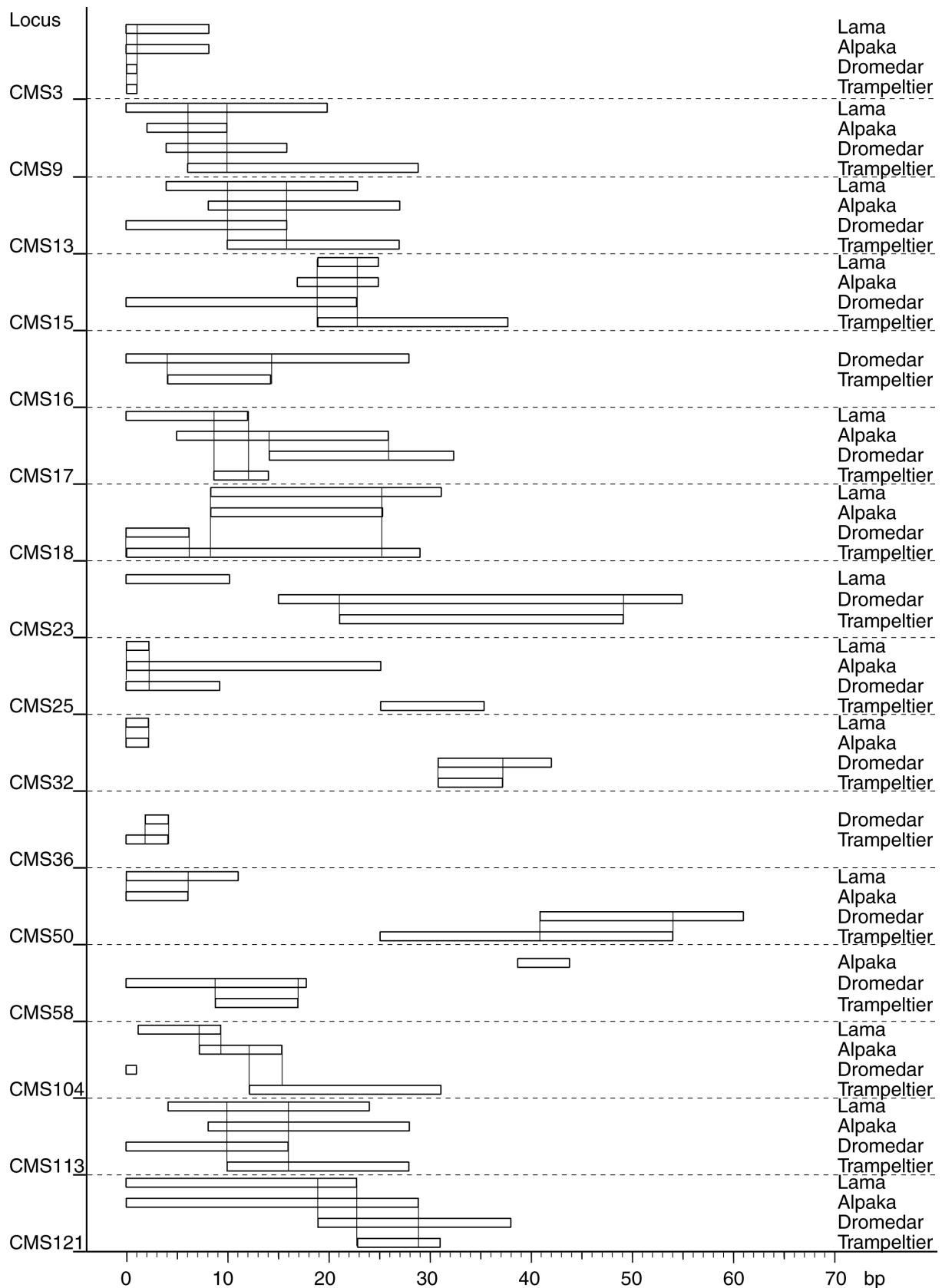


Abb. 13: Allele Fragmentlängenspannweiten pro Locus und Spezies

Das kürzeste Fragment innerhalb des Locus erhält den Basiswert 0. Die übrigen Fragmente aller Spezies werden in ihren Spannweiten zu diesem Basiswert dargestellt. Die vertikalen Striche begrenzen Fragmentlängen-Überlappungsbereiche zwischen Spezies.

Tab. 17 b: Fragmentlängenanalysen

Locus	Auftragsvolumen (µl)				Zahl der Allele				Häufigstes Allel (bp)				Mittlere Fragmentlänge (bp) ¹⁾			
	T	D	L	A	T	D	L	A	T	D	L	A	T	D	L	A
CMS1	0,2 [*])	0,2 [*])	0,1 [*])	0,1 [*])	1	1	1	1	181	181	181	181	181,0	181,0	181,0	181,0
CMS3	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	2	2	258	258	258	251	258,0	258,0	254,5	254,5
CMS9	0,5	0,5	0,5	0,5	7	4	5	2	249	231	239	237	247,0	237,5	237,8	233,0
CMS10	0,3	0,7	1,0	1,0	1	1	1	1	126	128	107	107	126,0	128,0	107,0	107,0
CMS13	0,5	0,5	0,3	0,3	6	6	6	3	250, 256	248	242	246, 259	255,3	247,3	250,7	256,7
CMS15	2,0	2,0	2,0	2,0	9	6	4	3	146	142	140, 144	138	150,8	135,2	143,0	142,7
CMS16	0,6	0,6	-	-	3	7	-	-	193	185	-	-	187,7	192,4	-	-
CMS17	0,2 [*])	0,2 [*])	1,0	1,0	3	2	2	2	144	167	135	140, 161	146,7	158,0	141,0	150,5
CMS18	0,1	0,1	0,2	0,2	5	2	5	3	161	157	182	165	168,4	160,0	178,3	173,5
CMS23	0,3	0,3	2,0	-	5	8	4	-	384	408	363, 367	-	395,6	405,5	368,5	-
CMS25	0,5	0,5	0,5	0,5	6	4	2	4	122	97	93	118	123,0	98,0	94,0	105,0
CMS31	0,2	0,2	0,2	0,2	1	1	1	1	161	161	163	163	251,0	251,0	163,0	163,0
CMS32	0,3	0,3	0,5	0,5	2	4	2	2	198	207	167	167	201,0	203,8	168,0	168,0
CMS36	0,2 [*])	0,2 [*])	-	-	3	2	-	-	139	143	-	-	141,0	142,0	-	-
CMS43	1,0	1,0	1,0	1,0	1	1	1	1	218	218	218	218	218,0	218,0	218,0	218,0
CMS44	0,2	0,2	0,2	0,2	1	1	1	1	168	168	168	168	168,0	168,0	168,0	168,0
CMS50	0,3	0,3	2,0	2,0	5	8	4	2	154	179	138	129	165,8	176,3	135,0	132,0
CMS58	1,0	1,0	-	1,5	4	5	-	2	107	103	-	142	111,5	107,0	-	139,5
CMS66	1,0	1,0	1,0	1,0	1	1	1	1	192	192	192	192	192,0	192,0	192,0	192,0
CMS102	0,2	0,2	0,2	0,2	1	1	1	1	190	190	190	190	190,0	190,0	190,0	190,0
CMS104	1,0	1,0	1,0	1,0	2	1	2	3	105	93	102	102	114,5	93,0	98,0	103,3
CMS113	1,0	1,0	1,0	1,0	6	6	6	3	134, 140	132	126	130	139,7	131,3	135,0	141,3
CMS121	0,5	0,5	2,5	2,5	5	7	5	4	151	149	134	134, 151	155,0	156,0	138,6	142,5
CMS142	1,0	1,0	1,0	1,0	1	1	1	1	148	146	148	148	148,0	146,0	148,0	148,0
CMS144	0,5	0,5	-	-	1	1	-	-	129	129	-	-	129,0	129,0	-	-
Mittelwert					3,2	3,3	2,7	2,0					175,3	170,3	162,1	164,5

T: Trampeltier, D: Dromedar, L: Lama, A: Alpaka; ^{*}) PCR-Produkt wurde zuerst mit Wasser 1:10 verdünnt

¹⁾ Summe der allelen Fragmentlängen dividiert durch Anzahl der Allele

Tab. 18: Allelfragmentlängen pro Locus und Spezies

Locus	Spezies ¹⁾	Fragmentlängen der Allele (bp) ²⁾															
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
CMS1	Trampeltier(25)	181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(20)	181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMS3	Trampeltier(24)	-	258	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(18)	-	258	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	251	258	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	251	258	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMS9	Trampeltier(26)	-	-	-	233	-	-	-	241	-	245	-	249	251	254	256	-
	Dromedar(20)	-	-	231	-	235	-	-	241	243	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	227	-	-	-	235	-	239	241	-	-	247	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	-	229	-	-	-	237	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMS10	Trampeltier(26)	-	126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(20)	-	-	128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMS13	Trampeltier(26)	-	-	-	-	248	250	252	-	256	-	261	265	-	-	-	-
	Dromedar(20)	238	242	-	-	248	250	252	254	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	-	242	244	-	248	250	-	-	-	259	261	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	-	-	-	246	-	-	-	-	-	259	-	265	-	-	-	-
CMS15	Trampeltier(26)	-	-	-	140	-	-	146	147	149	151	153	155	157	159	-	-
	Dromedar(19)	121	126	138	140	142	144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	-	-	-	140	142	144	146	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	-	-	138	-	-	144	146	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾: In Klammern Zahl auswertbarer PCR-Amplifikate

²⁾: A, B, C...: Unterscheidbare Allele in aufsteigender Anordnung nach Fragmentlängen (vgl. [Abb. 13](#), S. 64)

Tab. 18: Allelfragmentlängen pro Locus und Spezies (Fortsetzung)

Locus	Spezies ¹⁾	Fragmentlängen der Allele (bp) ²⁾															
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
CMS16	Trampeltier(26)	-	183	-	187	-	193	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(20)	179	183	185	-	189	-	201	203	207	-	-	-	-	-	-	-
CMS17	Trampeltier(26)	-	-	144	147	149	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(20)	-	-	-	-	149	-	167	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(2)	135	-	-	147	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	-	140	-	-	-	161	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMS18	Trampeltier(26)	157	161	-	-	167	-	171	-	-	186	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(20)	157	-	163	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	-	-	-	165	-	-	-	178	182	-	188	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	-	-	-	165	-	169	-	178	182	-	-	-	-	-	-	-
CMS23	Trampeltier(26)	-	-	-	-	-	384	386	396	400	-	-	-	412	-	-	-
	Dromedar(20)	-	-	-	-	378	-	-	-	400	402	408	410	412	416	418	-
	Llama(4)	363	367	371	373	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMS25	Trampeltier(26)	-	-	-	-	-	-	118	120	122	124	126	128	-	-	-	-
	Dromedar(19)	93	-	97	100	102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	93	95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	93	95	-	-	-	114	118	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMS31	Trampeltier(26)	251	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(20)	251	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	-	163	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	-	163	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMS32	Trampeltier(25)	-	-	198	-	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(20)	-	-	198	201	-	207	209	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	167	169	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	167	169	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾: In Klammern Zahl auswertbarer PCR-Amplifikate

²⁾: A, B, C...: Unterscheidbare Allele in aufsteigender Anordnung nach Fragmentlängen (vgl. [Abb. 13](#), S. 64)

Tab. 18: Allelfragmentlängen pro Locus und Spezies (Fortsetzung)

Locus	Spezies ¹⁾	Fragmentlängen der Allele (bp) ²⁾															
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
CMS36	Trampeltier(27)	139	141	143	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(20)	-	141	143	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMS43	Trampeltier(25)	218	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(19)	218	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	218	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	218	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMS44	Trampeltier(24)	168	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(20)	168	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	168	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	168	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMS50	Trampeltier(26)	-	-	-	-	-	-	154	156	166	170	-	-	-	183	-	-
	Dromedar(20)	-	-	-	-	-	147	-	-	-	170	173	179	181	183	187	190
	Llama(6)	129	133	-	138	140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	129	-	135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMS58	Trampeltier(26)	-	-	-	107	111	113	115	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(20)	98	103	105	-	-	113	-	116	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(3)	-	-	-	-	-	-	-	-	137	142	-	-	-	-	-	-
CMS66	Trampeltier(26)	192	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(20)	192	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	192	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	192	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMS102	Trampeltier(26)	190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(20)	190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾: In Klammern Zahl auswertbarer PCR-Amplifikate

²⁾: A, B, C...: Unterscheidbare Allele in aufsteigender Anordnung nach Fragmentlängen (vgl. [Abb. 13](#), S. 64)

Tab. 18: Allelfragmentlängen pro Locus und Spezies (Fortsetzung)

Locus	Spezies ¹⁾	Fragmentlängen der Allele (bp) ²⁾															
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
CMS104	Trampeltier(25)	-	-	-	-	105		124	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(20)	93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	-	94	-	102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	-	-	100	102	-	108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMS113	Trampeltier(26)	-	-	-	-	132	134	136	-	140	-	146	150	-	-	-	-
	Dromedar(20)	122	126	-	-	132	134	136	138	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	-	126	128	-	132	134	-	-	-	144	146	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	-	-	-	130	-	-	-	-	-	144	-	150	-	-	-	-
CMS121	Trampeltier(26)	-	-	-	-	-	-	151	153	155	157	159	-	-	-	-	-
	Dromedar(20)	-	-	-	-	147	149	151	153	-	-	-	162	164	166	-	-
	Llama(6)	128	134	136	144	-	-	151	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	128	134	-	-	-	-	151	-	-	157	-	-	-	-	-	-
CMS142	Trampeltier(26)	-	148	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(20)	146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Llama(6)	-	148	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alpaka(4)	-	148	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMS144	Trampeltier(26)	129	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dromedar(20)	129	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾: In Klammern Zahl auswertbarer PCR-Amplifikate

²⁾: A, B, C...: Unterscheidbare Allele in aufsteigender Anordnung nach Fragmentlängen (vgl. [Abb. 13](#), S. 64)

Die größte Zahl der Allele (9) war am Locus CMS15 beim Trampeltier zu beobachten (siehe Tab. 17b, S. 65). Die Amplifikationen von drei Loci (CMS1, CMS17 und CMS 36) waren so stark, daß die PCR-Produkte verdünnt werden mußten.

4.2 Analyse der Polymorphie

Die Mikrosatellitenloci wurden auf Grund ihrer Allele in Klassen aufgeteilt:

- Monomorphe Loci, die in jeder Spezies und bei allen Tieren nur ein Allel haben;
- speziesspezifische Loci, die innerhalb einer Spezies jeweils monomorph sind, aber unterschiedliche Allele in verschiedenen Spezies zeigen;
- polymorphe Loci, die innerhalb einer Spezies mehr als ein Allel haben.

Monomorph waren die Loci CMS1, CMS43, CMS44, CMS66 und CMS102. Locus CMS44 war monomorph bei Trampeltier und Dromedar, und bei Lama und Alpaka wurden keine PCR-Produkte erzeugt.

Speziesspezifische Loci waren CMS10 (Lama und Alpaka haben die gleichen Allele), CMS31 (Alt- und Neuweltkamele haben unterschiedliche Allele) und CMS142 (Dromedar hat anderes Allel als die übrigen drei Spezies).

Zu den Loci, die in allen vier Spezies polymorph sind, zählen: CMS9 (15), CMS13 (12), CMS15 (14), CMS17 (7), CMS18 (11), CMS25 (12), CMS32 (7), CMS50 (16), CMS113 (12), und CMS121 (14). Die in Klammern gesetzten Allelzahlen geben an, wie viele verschiedene allele Fragmentlängen pro Locus über alle Spezies nachzuweisen waren.

Die Loci CMS16 und CMS36 waren bei Trampeltier und Dromedar polymorph, zeigten aber keine Amplifikation bei Lama und Alpaka. Der Locus CMS23 war polymorph in allen Spezies, mit Ausnahme von Alpaka (kein PCR-Produkt). Der Locus CMS58 war in allen Spezies polymorph, mit Ausnahme von Lama (kein PCR-Produkt). Der Locus CMS3 war bei Trampeltier und Dromedar monomorph, zeigte aber mehrere Allele bei Lama und Alpaka.

4.2.1 Spezies-spezifische Allel- und Genotypfrequenzen

Die Ergebnisse der Allelfrequenz-Berechnungen sind in Tab 20 (S. 72 ff.) zusammengefasst. Für wenige Loci war in einzelnen Spezies je ein Allel fixiert, wie z.B. Allel C beim Trampeltier Locus CMS32. Die Allelfrequenzen waren von der Spezies und der Allelzahl pro Locus abhängig. In vielen Fällen traten ein oder einige Allele bedeutsam häufiger auf als die übrigen.

Beim Trampeltier und Dromedar wurden für die Prüfung der Genotypfrequenzen auf Abweichungen von den Erwartungswerten bei Gleichgewichtssituation gepoolte χ^2 -Tests benutzt, wenn mehr als zwei Allele vorkamen (s. S. 4). Für Loci mit nur zwei Allelen wurde der normale χ^2 -Test unter Berücksichtigung aller Genotypen verwendet (Loci CMS32 und CMS104 beim Trampeltier; CMS17 und CMS18 bei Dromedar). Die χ^2 -Werte und Signifikanzen für Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht aller polymorphen Loci sind in Tab. 19 zu den Spezies Trampeltier und Dromedar aufgelistet.

Tab. 19: Vergleiche zwischen erwarteten und beobachteten Genotypfrequenzen. Angegeben werden summierte χ^2 -Werte und Signifikanzniveaus.

Loci	χ^2 -Wert		P		Signifikanz ¹⁾	
	Trampel tier	Dromedar	Trampel tier	Dromedar	Trampel tier	Dromedar
CMS9	0,052	0,743	0,820	0,389	n.s.	n.s.
CMS13	2,115	1,543	0,146	0,214	n.s.	n.s.
CMS15	1,121	0,287	0,290	0,592	n.s.	n.s.
CMS16	0,530	1,056	0,466	0,304	n.s.	n.s.
CMS17	1,121	0,000	0,290	1,000	n.s.	n.s.
CMS18	0,106	0,110	0,745	0,741	n.s.	n.s.
CMS23	0,143	1,056	0,705	0,304	n.s.	n.s.
CMS25	0,629	2,216	0,428	0,137	n.s.	n.s.
CMS32	0,000	0,013	1,000	0,909	n.s.	n.s.
CMS36	1,561	0,319	0,212	0,572	n.s.	n.s.
CMS50	0,143	1,056	0,705	0,304	n.s.	n.s.
CMS58	0,000	1,858	1,000	0,173	n.s.	n.s.
CMS104	0,530	-	0,467	-	n.s.	-
CMS113	2,115	1,543	0,146	0,214	n.s.	n.s.
CMS121	1,572	0,697	0,210	0,404	n.s.	n.s.

P: Irrtumswahrscheinlichkeit

¹⁾ n.s.: nicht signifikant;

-: Nicht auswertbar (nur ein Allel)

Tab. 20: Allelfrequenzen [%] an allen polymorphen Loci

Locus	Spezies	Frequenzen der Allele (%)															
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
CMS3	Trampeltier	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Dromedar	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Lama	25,0	75,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Alpaka	62,5	37,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CMS9	Trampeltier	0,0	0,0	0,0	28,8	0,0	0,0	0,0	7,7	0,0	1,9	0,0	38,5	13,5	5,8	3,8	0,0
	Dromedar	0,0	0,0	60,0	0,0	17,5	0,0	0,0	5,0	17,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Lama	25,0	0,0	0,0	0,0	8,3	0,0	41,7	16,7	0,0	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Alpaka	0,0	25,0	0,0	0,0	0,0	75,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CMS13	Trampeltier	0,0	0,0	0,0	0,0	9,6	23,1	21,2	0,0	23,1	0,0	9,6	13,5	0,0	0,0	0,0	0,0
	Dromedar	7,5	2,5	0,0	0,0	52,5	12,5	20,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Lama	0,0	58,3	8,3	0,0	8,3	8,3	0,0	0,0	0,0	8,3	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Alpaka	0,0	0,0	0,0	37,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	37,5	0,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CMS15	Trampeltier	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	38,5	1,9	1,9	1,9	23,1	3,8	11,5	15,4	0,0	0,0
	Dromedar	5,3	26,3	5,3	5,3	36,8	21,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Lama	0,0	0,0	0,0	41,7	8,3	41,7	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Alpaka	0,0	0,0	62,5	0,0	0,0	25,0	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CMS16	Trampeltier	0,0	1,9	0,0	11,5	0,0	86,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Dromedar	2,5	2,5	67,5	0,0	10,0	0,0	5,0	7,5	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CMS17	Trampeltier	0,0	0,0	38,5	30,8	30,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Dromedar	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	97,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Lama	75,0	0,0	0,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Alpaka	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CMS18	Trampeltier	1,9	46,2	0,0	0,0	42,3	0,0	3,8	0,0	0,0	5,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Dromedar	70,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Lama	0,0	0,0	0,0	16,7	0,0	16,7	0,0	8,3	50,0	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Alpaka	0,0	0,0	0,0	62,5	0,0	0,0	0,0	25,0	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tab. 20: Allelfrequenzen [%] an allen polymorphen Loci (Fortsetzung)

Locus	Spezies	Frequenzen der Allele (%)															
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
CMS113	Trampeltier	0,0	0,0	0,0	0,0	9,6	23,1	21,2	0,0	23,1	0,0	9,6	13,5	0,0	0,0	0,0	0,0
	Dromedar	7,5	2,5	0,0	0,0	52,5	12,5	20,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Lama	0,0	58,3	8,3	0,0	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0	37,5	0,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Alpaka	0,0	0,0	0,0	37,5	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,3	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0
CMS121	Trampeltier	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	46,2	5,8	11,5	21,2	15,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Dromedar	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	55,0	22,5	2,5	0,0	0,0	0,0	7,5	2,5	7,5	0,0	0,0
	Lama	16,7	41,7	25,0	8,3	0,0	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Alpaka	12,5	37,5	0,0	0,0	0,0	0,0	37,5	0,0	0,0	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Die Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht waren bei den Spezies Trampeltier und Dromedar an allen Loci nicht signifikant.

4.2.2 Parameter der Heterozygotie

Die mittlere Allelzahl bei allen vier Spezies liegt zwischen 2,0 bei Alpaka und 3,3 bei Dromedar (Tab. 21). An allen Loci und in allen Spezies wurden Heterozygotiegrade berechnet. Die Heterozygotie-Parameter sind in Tab. 22 (S. 76) zu finden. Bei Trampeltier und Dromedar entsprechen die Erwartungswerte generell den Beobachtungswerten; bei Lama und Alpaka traten etwas höhere Abweichungen zwischen den erwarteten und beobachteten Heterozygotiegraden auf.

Tab. 21: Statistische Größen zur Polymorphie, ermittelt über 25 untersuchte Loci

Parameter	Trampeltier	Dromedar	Lama	Alpaka
Mittlere Tierzahl	25,7	19,8	5,8	4,0
Mittlere Allelzahl	3,2	3,3	2,7	2,0
Prozentsatz polymorphen Loci ¹⁾	56,0	52,0	60,0	60,0

¹⁾ Ein Locus wird als polymorph betrachtet, wenn die Frequenz des häufigsten Alleles 0,95 nicht überschreitet

Wie Tab. 22 darstellt, wiesen 12 aus 15 polymorphen Loci bei Trampeltier, 10 aus 14 polymorphen Loci bei Dromedar, 8 aus 12 polymorphen Loci bei Lama und 9 aus 11 polymorphen Loci bei Alpaka Heterozygotiegrade höher als 0,5 auf. Der kleinste Wert der Heterozygotie trat beim Trampeltier auf (0,04 am Locus CMS32).

Die Zahlen der beobachteten und erwarteten Heterozygoten für jeden Locus sind in die Tab. 23 (S. 77) dargestellt. Es gibt keine signifikante Unterschiede zwischen den mittleren Zahlen der beobachteten und erwarteten Heterozygoten (Abb. 14, S. 77).

Tab. 22: Beobachtete und erwartete Heterozygotiegrade

Locus	Heterozygotie (Beobachtungswert)				Heterozygotie (Erwartungswert)			
	Trampel- tier (27)	Dromedar (20)	Lama (6)	Alpaka (4)	Trampel- tier (27)	Dromedar (20)	Lama (6)	Alpaka (4)
CMS1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CMS3	0,00	0,00	0,50	0,75	0,00	0,00	0,41	0,54
CMS9	0,73	0,60	0,67	0,00	0,75	0,59	0,79	0,43
CMS10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CMS13	0,89	0,75	0,83	1,00	0,83	0,68	0,68	0,75
CMS15	0,65	0,63	0,67	0,25	0,77	0,76	0,70	0,61
CMS16	0,27	0,40	-	-	0,24	0,54	-	-
CMS17	0,50	0,05	0,50	1,00	0,68	0,06	0,50	0,57
CMS18	0,58	0,40	0,33	0,75	0,62	0,43	0,74	0,61
CMS23	0,65	0,70	-	-	0,68	0,82	-	-
CMS25	0,39	0,74	0,17	0,75	0,40	0,62	0,17	0,75
CMS31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CMS32	0,04	0,60	0,17	0,75	0,04	0,67	0,17	0,54
CMS36	0,63	0,25	-	-	0,57	0,22	-	-
CMS43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CMS44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CMS50	0,65	0,70	0,50	0,25	0,68	0,82	0,56	0,26
CMS58	0,69	0,75	-	-	0,69	0,61	-	-
CMS66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CMS102	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CMS104	0,32	0,00	0,33	0,50	0,37	0,00	0,30	0,46
CMS113	0,89	0,75	0,83	1,00	0,83	0,68	0,68	0,75
CMS121	0,62	0,65	1,00	1,00	0,72	0,66	0,79	0,79
CMS142	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CMS144	0,00	0,00	-	-	0,00	0,00	-	-
\bar{x} :	0,34	0,32	0,33	0,40	0,35	0,33	0,32	0,35
S.E.(±)	0,07	0,07	0,08	0,10	0,07	0,07	0,07	0,07

\bar{x} : Mittelwert

S.E.: Standardfehler

Tab. 23 Beobachtete und erwartete Heterozygoten

Locus	Beobachtete Heterozygote				Erwartete Heterozygote			
	Trampel- tier	Dromedar	Lama	Alpaka	Trampel- tier	Dromedar	Lama	Alpaka
CMS3	-	-	3	3	-	-	2,46	2,14
CMS9	19	12	4	0	19,61	11,82	4,73	1,71
CMS13	23	15	5	4	21,53	13,54	4,10	3,00
CMS15	17	12	4	1	20,12	14,49	4,18	2,43
CMS16	7	8	-	-	6,29	10,72	-	-
CMS17	13	1	1	4	17,57	1,00	1,00	2,29
CMS18	15	8	2	3	15,98	8,62	4,46	2,43
CMS23	17	14	-	-	17,59	16,39	-	-
CMS25	10	14	1	3	10,45	11,76	1,00	3,00
CMS32	1	12	1	3	1,00	13,41	1,00	2,14
CMS36	17	5	-	-	15,11	4,49	-	-
CMS50	17	14	3	1	17,59	16,39	3,36	1,00
CMS58	18	15	-	-	17,98	12,18	-	-
CMS104	8	-	2	2	9,31	-	1,82	1,86
CMS113	23	15	5	4	21,53	13,54	4,09	3,00
CMS121	16	13	6	4	18,61	13,00	4,73	3,14
\bar{x} :	14,73	11,29	3,08	2,67	15,35	11,52	3,08	2,35

\bar{x} : Mittelwert; - : keine Beobachtung.

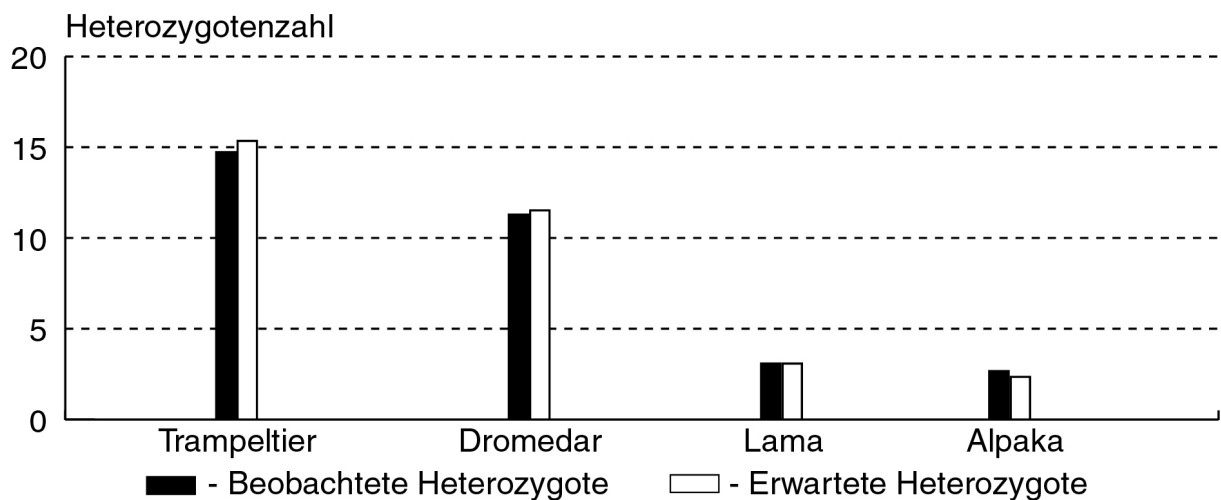


Abb. 14: Vergleiche zwischen den beobachteten und erwarteten Heterozygoten für die Mittelwerte der polymorphen Loci

Für alle polymorphen Loci und die Spezies Trampeltier und Dromedar wurden Fixationsindizes berechnet (Tab 24). Negative F-Werte bedeuten Heterozygotenüberschuss, positive Werte Homozygotenüberschuss. Die Mittelwerte der Fixationsindizes zeigen ein Variabilitätsgleichgewicht in den beiden Spezies.

Tab. 24: Fixationsindizes

Locus	Fixationsindex (F)	
	Trampeltier	Dromedar
CMS9	0,012	-0,041
CMS13	-0,089	-0,136
CMS15	0,138	0,149
CMS16	-0,134	0,234
CMS17	0,246	-0,026
CMS18	0,043	0,048
CMS23	0,014	0,124
CMS25	0,024	-0,223
CMS32	-0,020	0,082
CMS36	-0,146	-0,143
CMS50	0,014	0,124
CMS58	-0,021	-0,263
CMS104	0,123	-
CMS113	-0,089	-0,136
CMS121	0,123	-0,026
Mittelwert	0,016	-0,017

Die Prüfung auf Gleichverteilung der Allele (Tab. 25, S. 79) zwischen den Spezies zeigt hoch signifikante Unterschiede bezüglich der Allelfrequenzen und dem Auftreten von Allelen.

Tab. 25: Prüfung auf Gleichverteilung der Allele zwischen den Spezies mittels χ^2 -Test

Locus	Zahl der Allele		Signifikanz ¹⁾	
	Alle Spezies	Trampeltier+Dromedar	Alle Spezies	Trampeltier+Dromedar
CMS3	2	-	***	-
CMS9	15	10	***	***
CMS10	3	2	***	***
CMS13	12	9	***	***
CMS15	14	14	***	***
CMS16	-	9	-	***
CMS17	7	4	***	***
CMS18	11	6	***	***
CMS23	-	11	-	***
CMS25	12	10	***	***
CMS31	2	-	***	-
CMS32	7	5	***	***
CMS36	-	3	-	***
CMS50	16	11	***	***
CMS58	-	8	-	***
CMS104	7	3	***	***
CMS113	12	9	***	***
CMS121	14	10	***	***
CMS142	2	2	***	***
Total	136	126	***	***

¹⁾ ***: $p \leq 0,001$

-: Nicht auswertbar

4.2.3 Parameter für die Informativitätsschätzung

Als Kenndaten für die Informativitätsschätzung werden in [Tab. 26](#) (S. 80 f.) mehrere Parameter berücksichtigt. Mit der effektiven Anzahl der Allele (ENA) wird die Gleichmäßigkeit der Allelfrequenzen beurteilt.

Tab. 26: Informativität der polymorphen Loci

Locus	Spezies ¹⁾	Tierzahl ²⁾	Fragmentlängenbereich (bp)	NA	ENA	PIC
CMS3	Trampeltier	24	258	1	1,00	0,00
	Dromedar	18	258	1	1,00	0,00
	Lama	6	251-258	2	1,60	0,30
	Alpaka	4	251-258	2	1,88	0,36
CMS9	Trampeltier	26	233-256	7	3,84	0,70
	Dromedar	20	231-243	4	2,36	0,53
	Lama	6	227-247	5	3,60	0,68
	Alpaka	4	229-237	2	1,60	0,30
CMS13	Trampeltier	26	248-265	6	5,32	0,79
	Dromedar	20	238-254	6	2,94	0,62
	Lama	6	242-261	6	2,67	0,60
	Alpaka	4	246-265	3	2,91	0,58
CMS15	Trampeltier	26	140-159	9	4,15	0,73
	Dromedar	19	121-144	6	3,88	0,70
	Lama	6	140-146	4	2,77	0,57
	Alpaka	4	138-146	3	2,13	0,47
CMS16	Trampeltier	26	183-193	3	1,31	0,22
	Dromedar	20	179-207	7	2,09	0,50
CMS17	Trampeltier	26	144-149	3	2,96	0,59
	Dromedar	20	149-167	2	1,05	0,05
	Lama	2	135-147	2	1,60	0,30
	Alpaka	4	140-161	2	2,00	0,38
CMS18	Trampeltier	26	157-186	5	2,52	0,52
	Dromedar	20	157-163	2	1,72	0,33
	Lama	6	165-188	5	3,13	0,64
	Alpaka	4	165-182	3	2,13	0,47
CMS23	Trampeltier	26	384-412	5	2,97	0,60
	Dromedar	20	378-418	8	4,97	0,77
	Lama	4	363-373	4	3,20	0,63
CMS25	Trampeltier	26	118-128	6	1,65	0,38
	Dromedar	19	93-102	4	2,52	0,53
	Lama	6	93-95	2	1,18	0,14
	Alpaka	4	93-118	4	2,91	0,61

¹⁾: Es werden nur Spezies aufgeführt, für die der betreffende Locus ein PCR-Produkt geliefert hat; ²⁾: Zahl der erfolgreichen PCR; NA: Number of Alleles (Zahl der Allele); ENA: Effective Number of Alleles (Effektive Anzahl der Allele); PIC: Polymorphism Information Content.

Tab. 26: Invormativität der polymorphen Loci (Fortsetzung)

Locus	Spezies ¹⁾	Tierzahl ²⁾	Fragmentlängenbereich (bp)	NA	ENA	PIC
CMS32	Trampeltier	25	198-204	2	1,04	0,04
	Dromedar	20	198-209	4	2,89	0,60
	Lama	6	167-169	2	1,18	0,14
	Alpaka	4	167-169	2	1,88	0,36
CMS50	Trampeltier	26	154-183	5	2,97	0,60
	Dromedar	20	170-190	8	4,97	0,77
	Lama	6	129-140	4	2,06	0,48
	Alpaka	4	129-135	2	1,28	0,19
CMS58	Trampeltier	26	107-115	4	3,10	0,61
	Dromedar	20	98-116	5	2,46	0,54
	Alpaka	3	137-142	2	1,80	0,35
CMS104	Trampeltier	25	105-124	2	1,57	0,30
	Dromedar	20	93	1	1,00	0,00
	Lama	6	94-102	2	1,38	0,24
	Alpaka	4	100-108	3	1,68	0,37
CMS113	Trampeltier	26	132-150	6	5,32	0,79
	Dromedar	20	122-138	6	2,94	0,62
	Lama	6	126-146	6	2,67	0,60
	Alpaka	4	130-150	3	2,91	0,58
CMS121	Trampeltier	26	151-159	5	3,35	0,66
	Dromedar	20	147-166	7	2,73	0,59
	Lama	6	128-151	5	3,60	0,68
	Alpaka	4	128-157	4	3,20	0,63

¹⁾: Es werden nur Spezies aufgeführt, für die der betreffende Locus ein PCR-Produkt geliefert hat; ²⁾: Zahl der erfolgreichen PCR; NA: Number of Alleles (Zahl der Allele); ENA: Effective Number of Alleles (Effektive Anzahl der Allele); PIC: Polymorphism Information Content.

Die Ausschlusswahrscheinlichkeit bei der Abstammungskontrolle gibt für einen Locus die Wahrscheinlichkeit an, eine Elter-Nachkommenzuordnung unter Hardy-Weinberg-Gleichgewichtsbedingungen erkennen zu können. [Tab. 27](#) (S. 82) zeigt getrennt nach Spezies die Ausschlusswahrscheinlichkeiten für die polymorphen Loci. Die kumulierten Ausschlusswahrscheinlichkeiten ergaben in allen Spezies Werte mit CEP $\geq 0,98$.

Tab. 27: Ausschlusswahrscheinlichkeiten bei der Abstammungskontrolle

Locus	Ausschlusswahrscheinlichkeit (EP)			
	Trampeltier	Dromedar	Lama	Alpaka
CMS3	0	0	0,152	0,179
CMS9	0,520	0,337	0,491	0,152
CMS13	0,625	0,437	0,426	0,362
CMS15	0,553	0,515	0,366	0,277
CMS16	0,114	0,336	0	0
CMS17	0,367	0,024	0,152	0,188
CMS18	0,324	0,166	0,456	0,277
CMS23	0,389	0,611	0,427	0
CMS25	0,232	0,323	0,071	0,407
CMS32	0,019	0,400	0,071	0,179
CMS36	0,251	0,097	0	0
CMS50	0,390	0,611	0,299	0,097
CMS58	0,392	0,352	0	0,173
CMS104	0,149	0	0,120	0,213
CMS113	0,625	0,437	0,426	0,362
CMS121	0,472	0,410	0,491	0,427
CEP	0,999	0,999	0,9935	0,980

CEP: Cumulated Exclusion Probability (Ausschlusswahrscheinlichkeit bei Abstammungskontrolle für mehrere Marker)

4.3 Genetische Distanzen zwischen den Spezies

Die genetischen Distanzen wurden nach [Rogers \(1972\)](#) berechnet. Tab. 28 zeigt die Berechnungen für alle vier Spezies.

Tab. 28: Matrix der Distanzkoeffizienten für 4 Kamelspezies (Berechnet nach [Rogers 1972](#), s. S. 51)

Spezies	1	2	3	4
1 Trampeltier	*****	0,429	0,476	0,463
2 Dromedar		*****	0,548	0,512
3 Alpaka			*****	0,305
4 Lama				*****

Genetische Distanzen liegen im Bereich von 0,305 (zwischen Lama und Alpaka) und 0,548 (zwischen Dromedar und Alpaka). Die Kamelspezies wurden mit Hilfe der Daten aus der [Tab. 28](#) nach dem Gruppierungsalgorithmus UPGMA (s. [S. 51](#)) in ihren genetischen Distanzen zueinander dargestellt (Abb. 15). Die Werte der Clusteranalyse sind in [Tab. 29](#) angegeben.

Tab. 29: Clusteranalyse der genetischen Distanzen (Clusterungsalgorithmus UPGMA)

Einbezogene Spezies		Clusterwert	Zyklus
Alpaka	Lama	0,305	1
Trampeltier	Dromedar	0,429	2
Trampeltier, Dromedar	Alpaka, Lama	0,510	3

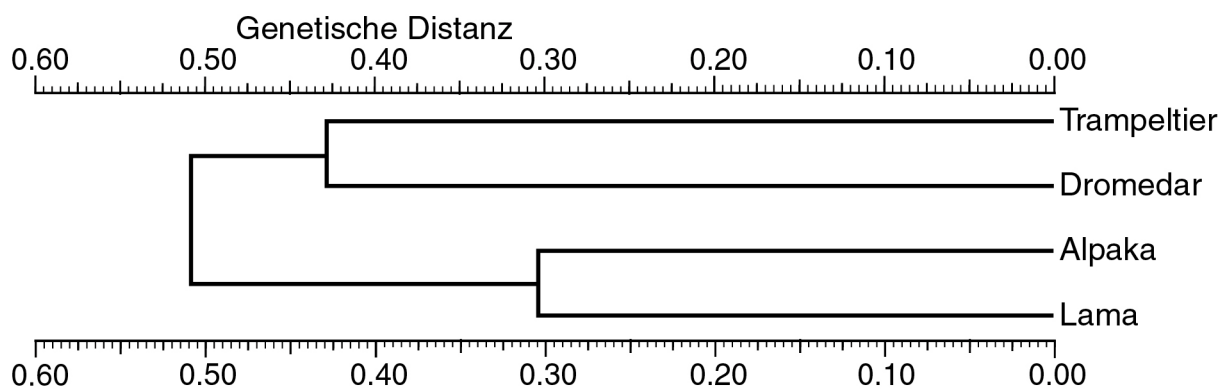


Abb. 15: Genetische Distanzen nach [Rogers \(1972\)](#)

4.4 Untersuchungen der Dromedar- und Trampeltierrassen

4.4.1 Fragmentlängenanalyse

Für die Untersuchungen wurden sechs Loci einbezogen, die beim Dromedar besonders polymorph waren. Außerdem waren die allelen Fragmente deutlich voneinander zu unterscheiden mit einem Mindestabstand von ≥ 2 bp zwischen zwei Allelen. Lediglich für den Locus CMS23 ließ sich kein PCR-Produkt von einem Tier aus der Rasse Turkana finden und für die Loci CMS121, CMS16 und CMS50 waren keine PCR-Produkte von einem Tier aus der Rasse Gabra nachzuweisen. Beispiele der für

die betrachteten sechs Loci gefundenen Fragmentlängen sind in den [Abb. 7 bis 12](#) (S. 57 ff.) dargestellt. Detaillierte Informationen über die allelen Fragmentlängen und die alphabetische Kodierung der Allele sind in [Tab. 30](#) (S. 85 f.) zu finden.

4.4.2 Anzahl und Frequenzen von Allelen und Genotypen

Für jeden Locus wurden die Allelfrequenzen in allen Rassen berechnet und in [Tab. 31](#) (S.87 f.) zusammengefasst. [Abb. 16 bis 21](#) (S. 89 ff.) zeigen die Verteilung der Allelfrequenzen. Am Locus CMS121 wurden in allen 219 Tiere (200 Dromedare und 19 Trampeltiere) insgesamt 10 Allele gefunden. Am häufigsten sind in allen Dromedarrassen die Allele B (149 bp) und C (151 bp) mit Allelfrequenzen bis zu 55,8 % bzw. bis zu 34,0 %. Beim Trampeltier trat das Allel C (151 bp) am häufigsten auf (44,7 %). Beim Locus CMS16 wurden insgesamt neun Allele gefunden. Allel C (185 bp) kommt beim Dromedar am häufigsten vor (bis zu 73,5 % in der Rasse Gabra), und Allel J (193 bp) beim Trampeltier. Der Locus CMS50 weist 13 Allele auf, von denen die Allele B (170 bp) und D (179 bp) beim Dromedar die häufigsten sind. Das Trampeltier zeigt an diesem Locus häufig das Allel L (156 bp). Am Locus CMS113 wurden zehn Allele gefunden. Das Allel C (132 bp) tritt mit einer Frequenz von bis zu 49,1 % auf und ist damit das häufigste Allel in allen vier Dromedarrassen. Beim Trampeltier war das Allel D (134 bp) am häufigsten (28,9 %) zu beobachten. Auch am Locus CMS13 waren zehn Allele zu unterscheiden, wobei die Allele C (248 bp) und E (252 bp) beim Dromedar am häufigsten vorlagen (bis zu 49,0 % bzw. 32,1 %).

Tab 30: Allele Fragmentlängen in vier Dromedarrassen und einer Trampeltierrasse

Rasse	Allel	Fragmentlängen (bp)					
		Locus CMS121	Locus CMS16	Locus CMS50	Locus CMS113	Locus CMS13	Locus CMS23
Turkana (n=51 ¹), 52)	A	147	179	147	122	238	378
	B	149	183	170	-	-	400
	C	151	185	173	132	248	402
	D	153	189	179	134	250	408
	E	162	-	181	136	252	410
	F	-	203	-	138	254	-
	G	-	207	187	-	244	416
	H	-	197	-	-	-	-
	I	-	-	-	128	-	404
Somali (n=53)	A	147	179	147	122	238	378
	B	149	183	170	126	242	400
	C	151	185	173	132	248	402
	D	153	189	179	134	250	408
	E	162	-	181	136	252	410
	F	-	203	183	138	254	412
	G	166	207	187	140	-	416
	H	-	-	190	-	256	418
	I	-	-	176	-	-	-
	J	-	-	185	-	-	414
	K	-	-	-	-	-	406
Gabra (n=51 ²), 52)	A	147	179	147	122	238	378
	B	149	183	170	-	-	400
	C	151	185	173	132	248	402
	D	-	189	179	134	250	408
	E	162	-	181	136	252	410
	F	-	203	183	138	254	412
	G	-	207	187	-	-	416
	H	168	-	-	-	-	-
Rendille (n=43)	A	147	-	147	122	238	378
	B	149	183	170	-	-	400
	C	151	185	173	132	248	402
	D	-	189	179	134	250	408
	E	162	-	181	136	252	410
	F	-	203	183	138	254	412
	G	-	207	187	-	-	416
	H	168	-	-	-	-	-

n: Zahl der Tiere mit erfolgreichen PCR; ¹): Locus CMS23 bei einem Tier nicht untersucht; ²): Loci CMS121, CMS16 und CMS50 bei einem Tier nicht untersucht; -: kein Allel der Fragmentlänge.

Tab. 30: Allele Fragmentlängen in vier Dromedarrassen und einer Trampeltier-
rasse (Fortsetzung)

Rasse	Allel	Fragmentlängen (bp)					
		Locus CMS121	Locus CMS16	Locus CMS50	Locus CMS113	Locus CMS13	Locus CMS23
Trampeltiere aus Russland (n=19)	C	151	-	-	132	248	
	D	153	-	-	134	250	
	E	-	-	-	136	252	
	G	-	-	-	140	-	
	H	-	-	-	-	256	
	I	155	187	-	-	-	
	J	157	193	-	-	-	
	K	159	-	154	146	261	
	L	-	-	156	150	265	384
	M	-	-	166	-	-	386
	N						396

n: Zahl der Tiere mit erfolgreichen PCR; ¹): Locus CMS23 bei einem Tier nicht untersucht; ²): Loci CMS121, CMS16 und CMS50 bei einem Tier nicht untersucht; -: kein Allel der Fragmentlänge.

Beim Trampeltier war das Allel D (250 bp) besonders häufig (28,9 %). Der Locus CMS23 besaß den höchsten Polymorphiegrad mit 14 Allelen. Drei Allele (B: 400 bp, C: 402 bp und D: 408 bp) hatten beim Dromedar nahezu gleiche Allelfrequenzen (bis zu 33,7 %). Die Frequenz des häufigsten Alleles M (386 bp) beim Trampeltier erreichte 44,7 %. Fast alle in einer Dromedarrassen gefundenen Allele kommen auch in anderen Rassen vor. Drei Loci (CMS16, CMS50, CMS23) zeigten keine gemeinsamen Allele bei Dromedar und Trampeltier.

Tab. 31: Allelfrequenzen [%] an den untersuchten Loci

Locus	Rasse	Frequenz der Allele													
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
CMS121	Turkana	6,7	55,8	30,8	1,0	5,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Somali	11,3	43,4	34,0	0,9	9,4	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Gabra	9,8	47,1	30,4	0,0	11,8	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Rendille	12,8	44,2	32,6	0,0	9,3	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Trampeltier	0,0	0,0	44,7	7,9	0,0	0,0	0,0	0,0	13,2	18,4	15,8	0,0	0,0	0,0
CMS16	Turkana	2,9	1,0	52,9	8,7	0,0	14,4	18,3	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Somali	0,9	6,6	70,8	12,3	0,0	2,8	6,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Gabra	1,0	2,9	73,5	7,8	0,0	4,9	9,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Rendille	0,0	1,2	70,9	7,0	0,0	14,0	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Trampeltier	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	13,2	86,8	0,0	0,0	0,0	0,0
CMS50	Turkana	1,0	31,7	25,0	31,7	9,6	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Somali	4,7	25,5	18,9	32,1	6,6	2,8	6,6	0,9	0,9	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0
	Gabra	2,0	23,5	31,4	29,4	6,9	1,0	5,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Rendille	4,7	24,4	25,6	34,9	4,7	1,2	4,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Trampeltier	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	36,8	44,7	18,4	0,0

Tab. 31: Allelfrequenzen [%] an den untersuchten Loci (Fortsetzung)

Locus	Rasse	Frequenz der Allele													
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
CMS113	Turkana	17,3	0,0	43,3	2,9	33,7	1,9	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Somali	4,7	0,9	49,1	6,6	34,0	2,8	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Gabra	20,2	0,0	37,5	12,5	26,0	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Rendille	8,1	0,0	31,4	16,3	34,9	9,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Trampeltier	0,0	0,0	10,5	28,9	21,1	0,0	23,7	0,0	0,0	0,0	7,9	7,9	0,0	0,0
CMS13	Turkana	17,3	0,0	49,0	2,9	26,9	2,9	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Somali	5,7	0,9	50,0	6,6	32,1	2,8	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Gabra	18,3	0,0	46,2	5,8	26,0	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Rendille	9,3	0,0	38,4	15,1	27,9	9,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Trampeltier	0,0	0,0	10,5	28,9	21,1	0,0	0,0	23,7	0,0	0,0	7,9	7,9	0,0	0,0
CMS23	Turkana	1,0	29,4	27,5	30,4	9,8	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Somali	4,7	24,5	19,8	32,1	6,6	2,8	6,6	0,9	0,0	0,9	0,9	0,0	0,0	0,0
	Gabra	1,9	21,2	31,7	29,8	7,7	1,0	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Rendille	3,5	22,1	27,9	33,7	7,0	1,2	4,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Trampeltier	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	36,8	44,7	18,4

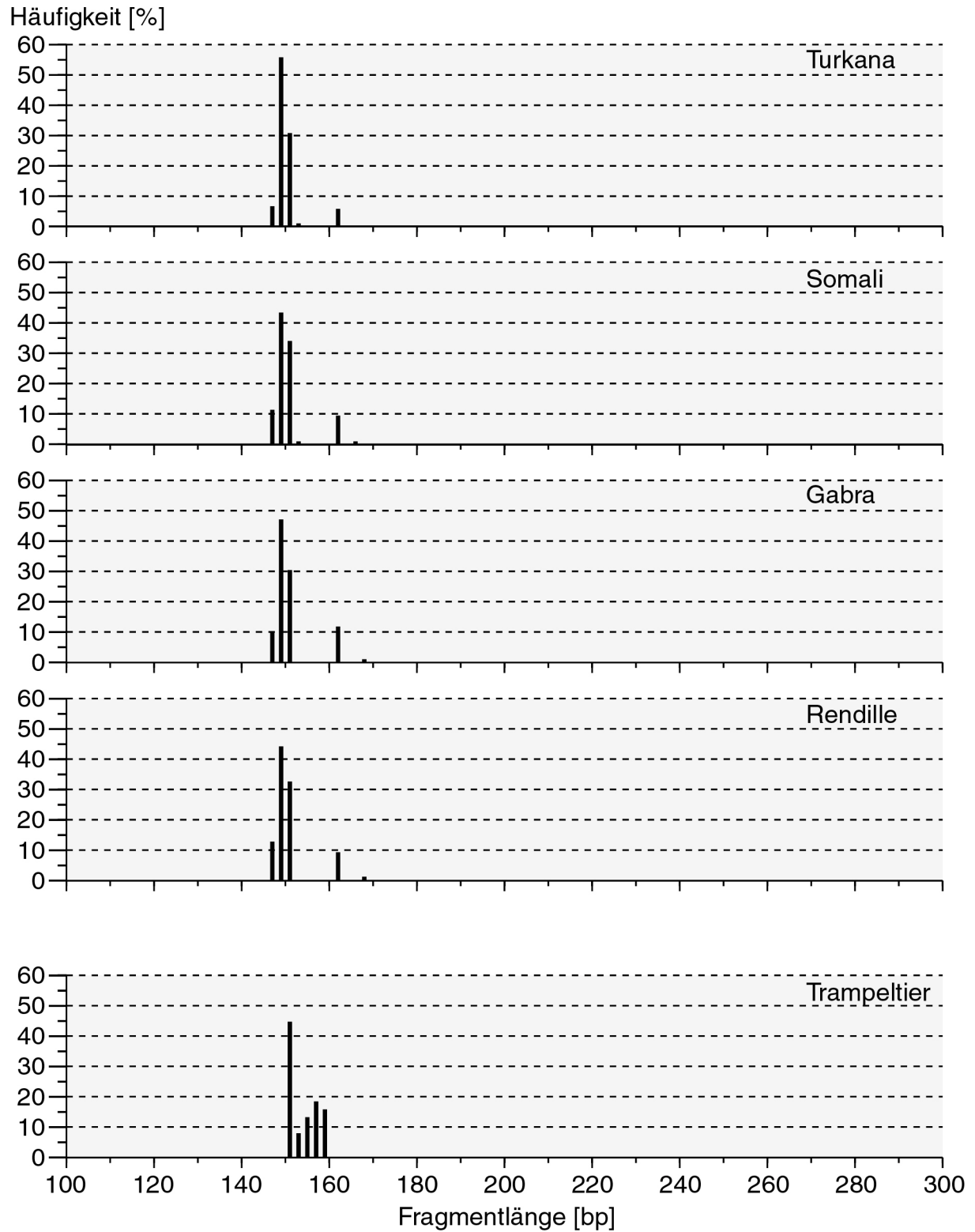


Abb. 16: Allelfrequenzenverteilung am Locus CMS121

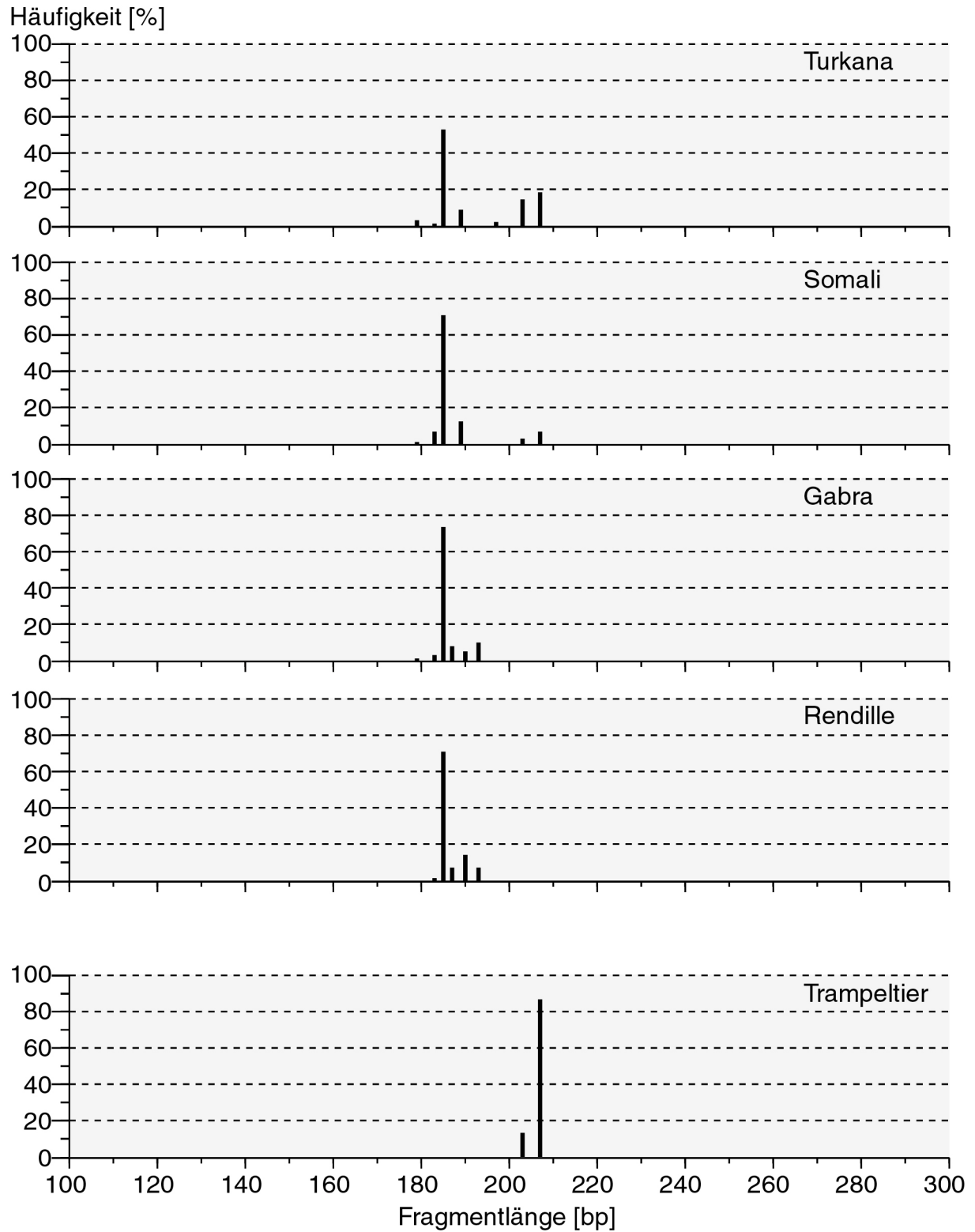


Abb. 17: Allelfrequenzenverteilung am Locus CMS16

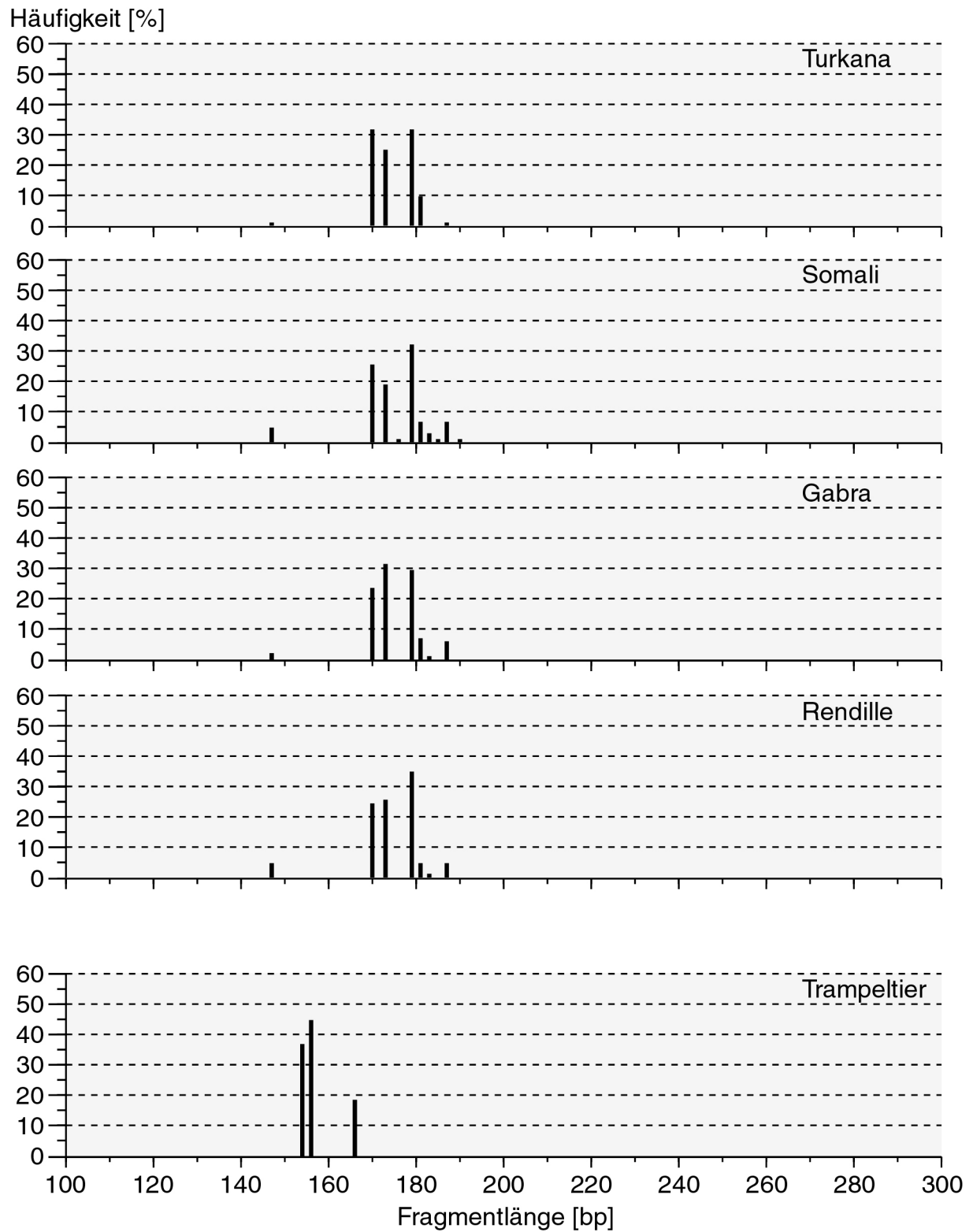


Abb. 18: Allelfrequenzenverteilung am Locus CMS50

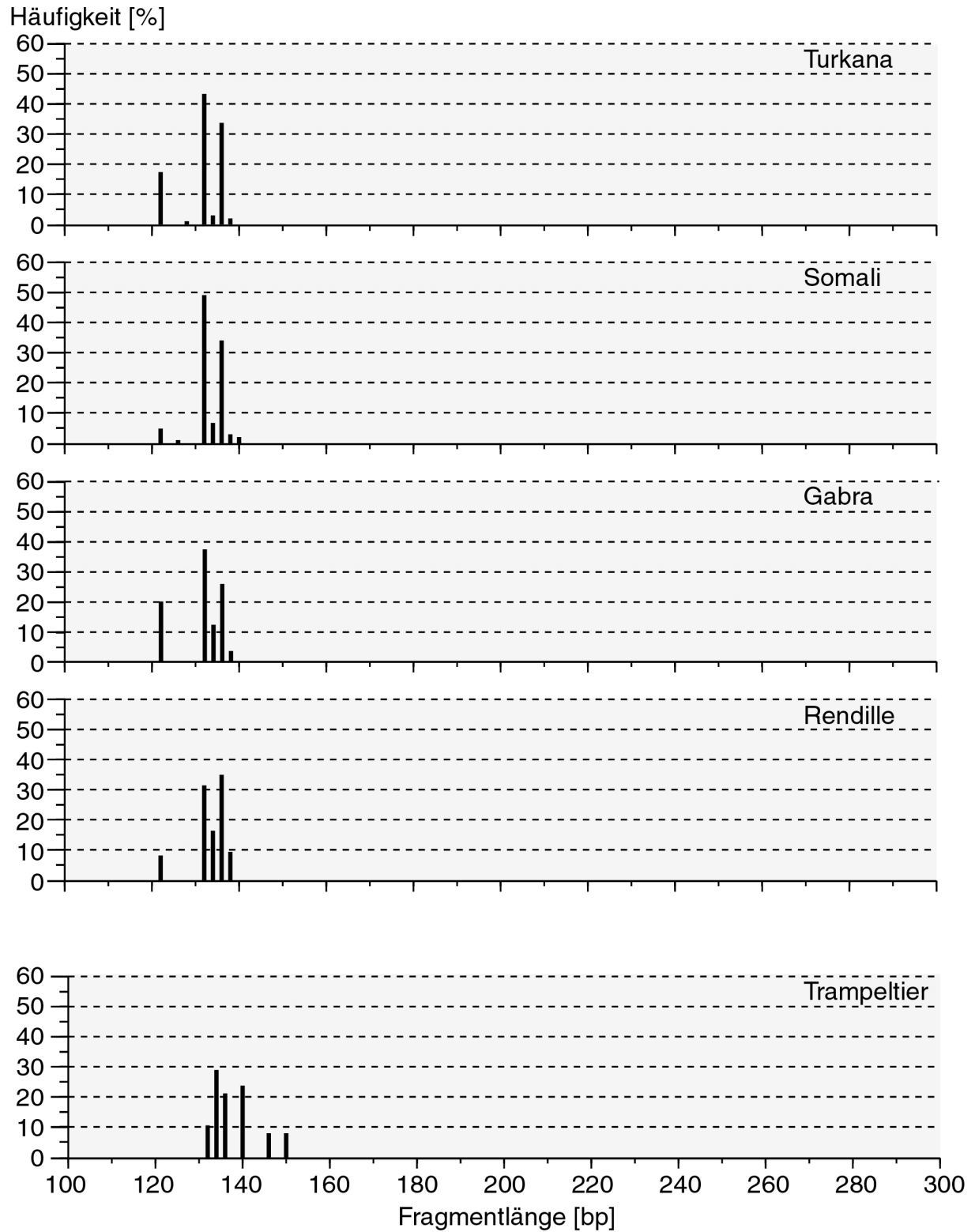


Abb. 19: Allelfrequenzenverteilung am Locus CMS113

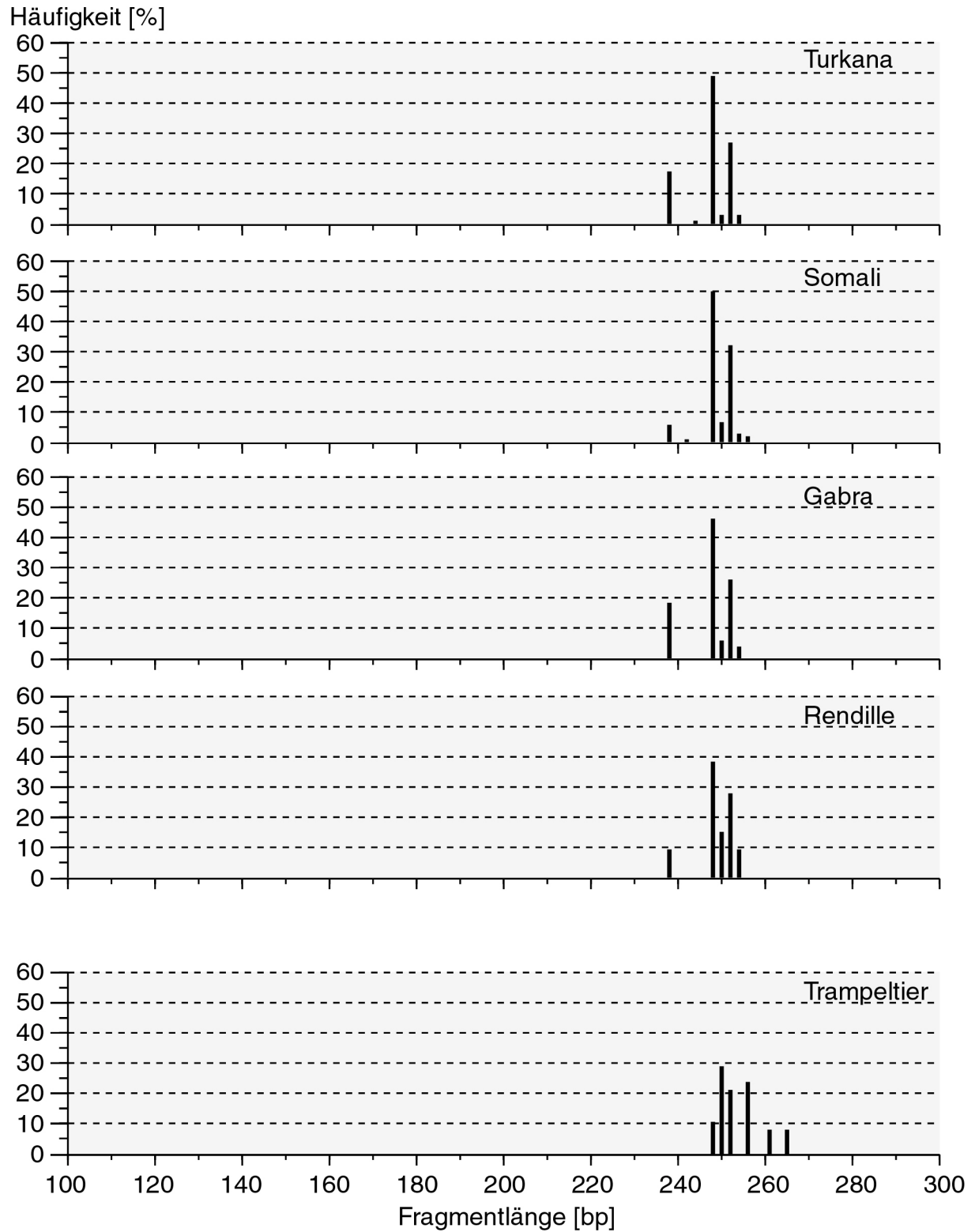


Abb. 20: Allelfrequenzenverteilung am Locus CMS13

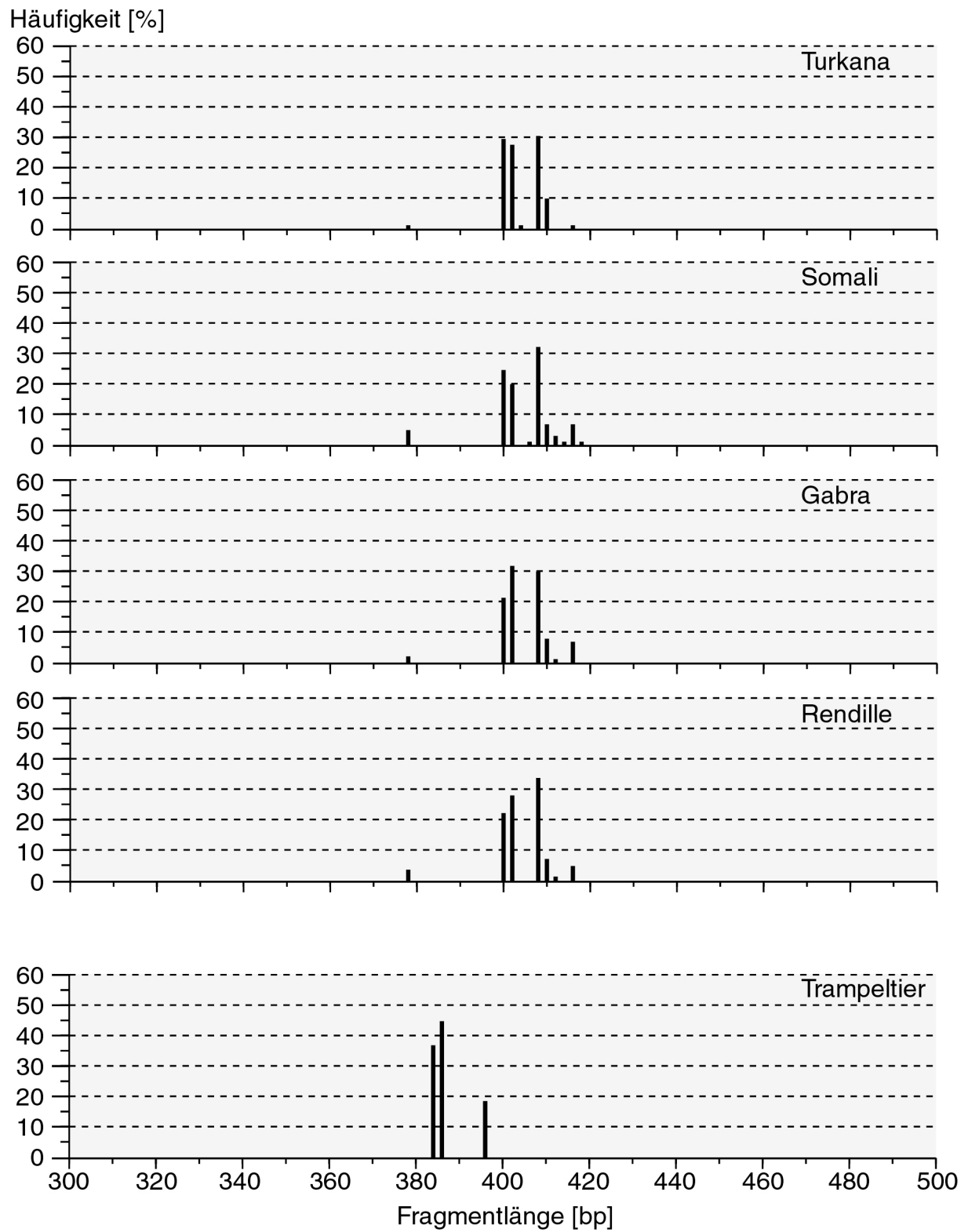


Abb. 21: Allelfrequenzenverteilung am Locus CMS23

Die Gleichverteilung der Allelfrequenzen der einzelnen Loci, geprüft mittels χ^2 -Test, werden in Tab. 32 getrennt für die Dromedarrassen sowie für den Vergleich zwischen Dromedar und Trampeltier gezeigt. Bei der Prüfung der beiden Spezies zeigten sich bei allen Loci hoch signifikante Unterschiede. Manche beim Trampeltier auftretenden Allele kamen nicht beim Dromedar vor und die meisten Allele, die man beim Dromedar fand, traten nicht beim Trampeltier auf. Beim Rassenvergleich (nur Dromedar) sind die Allele dreier Loci nahezu gleichmäßig verteilt. Drei weitere Loci zeigten bei der Allelverteilung signifikante Unterschiede.

Tab. 32: Prüfung auf Gleichverteilung der Allele pro Locus mit χ^2 -Test

Locus	Zahl der Allele		Signifikanz ³⁾	
	Dromedar ¹⁾	Dromedar+ Trampeltier ²⁾	Dromedar ¹⁾	Dromedar+ Trampeltier ²⁾
CMS121	7	10	n.s.	***
CMS16	7	9	***	***
CMS50	10	13	n.s.	***
CMS113	8	10	***	***
CMS13	8	10	**	***
CMS23	11	14	n.s.	***
Total			***	***

¹⁾: Dromedar: Rassenvergleich (4 Rassen);

²⁾: Dromedar+Trampeltier: Speziesvergleich (4 Dromedarrassen zu Spezies Dromedar zusammengefasst)

³⁾: n.s.: nicht signifikant; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$

Die Genotypfrequenzen pro Locus sind in Tab. 33 (S. 96) zusammengefasst. Abweichungen der beobachteten Häufigkeiten von den erwarteten ließen sich nur für den Locus CMS16 in der Rasse Turkana (weniger Heterozygote als erwartet) und für den Locus CMS113 in der Rasse Rendille (weniger Heterozygote als erwartet) statistisch absichern. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,10$ waren noch weitere Abweichungen festzustellen.

Tab. 33: Genotyphäufigkeiten für die untersuchten Loci. Die Prüfung auf signifikante Abweichung der beobachteten von den erwarteten Genotypfrequenzen wurde mit gepoolten Genotypgruppen über χ^2 -Tests durchgeführt.

Locus	Klasse	Turkana Frequenzen			Somali Frequenzen			Gabra Frequenzen			Rendille Frequenzen			Trampeltier Frequenzen		
		B	E	P	B	E	P	B	E	P	B	E	P	B	E	P
CMS121	1	18	16,049	0,272 n.s.	7	9,857	0,110 n.s.	13	11,168	0,303 n.s.	10	8,271	0,285 n.s.	5	3,676	0,219 n.s.
	2	22	25,903		32	26,286		22	25,663		18	21,459		7	9,649	
	3	12	10,049		14	16,857		16	14,168		15	13,271		7	5,676	
CMS16	1	18	14,417	0,046 *	27	26,429	0,703 n.s.	27	27,475	0,731 n.s.	23	21,529	0,274 n.s.	14	14,270	0,559 n.s.
	2	19	26,165		21	22,143		21	20,050		15	17,941		5	4,459	
	3	15	11,417		5	4,429		3	3,475		5	3,529		0	0	
CMS50	1	3	5,126	0,172 n.s.	6	5,343	0,678 n.s.	3	4,911	0,212 n.s.	4	5,118	0,452 n.s.	3	3,676	0,530 n.s.
	2	27	22,748		22	23,314		26	22,178		22	19,765		11	9,649	
	3	22	24,126		25	24,343		22	23,911		17	18,118		5	5,676	
CMS113	1	13	9,612	0,055 (*)	12	12,629	0,730 n.s.	10	7,194	0,096 (*)	9	5,118	0,009 **	0	1,486	0,093 (*)
	2	19	25,777		28	26,743		19	24,612		12	19,765		11	8,027	
	3	20	16,612		13	13,629		23	20,194		22	18,118		8	9,486	
CMS13	1	12	12,379	0,834 n.s.	13	13,124	0,946 n.s.	12	10,951	0,558 n.s.	7	6,212	0,611 n.s.	0	1,486	0,093 (*)
	2	27	26,243		27	26,752		24	26,097		19	20,576		11	8,027	
	3	13	13,379		13	13,124		16	14,951		17	16,212		8	9,486	
CMS23	1	2	4,604	0,084 (*)	6	5,343	0,678 n.s.	4	5,126	0,470 n.s.	4	4,776	0,595 n.s.	3	3,676	0,530 n.s.
	2	27	21,792		22	23,314		25	22,748		21	19,447		11	9,649	
	3	22	24,604		25	24,343		23	24,126		18	18,776		5	5,676	

B: beobachtete, E: erwartete Häufigkeit; P: Irrtumswahrscheinlichkeit (n.s. nicht signifikant, (*)- $p \leq 0,10$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$); Klassen: 1 - Homozygote mit häufigstem Allel; 2 - Heterozygote mit häufigstem Allel und 3 - Hetero- und Homozygote mit anderen Allelen.

4.4.3 Heterozygotiegrade

Die Heterozygotiewerte sind getrennt nach Locus und Rasse in Tab. 34 und 35 (S. 97 f.) und Abb. 22 (S. 100) angegeben.

Tab. 34: Heterozygotiegrade und genetische Variabilität für die untersuchten Loci und Populationen

Rasse	Locus	Beobachtete Heterozygotie	Erwartete Heterozygotie	Allelzahl
Turkana	CMS121	0,538	0,592	5
	CMS16	0,596	0,664	7
	CMS50	0,885	0,734	6
	CMS113	0,538	0,675	6
	CMS13	0,673	0,662	6
	CMS23	0,824	0,743	7
Mittelwert	MSS = 51,8 (0,2)	0,676 (0,060)	0,678 (0,023)	6,17 (0,31)
Somali	CMS121	0,736	0,681	6
	CMS16	0,453	0,479	6
	CMS50	0,774	0,792	10
	CMS113	0,679	0,642	7
	CMS13	0,660	0,644	7
	CMS23	0,774	0,793	10
Mittelwert	MSS = 53,0 (0,0)	0,679 (0,049)	0,672 (0,048)	7,67 (0,76)
Gabra	CMS121	0,667	0,669	5
	CMS16	0,471	0,445	6
	CMS50	0,843	0,758	7
	CMS113	0,577	0,741	5
	CMS13	0,673	0,688	5
	CMS23	0,827	0,762	7
Mittelwert	MSS = 51,5 (0,2)	0,676 (0,059)	0,677 (0,049)	5,83 (0,40)
Rendille	CMS121	0,698	0,682	5
	CMS16	0,419	0,473	5
	CMS50	0,744	0,755	7
	CMS113	0,605	0,747	5
	CMS13	0,698	0,743	5
	CMS23	0,698	0,760	7
Mittelwert	MSS = 43,0 (0,0)	0,643 (0,049)	0,693 (0,046)	5,67 (0,42)
Trampeltier	CMS121	0,684	0,737	5
	CMS16	0,263	0,235	2
	CMS50	0,684	0,647	3
	CMS113	0,895	0,814	6
	CMS13	0,895	0,814	6
	CMS23	0,684	0,647	3
Mittelwert	MSS = 19,0 (0,0)	0,684 (0,094)	0,649 (0,088)	4,17 (0,70)

MSS: Mean sample size per Locus (Mittlere Zahl der Tiere pro Locus) und in Klammern Standard-Fehler.

Die beobachteten Heterozygotiegrade entsprechen generell den Erwartungswerten. Die Unterschiede zwischen den Rassen innerhalb der Spezies *Camelus dromedarius* sind gering, wobei die mittlere Allelzahl zwischen 5,67 (Rendille) und 7,67 (Somali) variiert.

Tab. 35: Heterozygotenhäufigkeiten für die untersuchten Loci und Rassen

Rasse	Locus	Beobachtete Heterozygoten	Erwartete Heterozygoten	Fixations-Index (F)
Turkana	CMS121	28	30,786	0,082
	CMS16	31	34,515	0,093
	CMS50	46	38,155	-0,217
	CMS113	28	35,087	0,194
	CMS13	35	34,408	-0,027
	CMS23	42	37,901	-0,119
Somali	CMS121	39	36,086	-0,091
	CMS16	24	25,400	0,046
	CMS50	41	41,981	0,014
	CMS113	36	34,038	-0,068
	CMS13	35	34,152	-0,035
	CMS23	41	42,038	0,015
Gabra	CMS121	34	34,129	-0,006
	CMS16	24	22,673	-0,069
	CMS50	43	38,683	-0,123
	CMS113	30	8,544	0,214
	CMS13	35	35,777	0,012
	CMS23	43	39,631	-0,096
Rendille	CMS121	30	29,306	-0,036
	CMS16	18	20,341	0,105
	CMS50	32	32,482	0,003
	CMS113	26	32,106	0,181
	CMS13	30	31,965	0,050
	CMS23	30	32,682	0,071
Trampeltier	CMS121	13	14,000	0,046
	CMS16	5	4,459	-0,152
	CMS50	13	12,297	-0,086
	CMS113	17	15,459	-0,129
	CMS13	17	15,459	-0,129
	CMS23	13	12,297	-0,086

Der größte Unterschied zwischen beobachteten und erwarteten Genotyp-Häufigkeiten konnte in der Rasse Gabra am Locus CMS113 (30 – beobachtete; 38,544 – erwartete Heterozygote) festgestellt werden. Wie in [Tab. 35](#) (S. 98) zu erkennen ist, erreichte der Fixationsindex seinen Maximalwert (0,214) am Locus CMS113 in der Rasse Gabra (d.h. Mangel an Heterozygotbeobachtungen) und seinen geringsten Wert (-0,217) am Locus CMS50 in der Rasse Turkana (d.h. Überschuss an Heterozygotbeobachtungen).

4.4.4 Schätzung der Inzucht

Die F-Statistik ist ein Mittel zur Schätzung von Inzucht (s. [S. 49 f.](#)). Die F_{IS} -Werte aller Loci und aller Dromedarrassen sind in [Tab. 36](#) gezeigt und die F-Werte für alle Loci und Rassen in [Tab. 37](#) (S. 101).

Tab. 36: F_{IS} -Werte pro Locus und Rasse

Locus	Dromedarrassen ^{*)}			
	Turkana	Somali	Gabra	Rendille
CMS121	0,082	-0,091	-0,006	-0,036
CMS16	0,093	0,046	-0,069	0,105
CMS50	-0,217	0,014	-0,123	0,003
CMS113	0,194	-0,068	0,214	0,181
CMS13	-0,027	-0,035	0,012	0,050
CMS23	-0,119	0,015	-0,096	0,071

^{*)} Bei dieser Auswertung wurden die Dromedar-Rassen als Subpopulationen betrachtet.

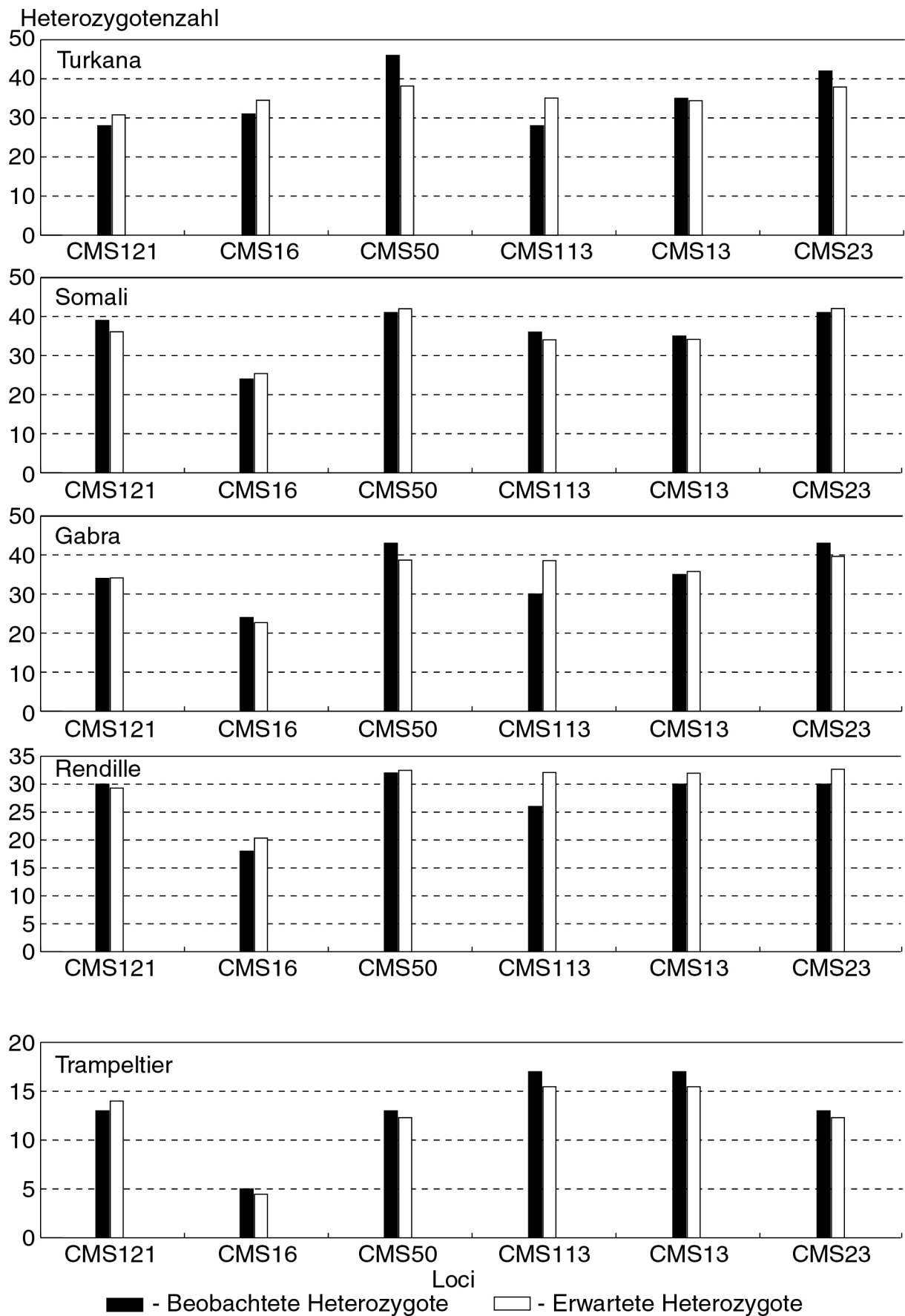


Abb. 22: Vergleich zwischen den beobachteten und erwarteten Heterozygoten

Ein positiver F_{IS} -Wert bedeutet, dass an diesem Locus ein Homozygotenüberschuss im Vergleich zu den erwarteten Werten nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht festgestellt wurde. Der Tab. 36 ist also zu entnehmen, dass für die Rasse Rendille an fünf von sechs Loci positive F_{IS} -Werte festzustellen waren. Aufgrund positiver F_{IS} -Werte an mehreren Loci lässt sich ableiten, dass in der Rasse geringfügig Inzucht gegeben war.

Tab. 37: F-Statistik pro Locus für alle Rassen

Locus	Dromedar (4 Rassen)		
	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
CMS121	-0,016	-0,010	0,006
CMS16	0,050	0,073	0,025
CMS50	-0,079	-0,072	0,006
CMS113	0,136	0,152	0,019
CMS13	0,002	0,014	0,012
CMS23	-0,031	-0,025	0,006
Total	0,007	0,018	0,011

Der F_{IT} -Wert beschreibt die genetische Variabilität in der Gesamtpopulation. Wie Tab. 37 zeigt, liegen die F_{IT} -Werte im Bereich zwischen $-0,010$ und $0,152$ mit dem Gesamtwert $0,018$ bei allen Dromedarrassen. Über alle Loci gemittelt, konnte etwa $1,1\%$ der genetischen Variabilität zwischen den Rassen durch genetische Drift erklärt werden (F_{ST} -Wert für Total).

4.4.5 Genetische Distanzen zwischen Dromedarrassen

Tab. 38 (S. 102) zeigt die genetischen Distanzen zwischen den vier Dromedarrassen, berechnet nach Nei (1972) oberhalb der Diagonalen, die geographischen Distanzen (km) gerechnet vom jeweiligen mittleren Probensammelgebiet mit Berücksichtigung topographischer Gegebenheiten sind unterhalb der Diagonalen angegeben. Die genetischen Distanzen liegen im Bereich zwischen $0,021$ und $0,045$, die geographischen Distanzen im Bereich zwischen 100 und 650 km. Die Korrelation zwischen genetischen und geographischen Distanzen mit Korrelationskoeffizienten

$r=0,85$ zeigt signifikante Abweichung von 0 mit Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,033$. Mit dem Gruppierungsalgorithmus UPGMA (s. S. 51) wurden Clusterwerte (Tab. 39) berechnet und die genetischen Distanzen in einem Dendrogramm (Abb. 23) dargestellt.

Tab. 38: Genetische Distanzen zwischen vier Dromedarrassen (Nei 1972) oberhalb, geografische Distanzen (km) unterhalb der Diagonalen

Population	Turkana	Somali	Gabra	Rendille
Turkana	*****	0,039	0,031	0,045
Somali	650	*****	0,029	0,028
Gabra	550	350	*****	0,021
Rendille	550	300	100	*****

Tab. 39: Gruppierungsanalyse der genetischen Distanzen (Methode UPGMA, Koeffizienten nach Nei, 1972)

Einbezogene Populationen		Clusterwert	Zyklus
Gabra	Rendille	0,02103	1
Somali	Gabra, Rendille	0,02852	2
Turkana	Somali, Gabra, Rendille	0,03846	3

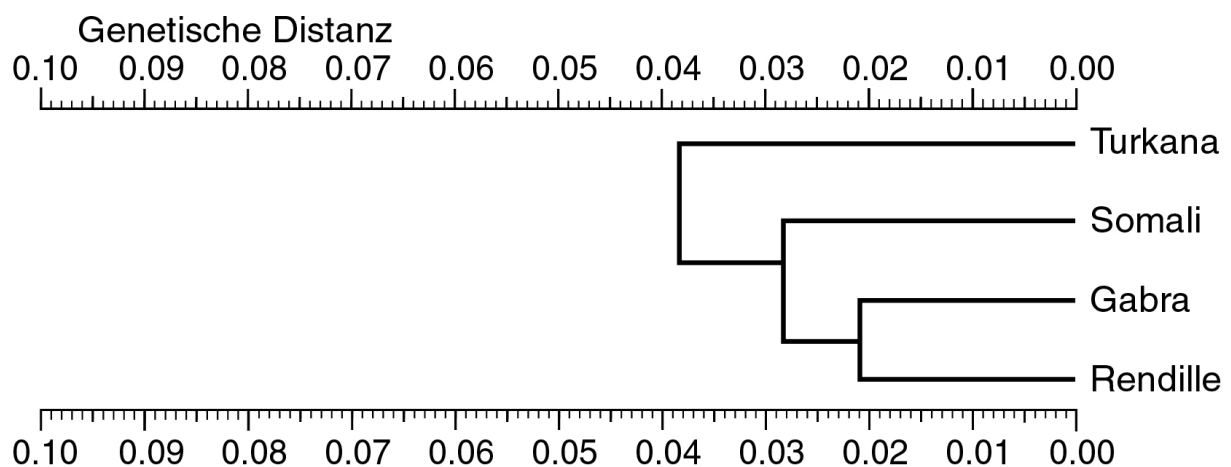


Abb. 23: Dendrogramm der Dromedar-Rassen auf Grundlage der genetischen Distanzen nach Nei (1972)

4.4.6 Genetische Distanzen zwischen Altweltkameliden

Die genetischen Distanzmaße zwischen den vier Dromedarrassen und der Trampeltierrasse aus Russland wurden nach Rogers (1972) berechnet (Tab. 40). Die daraus ermittelten Clusterwerte (Methode UPGMA, S. 51) sind in Tab. 41 wiedergegeben und zur Dendrogrammdarstellung (Abb. 24, S. 104) benutzt worden.

Tab. 40: Genetische Distanzen zwischen Dromedarrassen und Trampeltier (Rogers 1972)

Population	Turkana	Somali	Gabra	Rendille	Trampeltier
Turkana	*****	0,108	0,091	0,114	0,519
Somali		*****	0,090	0,085	0,504
Gabra			*****	0,075	0,508
Rendille				*****	0,485
Trampeltier					*****

Tab.41: Gruppierungsanalyse der genetischen Distanzen (Methode UPGMA, Koeffizienten nach Rogers 1972)

Einbezogene Populationen		Gruppierungsniveau	Zyklus
Gabra	Rendille	0,07549	1
Somali	Gabra, Rendille	0,08773	2
Turkana	Somali, Gabra, Rendille	0,10451	3
Trampeltier	Turkana, Somali, Gabra, Rendille	0,50411	4

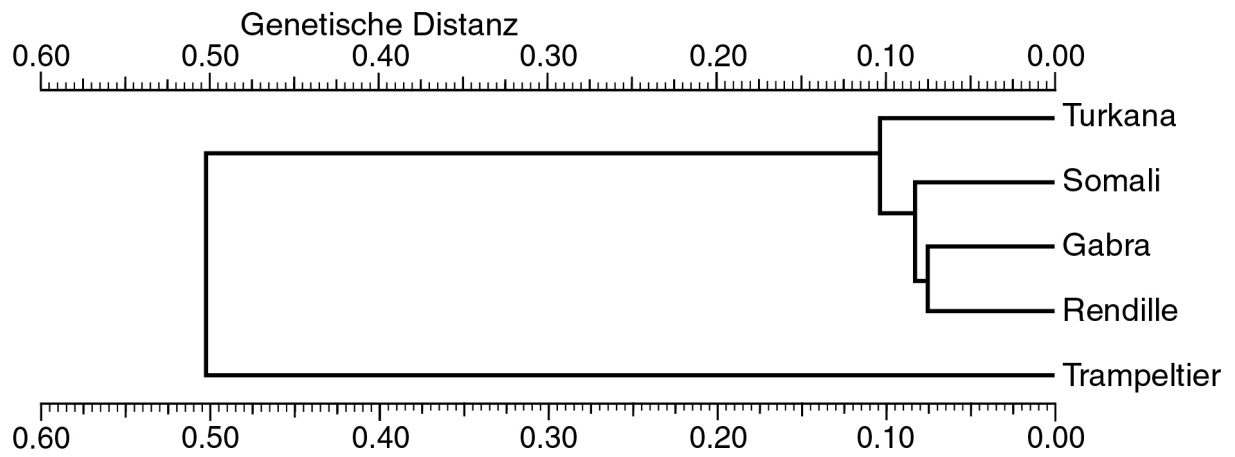


Abb. 24: Dendrogramm der Altwelt-Kameliden auf Grundlage der genetischen Distanzen nach [Rogers \(1972\)](#)

5 DISKUSSION

5.1 Tiermaterial für die Untersuchung der Informativität neuer Mikrosatellitenloci

Zur Untersuchung der Informativität neuer Mikrosatellitenloci wurden Tiere aus vier Kamel-Spezies einbezogen (siehe [Tab. 3](#), S. 27). Damit sollte eine speziesübergreifende Verwendung der für Trampeltier definierten Primer und PCR-Bedingungen erreicht werden. Ein solcher speziesübergreifender Einsatz von Primern ist für nahe verwandte Spezies einer Tierfamilie, wie z.B. die Familie *Bovidae*, bekannt ([Kemp et al. 1993](#), [Pepin et al. 1995](#)). Auf diesem Wege sollten zugleich möglichst viele Allele pro Locus nachgewiesen werden und Informativitätsparameter neuer polymorpher Loci in verschiedenen Kamel-Spezies geschätzt werden.

Für Dromedare standen Blutproben und Pedigreedaten aus Kenia zu Verfügung. Etwa zwanzig nicht verwandte Tiere konnten aus vier verschiedenen Kamelrassen Kenias ausgewählt werden. Das Geschlecht der Tiere spielte bei der Auswahl keine Rolle.

Blutproben von zwanzig Trampeltieren wurden in Russland von zwei Tierherden gesammelt. Alle Tiere waren weiblich. Da die beiden Tierherden zu einem landwirtschaftlichen Betrieb gehörten und Pedigreedaten nicht zugänglich waren, wurde vermutet, dass die Tiere miteinander verwandt waren. Zur Erhöhung der genetischen Variabilität innerhalb der Spezies Trampeltier wurden weitere Trampeltiere aus verschiedenen Zoos Deutschlands in die Informativitätsuntersuchung einbezogen.

Mehrere für Lama bzw. Alpaka charakterisierte Mikrosatellitenloci ließen sich auch beim Dromedar bzw. Trampeltier amplifizieren ([Sasse et al. 2000](#), [Jianlin et al 2000](#)). Infolgedessen wurden auch Neuwelt-Kamele aus Zoos und einer Universität (s. [Tab. 3](#), S. 27) in die Untersuchung einbezogen.

Frühere Untersuchungen benutzten ebenfalls wenige Tiere pro Spezies (3 - 12 Tiere), um Aussagen über die Informativität eines Locus treffen zu können (siehe [Tab. 1](#), S. 15). In der vorliegenden Arbeit wurden vier bis 27 Tiere pro Spezies untersucht. Mit Hilfe dieser Tiergruppen wurden verschiedene Informativitätsparameter berechnet,

z.B. Heterozygotiegrad, PIC-Index sowie Ausschlusswahrscheinlichkeit der Loci bei der Abstammungskontrolle. Trotz kleiner Tierzahlen wurden diese Parameter auch für Lama und Alpaka berechnet, obwohl für diese Spezies nur eine geringe Genauigkeit für eine statistische Aussage zu erreichen war.

Insgesamt ist bei dem Tiermaterial für den Speziesvergleich problematisch anzusehen, dass in den Tiergruppen die Verwandtschaft unbekannt war und nur beim Dromedar Rassenstichproben in die Untersuchungen einbezogen werden konnten. Es wurde angenommen, dass mit dem Tiermaterial die Informativität der neuen Mikrosatellitenloci pro Spezies grob abzuschätzen war.

5.2 Tiergruppen für Populationsuntersuchungen

Genetische Variabilität und Anwendbarkeit der sechs beim Dromedar besonders polymorphen Mikrosatellitenloci wurden in vier Dromedarrassen Kenias analysiert. Dafür wurden ca. 50 nicht verwandte Tiere pro Rasse ausgewählt (Tab. 4, S. 28). Um Verwandtschaft der Tiere zu minimieren, wurden bei der Tierausswahl nur ein bis zwei Tiere pro Dromedarherde einbezogen. Ursprünglich sollten männliche und weibliche Tiere in gleichen Anzahlen im Material vertreten sein. Bedingt durch das Zuchtprogramm waren jedoch überwiegend weibliche Kamele zu bekommen.

Mehrere mittels Mikrosatelliten durchgeführte Untersuchungen zur genetischen Variabilität von Rassen zeigten, dass bei der Verwendung von Markerloci 20 bis 50 Tiere pro Population ausreichen, um eine erste Einschätzung wichtiger Populationsparameter zu erhalten (z.B. Schlötterer u. Pemberton 1994, MacHugh et al. 1998, Peelman et al. 1998, Saitbekova et al. 1999, Hanslik et al. 2000). Bei zusammenfassender Betrachtung mehrerer Markerloci kann sogar bei kleiner Stichproben pro Population eine genaue Einschätzung erreicht werden (z.B. Weir 1995, Goldstein et al. 1999). Die ca. 50 Tiere pro Rasse ermöglichten sowohl einen Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen zwischen den Rassen als auch die Abschätzung der Heterozygotiegrade, Werte der F-Statistik und genetischen Distanzen zwischen den Rassen.

5.3 Gewinnung genomischer DNA von Kamelen

Die DNA wurde aus Blutproben gewonnen. Zu diesem Zweck wurde EDTA-stabilisiertes Blut durch Salzzugabe konserviert (siehe [Kapitel 3.6](#), S. 38). Diese einfache Methode erlaubte eine langfristige Vollblutaufbewahrung bei Temperaturen oberhalb 0°C, ohne die DNA-Qualität zu beeinflussen. Aus so gelagerten Proben ließ sich DNA mit Molekülgrößen von 1 kbp und mehr isolieren. Im Durchschnitt konnte pro 1 ml Blut ca. 400 µg DNA gewonnen werden, die für viele PCR-Ansätze ausreichte. Die Blutkonservierungsmethode erforderte keine spezielle Ausrüstung und ist unter verschiedenen klimatischen Bedingungen einsetzbar.

5.4 PCR-Amplifikation von Mikrosatellitenloci

Die PCR ist eine relativ einfache und gebräuchliche Methode, um Mikrosatellitenloci darzustellen. Die Vervielfachung des ausgewählten DNA-Bereiches beeinflussen mehrere Faktoren, wie Schmelztemperatur, Mg^{2+} -Konzentration, Primer-Konzentration etc. Bei der Optimierung der PCR-Bedingungen wurde ein Trouble-Shooting Guide von [McPherson & Møller \(2000\)](#) benutzt. Zu der PCR-Optimierung wurden folgende Faktoren berücksichtigt:

- **Schmelztemperatur.** Dieser Parameter war entscheidend für die Spezifität einer PCR-Amplifikation. Schmelztemperaturen wurden für alle untersuchte Mikrosatelliten aus der Primerzusammensetzung berechnet. Für mehrere Loci zeigte sich die berechnete Schmelztemperatur als passend, zumindest für die Trampeltier- bzw. Dromedarproben. Manche Loci zeigten jedoch keine oder eine nichtspezifische Amplifikation, so dass die Schmelztemperatur noch optimiert werden mußte. Für die Optimierung wurde ein Thermocycler mit Temperaturgradientfunktion verwendet. Dies ermöglichte es, zwölf verschiedene Temperaturen im Bereich zwischen 48 und 60 °C gleichzeitig zu testen. Nach Elektrophorese der PCR-Produkte wurde die am besten passende Schmelztemperatur aus den zwölf möglichen gewählt, was wesentlich die Effizienz der Optimierungsprozedur steigerte.

- **Mg²⁺-Konzentration.** Dieser Parameter war für die spezifische Primer-Hybridisierung maßgebend. Es wurden Mg²⁺-Konzentrationen im Bereich zwischen 1,3 und 1,6 mM berücksichtigt. Für Loci, die keine oder eine nicht-spezifische Amplifikation aufwiesen, wurde eine weitere Mg²⁺-Konzentrationsoptimierung durchgeführt (bis zu 3,0 mM). Trotzdem war es bei 9 der 34 Loci unmöglich, eine spezifische Amplifikation zu erlangen (Tab. 15, S. 54).
- **Primer- und Enzym-Konzentrationen.** Primer-Konzentrationen lagen im Bereich zwischen 10 bis 50 pMol/µl. Diese Konzentrationen waren optimal und brauchten keine weitere Optimierung. Bei der Optimierung der Loci, die keine Amplifikation zeigten, wurde die Primer-Menge verdoppelt. Für alle Loci mit spezifischen Amplifikationen genügte eine Enzym-Konzentration von 1,25 U pro 25 µl PCR-Ansatz.
- **Zyklenzahl- und -dauer.** Eine Erhöhung der Zyklenzahl führte zur Verstärkung schwacher Amplifikationen, während eine Verringerung der Zyklenzahl zur Vermeidung nichtspezifischer PCR-Produkte beitrug. Die Zahl der Zyklen variierte von Locus zu Locus von 25 bis 34. Durch eine Erhöhung der Hybridisierungszeit wurde eine bessere Primer-Template-Hybridisierung erlangt. Eine Reduzierung der Hybridisierungszeit verhinderte eine nichtspezifische Primer-Hybridisierung. Die Dauer der Hybridisierungszeit lag zwischen 0,5 und 1 min. Mit diesen Vorgaben wurden spezifische Amplifikationen erreicht und ausreichende Mengen an PCR-Produkt gewonnen.

5.5 Auswahl und Herstellung der Längenstandards für die Fragmentanalyse

Längenstandards wurden separat pro Locus ausgewählt und hergestellt. Als Template für die Erzeugung der PCR-Produkte wurde λ -DNA benutzt, da so PCR-Produkte mit bestimmten Längen erstellt werden konnten. Insgesamt wurden neun Längenstandards zwischen 80 und 550 bp verwendet.

Bei der Auswahl der internen Längenstandards war der Abstand zwischen den kleinsten und größten Fragmenten von großer Bedeutung. Ein Abstand von ca. 100

bis 150 bp erwies sich als geeignet. Darüber berichteten bereits z.B. [Ostrander et al. \(1995\)](#). Mit internen Längenstandards wurden die Unterschiede zwischen den Läufen eines Gels oder zwischen verschiedenen Gelen auf ein Mindestmaß reduziert. Für den Locus CMS23 war es wegen der größeren Fragmentlängen unmöglich, diesen Abstand einzuhalten. Trotz eines größeren Abstandes (250 bp) der beiden Längenstandards wurde die Genotypisierung nicht beeinflusst.

Zur Kontrolle wurden in jedem Gel externe Längenstandards (Standards in separaten Spuren) mitgeführt. Die Populationsuntersuchungen benötigten mehrere Gele pro Locus. Die Beobachtungen zeigten, dass zwischen den verschiedenen Gelen bzw. Läufen eines Gels Allele mit den gleichen Fragmentlängen Unterschiede bis zu 1,5 bp zeigten. Sogar Fragmente mit gleichen Längen, die in einem Gel und Lauf elektrophoretisch aufgetrennt worden waren, zeigten je nach ihrem Platz im Gel unterschiedliche Meßwerte. Dieses Problem trat bei der Untersuchung von Allelen mit Fragmentlängen größer als 250 bp auf. Um diese Geleffekte schätzen zu können und die Genotypisierung zu standardisieren, wurden konstante Vergleichs-Allele als externe Standards eingesetzt. Dies waren separat pro Locus ausgewählte PCR-Produkte von Heterozygoten, die eine gute Amplifikation zeigten und deren Allelfragmentlängen bekannt waren. Diese Proben wurden am Anfang, in der Mitte und am Ende eines Gels in jedem Lauf aufgetragen. Die externen Standards ermöglichten es, Abweichungen von bekannten Fragmentlängen zu schätzen und mit Hilfe von einer einfachen Berechnung alle gemessenen Allelfragmentlängen den bekannten Fragmentlängen zuzuordnen.

Mit Hilfe interner und externer Längenstandards wurden die Geleffekte auf ein Mindestmaß eingeschränkt.

5.6 Fragmentlängenanalyse mit dem A.L.F. DNA-Sequenzierautomaten

Alle Auftrennungen wurden in 5%-igen Hydrolink-Gelen vorgenommen. Polyacrylamidgele zeigen zwar bessere Auftrennungen der DNA-Moleküle, Hydrolink-Gele sind dagegen kostengünstiger und für bis zu drei Läufe verwendbar. Dies ermöglichte es, in einem Gel ca. 110 Proben zu untersuchen (37 Proben pro Lauf).

Auch Allele mit einem Abstand von 2 bp waren bei optimierten Auftrag sicher zu unterscheiden.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden pro Fragment die Peakhöhe und Peakfläche ausgewertet. Diese Parameter wurden von der Menge des aufgetragenen PCR-Produktes beeinflusst, wobei eine Überladung des PCR-Produktes zu einem Peak mit einem Plateau führte. In diesem Fall konnten allele Fragmente mit einem Abstand von 2 bp nicht differenziert werden. Durch Überladung verstärkte Slippage-Ereignisse zeigten sich als zusätzliche Allele. Zu geringe Auftragungsmengen machten die Genotypisierung dadurch fehlerhaft, dass schwache Amplifikationen unterhalb der Nachweisgrenze blieben. Eine Optimierung der Auftragungsmenge war also von entscheidener Bedeutung. Drei Loci (CMS1, CMS17 und CMS36) zeigten eine starke Amplifikation, so dass ihre PCR-Produkte mit Wasser verdünnt wurden (siehe [Tab. 17b](#), S. 65). Mit Ausnahme dieser drei Loci lagen die Auftragungsmengen für alle anderen Loci im Bereich zwischen 0,2 und 2,5 µl.

Die wichtigste Parameter bei der Genotypisierung waren die Zahl der Peaks in einer Spur und deren Laufzeit (Migration) relativ zu den Längenstandards und umgerechnet in Basenpaare (bp). Dabei lieferten heterozygote Genotypen zwei Peaks, was zwei Allelen entsprach, und homozygote Genotypen einen Peak, wenn Null-Allele auszuschließen waren

Im allgemeinen erwiesen sich die angewendeten Methoden für die Mikrosatellitendarstellung als geeignet, obwohl nichtspezifische PCR-Produkte bei sechs Loci auftraten. Drei Loci, die keine Amplifikation erbrachten, waren nicht zu optimieren. Mit der Definition neuer Primer sowie der Verwendung von alternativen PCR-Techniken gibt es jedoch Möglichkeiten, diese Probleme zu lösen. Hiervon wurde Abstand genommen, da es effizienter war, einen neuen Mikrosatellitenlocus zu sequenzieren und zu prüfen, als einen betrachteten Locus, der unspezifische oder keine Amplifikation aufwies, in zeitraubenden Schritten zu optimieren.

5.7 Polymorphismen der neuen Mikrosatellitenloci in verschiedenen Spezies

Eine speziesübergreifende Benutzung von Mikrosatellitenloci ist möglich, wenn die Primerbereiche innerhalb der flankierenden Sequenzen konserviert sind. Verwandte Spezies weisen oft genügend ähnliche Mikrosatellitensequenzen auf, was eine Amplifikation ermöglicht (z.B. [FitzSimmons et al. 1995](#), [Forbes et al. 1995](#), [Crawford et al. 1998](#), [Brohede u. Ellegren 1999](#)). Jedoch sinkt der Anteil der genügend konservierten Sequenzen mit steigender evolutionärer Divergenz zwischen den Spezies. [Irwin et al. \(1991\)](#) konnten nachweisen, dass von 48 beim Rind definierten Mikrosatellitenloci 56 % beim Schaf amplifiziert werden konnten, und 42 % waren davon polymorph (15 - 25 Mill. Jahren Divergenz zwischen Rind und Schaf). Keiner dieser Loci konnte beim Mensch (80 - 100 Mill. Jahren Divergenz gegenüber Rind) amplifiziert werden ([Marshall 1990](#)). Untersuchungen von [Sasse et al. \(2000\)](#) zeigten, dass 65 % von 37 polymorphen Neuwelt-Kamel-Mikrosatellitenloci sich beim Dromedar mittels Lama-Alpaka-Primerpaaren amplifizieren ließen, wobei 71 % davon polymorph waren. Eine andere Untersuchung an Dromedar und Trampeltier ([Jianlin et al. 2000](#)) zeigte, dass 95 % von 20 polymorphen Lama- und Alpaka-Loci zu amplifizieren waren, wobei 16 % der Loci monomorph waren.

In den vorliegenden Untersuchungen waren alle 25 beim Trampeltier definierten Loci mit einer spezifischen Amplifikation beim Dromedar zu amplifizieren. Von 15 beim Trampeltier polymorphen Loci waren 93 % beim Dromedar polymorph. Bei Lama und Alpaka zeigten 84 % von 25 geprüften Loci eine spezifische Amplifikation. Alle beim Trampeltier polymorphen Loci, die bei Lama und Alpaka eine spezifische Amplifikation zeigten, waren in diesen Spezies auch polymorph. Ein Locus war beim Trampeltier monomorph, zeigte jedoch zwei Allele bei Lama und Alpaka. Dieser wesentlich größere Anteil der polymorphen Kamel-Mikrosatellitenloci, die speziesübergreifend amplifiziert werden konnten, stimmt mit der kurzen Divergenzzeit der Kameliden überein. Die von [Stanley et al. \(1994\)](#) geschätzte Divergenzzeit zwischen Altwelt- und Neuwelt-Kamelen beträgt 11 Mill. Jahre, eine Speziesbildung in der Gattung *Camelus* hat vor 5-3 Mill. Jahren begonnen. Die Fähigkeit der Trampeltier-Mikrosatellitenloci zu einer Amplifikation in anderen Kamel-Spezies zeigt also, dass die flankierenden Regionen und die Polymorphismen in allen untersuchten Kamel-

Spezies während der getrennten Evolution beibehalten wurden. Die Amplifikationen bei Lama und Alpaka waren allerdings für manche Loci schwächer als solche bei Trampeltier und Dromedar, so dass Varianten in den Primersequenzen zu vermuten sind.

Die Untersuchungen an Schafen ([Forbes et al. 1995](#)) zeigten, dass diejenige Spezies, für die Primerpaare definiert worden waren, für die Mehrheit von Loci eine höhere genetische Variabilität, größere Allel-Längenspannweiten und größere mittlere allele Fragmentlängen aufwies. In der vorliegenden Untersuchung waren die Fragmentlängenbereiche pro Locus in allen vier Spezies unterschiedlich, wobei Überlappungen der speziesspezifischen Fragmentlängen oft vorkamen. 38 % der polymorphen Loci teilten in den Kamel-Spezies gemeinsame Längenbereiche. Für 25 % der polymorphen Loci wurde festgestellt, dass Alt- und Neuwelt-Kamele keine gemeinsame Längenbereiche haben ([Abb. 13](#), S. 64). Es wurden keine größeren allelen Fragmentlängenunterschiede beim Trampeltier gegenüber anderen Kamel-Spezies festgestellt. 75 % der Loci hatten beim Trampeltier einen kleineren allelen Fragmentlängenbereich als bei den anderen Spezies. Die Trampeltiere stammten jedoch überwiegend aus einer Rasse, so dass eine geringere genetische Variabilität anzunehmen war als in den anderen Tiergruppen.

Die untersuchten Spezies zeigten über alle Loci betrachtet unterschiedliche Polymorphiegrade: 60 % der polymorphen Loci wiesen mehr als zehn Allele auf (bis zu 16 Allele) und 40 % weniger als zehn Allele. Die Zahl der Allele variierte zwischen den Spezies. Allele mit gleichen Fragmentlängen kamen zwischen den Spezies oft vor. Mikrosatelliten-Allele mit den gleichen Längen in verschiedenen Spezies müssen aber nicht notwendigerweise gleich sein (z.B. [FitzSimmons et al. 1995](#), [Orti et al. 1997](#)). Zwei Allele werden als „homoplasic“ bezeichnet, wenn sie in ihrem Zustand identisch sind, trotz nicht identischer Herkunft (z.B. [Viard et al. 1998](#)). Solche „Homoplasy“ trifft besonders auf unterbrochene und zusammengesetzte Mikrosatelliten zu, wobei Insertionen oder Deletionen in den Mikrosatellitensequenzen dazu möglicherweise beigetragen haben. Eine Untersuchung der Mikrosatellitensequenzen und deren flankierende Sequenzen in verschiedenen Spezies wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Ob alle Allele mit

den gleichen Fragmentlängen auch identisch sind, ist daher noch durch Sequenzierung zu beweisen.

Alle Spezies zeigten neue allele Fragmentlängen im Vergleich zu den Fragmentlängen, die beim sequenzierten Trampeltier auftraten. Innerhalb und zwischen den Spezies unterschieden sich die Allelfragmentlängen in ungeraden Anzahlen von bp. Eine Veränderung der Allelfragmentlänge um 1 bp wurde an zwei Loci festgestellt (CMS58: zwischen Trampeltier und Dromedar – 115 bp vs. 116 bp; CMS104: zwischen Dromedar und Lama – 93 bp vs. 94 bp). Solche Versetzungen in den Fragmentlängen werden oft als ein Hinweis für Insertionen oder Deletionen in den Mikrosatellitensequenzen angesehen, die die Länge eines Mikrosatellitenlocus zusätzlich zu den Änderungen in der Repeatzahl verändern (FitzSimmons et al. 1995).

5.8 Informativitätsparameter der neuen Mikrosatellitenloci

Die Genauigkeit der Parameterschätzungen hängt mit den Frequenzen der beobachteten Allele zusammen. Sollten einige Allele nicht gefunden worden sein, wäre die Genauigkeit der Schätzungen beeinträchtigt. Außerdem werden bei einigen Parametern Hardy-Weinberg-Gleichgewichte angenommen, die in realen Populationen nicht zutreffen müssen. Schließlich konnten die Tiere nicht als Zufallsstichproben aus den Spezies entnommen werden. Außerdem spielen bei DNA-Loci Null-Allele eine Rolle. Null-Allele entstehen durch Polymorphismen in den flankierenden Sequenzen, für die die Primer definiert sind. Solche Allele sind zu beobachten, wenn die PCR nicht erfolgreich ist. Null-Allele führen daher zu einer Unterschätzung der Heterozygotiegrade. Die Untersuchungen an Mikrosatelliten beim Mensch zum Beispiel zeigten einen hohen Prozentsatz der Null-Allele (30 %) (z.B. Callen et al. 1993). In der vorliegenden Untersuchung lagen über alle Loci die Heterozygotiegrade bei Trampeltier um 4 % niedriger als erwartet (Tab 22 - 23, S. 76 f). Dies kann auch durch Inzucht bewirkt worden sein, jedoch könnten auch Null-Allele die Ursache sein.

Für die Abschätzung der Informativität wurden die unter Gleichgewichtsbedingungen erwarteten Genotyprelationen berücksichtigt. Diese Werte werden durch seltene Null-Allele kaum beeinträchtigt. Der Heterozygotiegrad sowie der PIC-Index sind auf Grund der Tierzahl bei Lama und Alpaka als grobe Schätzungen zu betrachten. Die Ergebnisse (Tab. 26, S. 80 f) zeigen, dass von 16 polymorphen Kamel-Mikrosatellitenloci 69 % Heterozygotiegrade von über 0,5 bei Trampeltier bzw. Dromedar aufweisen. Für 63 % der Loci sind die PIC-Indizes größer als 50 %. Außerdem würden die neuen Markerloci beim gemeinsamen Einsatz eine fast 100 %ige Ausschlusswahrscheinlichkeit bei Abstammungskontrollen erreichen, so dass ein aussagefähiges Markersystem für die Elternschaftskontrolle beim Kamel zu bilden ist.

5.9 Genetische Distanzen zwischen Spezies und Rassen

Trotz kleiner und ungleicher Tierzahlen war es möglich, mittels neuer Mikrosatellitenloci die genetischen Distanzen zwischen den Kamel-Spezies zu berechnen. Dabei wurde die Divergenz zwischen Neu- und Altwelt-Kamelen deutlich. Bei der Berechnung der genetischen Distanzen zwischen den Dromedarrassen wurde festgestellt, dass die genetische Distanzen den geographischen Distanzen zwischen den Rassen entsprachen. Die kleinen Werte der genetischen Distanzen lassen die Vermutung zu, dass zwischen den Rassen ein Tieraustausch stattfindet oder die Rassenformierung noch nicht lange zurückreicht. Die genetischen Distanzmaße (Distanz D nach Rogers, 1972) der getrennt durchgeführten zeigten trotz unterschiedlicher Mikrosatellitenzusammenstellung und unterschiedlicher Tiergruppen bezüglich Dromedar- und Trampeltierspezies bedeutsam hohe Übereinstimmung mit $D = 0,43$ (Distanz aus Speziesvergleich) und $D = 0,50$ (Distanz Trampeltier zu gruppierten Dromedarrassen).

5.10 Beurteilung der genetischen Struktur von Dromedar-Rassen

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Populationsuntersuchungen wurden als Anwendungsbeispiele neuer polymorphen Markerloci betrachtet. Dabei wurden sechs beim Dromedar besonders polymorphe Loci ausgewählt und in vier Dromedarrassen und einer Trampeltierrasse getestet. Dabei zeigten die

Allelfrequenzverteilungen zwischen den Dromedarrassen ähnliche Muster; wesentliche Unterschiede waren beim Vergleich der Dromedar- und Trampeltier-Allelverteilungen zu sehen. Die beobachteten Heterozygotiegrade für alle Dromedarrassen entsprachen generell genetischen Gleichgewichtsbedingungen, die Rasse Gabra zeigte jedoch einen Mangel an Heterozygoten. Die Rasse Rendille zeigte für fünf Loci eine erhöhte Homogenität im Vergleich zu anderen Rassen.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, neue Primer für die Darstellung polymorpher Mikrosatellitenloci in verschiedenen Kamel-Spezies einzusetzen und neue Mikrosatellitenloci auf Informativität zu prüfen. Einige polymorphe Loci sollten beispielhaft für die Untersuchung der genetischen Unterscheidbarkeit verschiedener Dromedarrassen Kenias und einer Trampeltierrasse Sibiriens verwendet werden.

Für die Untersuchungen stand Probenmaterial von zwei Spezies der Altwelt-Kameliden (*Camelus bactrianus* und *Camelus dromedarius*) und zwei Spezies der Neuwelt-Kameliden (*Llama pacos* und *Llama glama*) zu Verfügung. Im Einzelnen handelte es sich um Proben von 200 Tieren aus vier Dromedarrassen Kenias, 20 Tieren aus einer sibirischen Trampeltierrasse sowie sieben Trampeltieren, sechs Lamas und vier Alpakas aus deutschen Zoos oder Tierhaltungen. Als DNA-Quelle wurde Vollblut oder aus dem Blut gewonnene Leukozytenfraktion verwendet. Die Darstellung der Mikrosatellitenloci erfolgte mit Hilfe der PCR und nachfolgender Fragmentlängenanalyse im DNA-Sequenzierautomaten. Die Zahl der Allele, ihre Fragmentlängen sowie die Allel- und Genotypfrequenzen wurden pro Locus berechnet und als Ausgangsdaten für Informativitätsberechnungen genommen. Als Parameter der Informativität wurden Heterozygotiegrade, PIC-Index, effektive Anzahl der Allele und Ausschlusswahrscheinlichkeit für einen Markerlocus bzw. für mehrere Markerloci bei der Abstammungskontrolle berücksichtigt.

Es wurden Primerpaare für 34 neu beim Trampeltier sequenzierte Loci getestet. 25 dieser Loci zeigten bei Trampeltier und Dromedar spezifische PCR-Amplifikationen und wurden deswegen in die weiteren Untersuchungen der Informativität einbezogen. Hiervon führten 22 Loci auch bei Lama und Alpaka zu PCR-Produkten. Etwa ein Drittel der Loci erwies sich als monomorph, die übrigen Loci waren polymorph. Alle Loci mit spezifischen Amplifikationen, die bei Altwelt-Kameliden polymorph waren, waren auch bei den untersuchten Neuwelt-Kamelen polymorph. Loci mit spezifischen Amplifikationen ließen sich in allen vier Spezies ähnlich darstellen.

Von den 17 polymorphen Loci wiesen neun mehr als zehn Allele auf, ermittelt über alle untersuchten Spezies. Mehrere Loci waren hoch informativ. Elf Loci zeigten bei Trampeltier und Dromedar Heterozygotiegrade $> 0,5$. Aus den Ausschlusswahrscheinlichkeiten bei der Abstammungskontrolle ließ sich erkennen, dass ein aussagefähiges Markersystem für Elternschaftskontrollen beim Kamel etabliert werden konnte. Die mittels neuer Mikrosatellitenloci berechneten genetischen Distanzen zwischen den untersuchten Spezies verweisen auf deutliche Unterschiede zwischen Alt- und Neuwelt-Kameliden. Bei den Populationsuntersuchungen einiger Dromedarrassen aus Kenia konnte gezeigt werden, dass die anhand der Markerloci geschätzte Rassenverwandtschaft der geographischen Ausbreitung der Rassen entspricht. Die Untersuchungen lieferten also neue informative Marker für verschiedene genetischen Untersuchungen beim Kamel. Die Marker sind auch für die Kamelzucht (z.B. bei der Elternschaftskontrollen) von Bedeutung.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMS, L. J. & J. F. MADDOX (1994): A dinucleotide repeat polymorphism in the ovine insulin-like growth factor-I gene 5' flanking region. *Anim. Genet.* 25, 61
- ALEXANDER, L. J., G. A. ROHRER & C. W. BEATTIE (1996): Cloning and characterisation of 414 polymorphic porcine microsatellites. *Anim. Genet.* 27, 137-148
- ASHWORTH, D., M. BISHOP, K. CAMPBELL, A. COLMAN, A. KIND, A. SCHNIEKE, S. BLOTT, H. GRIFFIN, C. HALEY, J. McWHIR & I. WILMUT (1998): DNA microsatellite analysis of Dolli. *Nature* 394, 329
- BACHTROG, D., S. WEISS, B. ZANGERL, G. BREM & C. SCHLÖTTERER (1999): Distribution of dinucleotide microsatellites in the *Drosophila melanogaster* genome. *Mol. Biol. Evol.* 16, 602–610
- BALLOUX, F., E. ECOFFEY, L. FUMAGALLI, J. GOUDET, A. WYTENBACH & J. HAUSSER (1998): Microsatellite conservation, polymorphism, and GC content in shrews of the genus *Sorex* (Insectivora, Mammalia). *Mol. Biol. Evol.* 15, 473–475
- BARTENSCHLAGER, H. (2001): Persönliche Mitteilungen
- BELL, G. I. & J. JURKA (1997): The length distribution of perfect dimer repetitive DNA is consistent with its evolution by an unbiased single-step mutation process. *J. Mol. Evol.* 44, 414-421
- BENNET, P. (2000): Demystified...Microsatellites. *J. Clin. Pathol: Mol. Pathol.* 53, 177-183
- BINNS, M. M., N. G. HOLMES, E. MARTI & N. BOWEN (1995): Dog parentage testing using canine microsatellites. *Journal of Small Animal Practice* 36, 493-497
- BLANQUER-MAUMONT, A. & B. CROUAU-ROY (1995): Polymorphism, monomorphism, and sequences in conserved microsatellites in Primate species. *J. Mol. Evol.* 41, 492–497
- BOTSTEIN, D., R. L. WHITE, M. SKOLNICK & R. W. DAVIS (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314-331
- BRAATEN, D. C., J. R. THOMAS, R. D. LITTLE, K. R. DICKSON, I. GOLDBERG, D. SCHLESSINGER, A. Ciccodicola & M. D'Urso (1988): Locations and contexts of sequences that hybridize to poly(dG-dT)(dC-dA) in mammalian ribosomal DNAs and two X-linked genes. *Nucl. Acids Res.* 16, 865-881

- BRINKMANN, B., M. KLINTSCHAR, F. NEUHUBER, J. HÜHNE & B. ROLF (1998): Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 1408–1415
- BROHEDE, J. & H. ELLEGREN (1999): Microsatellite evolution: polarity of substitutions within repeats and neutrality of flanking sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **266**, 825-833
- BULL, L. N., C. R. PABON-PENA & N. B. FREIMER (1999): Compound microsatellite repeats: practical and theoretical features. *Genome Research* **9**, 830-838
- BUNCH, T. D., W.C. FOOTE & A. MACIULIS. (1985): Chromosome banding pattern homologies and NORs for the Bactrian camel, guanaco and llama. *J. Heredity* **76**, 115-118
- CAETANO, A. R. & A. T. BOWLING (1998): Characterisation of a microsatellite in the promoter region of the IGF1 gene in domestic horses and other equids. *Genome* **41**, 70–73
- CALLEN, D. F., A. D. THOMPSON, Y. SHEN, H. A. PHILLIPS, R. I. RICHARDS, J. C. MULLEY & G. R. SUTHERLAND (1993): Incidence and origin of «null» alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *Am. J. Hum. Genet.* **52**, 922-927
- CAPANNA, E. & M. V. CIVITELLI (1965): The chromosomes of three species of neotropical Camelidae. *Mammal. Chrom. News Lett.* **17**, 75-79
- CHAKRABORTY, R., M. KIMMEL, D. N. STIVERS, L. J. DAVISON & R. DEKA (1997): Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1041-1046
- CHUNG, M. Y., P. W. RANUM, L. A. DUVICK, A. SERVADIO, H. Y. ZOGHBI & H. T. ORR (1993): Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. *Nat. Genet.* **5**, 254–258
- CRAWFORD, A M, S. M. KAPPES, K. A. PATERSON, M. J. deGOTARI, K. G. DODDS, B. A. FREKING, R. T. STONE & C. W. BEATTIE (1998): Microsatellite Evolution: Testing the Ascertainment Bias Hypothesis. *J. Mol. Evol.* **46**, 256-260
- DON, R. H., P. T. COX, B. J. WAINWRIGHT, K. BAKER & J. S. MATTICK (1991): „Touchdown“ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl. Acids Res.* **19**, 4008
- EICHLER, E. E., C. B. KUNST, K. A. LUGENBEEL, O. A. RYDER, D. DAVISON, S. T. WARREN et al. (1995): Evolution of the cryptic FMR1 CGG repeat. *Nat. Genetic.* **11**, 301-307
- EISEN, J. A. (1999): Mechanistic basis for microsatellite instability: In: GOLDSTEIN D. B. & C. SCHLÖTTERER (eds) *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford

ELLEGREN, H., S. MOORE, N. ROBINSON, K. BYRNE, W. WADR & B. C. SHELDON (1997): Microsatellite evolution – a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. *Mol. Biol. Evol.* **14**, 854-860

ESTOUP, A., C. TAILLIEZ, J. M. CORNUET & M. SOLIGNAC (1995): Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bees species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Mol. Biol. Evol.* **12**, 1074–1084

FALUSH, D. & Y. IWASA (1999): Size-dependent mutability and microsatellite constraints. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 960-966

FITZSIMMONS, N. N., C. MORITZ & S. S. MOORE (1995): Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 Million years of marine turtle evolution. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 432-440

FORBES, S. H., J. T. HOGG, F. C. BUCHANAN, A. M. CRAWFORD & F. W. ALLENDORF (1995): Microsatellite evolution in congeneric mammals: Domestic and Bighorn sheep. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 1106-1113

FREUDEREICH, C. H., J. B. STAVENHAGEN & V. A. ZAKIAN (1997): Stability of CTG/CAG trinucleotide repeat in yeast is dependent on its orientation in the genome. *Mol. Cel. Biol.* **17**, 2090-2098

GARZA, J. C., M. SLATKIN & N. B. FREIMER (1995): Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees with implications for constraints on allele size. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 594–603

GLENN, T. C., W. STEPHAN, H. C. DESSAUER & M. J. BRAUN (1996): Allelic diversity in alligator microsatellite loci is negatively correlated with GC content of flanking sequences and evolutionary conservation of PCR amplifiability. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 1151–1154

GOLDSTEIN, D. B. & C. SCHLÖTTERER (1999): *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford

GOLDSTEIN, D. B., G. W. ROEMER, D. A. SMITH, D. E. REICH, A. BERGMAN & R. K. WAYNE (1999): The use of microsatellite variation to infer population structure and demographic history in a natural model system. *Genetics* **151**, 797-801

GORDON, A. J. E. (1997): Microsatellite birth register. *J. Mol. Evol.* **45**, 337-338

GRIMALDI, M. -C. & B. CROUAU-ROY (1997): Microsatellite allelic homoplasy due to variable flanking sequences. *J. Mol. Evol.* **44**, 336-340

HAN, Y., D. JEWDOTSCHENKO, G. HUE, G. REINER & H. GELDERMANN (2000): Screening and analysis of new microsatellite loci in camel. The International Conference on the Status of Plant & Animal Genome Research. San Diego, CA

HAN, Y. (2001): Persönliche Mitteilungen

- HANSLIK, S., B. HARR, G. BREM & C. SCHLÖTTERER (2000): Microsatellite analysis reveals substantial genetic differentiation between contemporary New World and Old World Holstein Friesian populations. *Anim. Genet.* **31**, 31-38
- HARE, J. (1998): Ghosts of the Gobi - Tracking the wild Bactrian camel. *Wildl. Cons. Dec.* **26**
- HAYES, T. E. & J. E. DIXON (1985): Z-DNA in the rat somatostatin gene. *J. Biol. Chem.* **260**, 8145-8156
- HENTSCHEL, C. C. (1982): Homocopolymer sequences in the spacer of a sea urchin histone gene repeat are sensitive to S₁ nuclease. *Nature* **295**, 714-716
- HEYEN, D. W., J. E. BEEVER, R. E. EVERT, C. GREEN, S. R. E. BATES, J. S. ZIEGLE & H. A. LEWIN (1997): Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. *Anim. Genet.* **28**, 21-27
- HINO, O., J. R. TESTA, K. H. BUETOW, T. TAGUCHI, J.-Y. ZHOU, M. BREMER, A. BRUZEL, R. YEUNG, G. LEVAN, K. K. LEVAN, A. G. KNUDSON & K. D. TARTOF (1993): Universal mapping probes and the origin of human chromosome 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 730-734
- HONEYCUTT, R. L., M. A. NEDBAL, R.M. ADKINS & L. L. JANECEK (1995): Mammalian mitochondrial DNA evolution: a comparison of the cytochrome *b* and *c* oxidase II genes. *J. Mol. Evol.* **40**, 260-272
- IRWIN, D. M., T. D. KOCHER & A. C. WILSON (1991): Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *J. Mol. Evol.* **32**, 128-144
- JEMIESON, A. (1994): The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Anim. Genet. Suppl.* **1**, 25, 37-44
- JIANLIN H., D. MBURU, J. OCHIENG, B. KAUFMANN, J. E. O. REGE & O. HANOTTE (2000): Application of New World Camelidae microsatellite primers for amplification of polymorphic loci in Old World camelids. *Anim. Genet.* **31**, 404-405
- JURKA, J. & P. KLONOWSKI (1996): Integration of retroposable elements in mammals: Selection of target sites. *J. Mol. Evol.* **43**, 685-689
- KASHI Y. & M. SOLLER (1999): Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: Goldstein D. B. & C. Schlotterer (eds) *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford
- KEMP, S. J., L. BREZINSKY & A. J. TEALE (1993): A panel of bovine, ovine and caprine polymorphic microsatellites. *Anim. Genet.* **24**, 363-365

- KEßLER, M. (1997): Untersuchungen zur Abstammung der domestizierten Neuweltkameliden mittels mtDNA-Analysen sowie Struktur und Zusammensetzung der Neuweltkamelidenpopulation in Deutschland. Universität Gießen, Diss.
- KHATIB, H., E. GENISLAV, L. B. CRITTENDEN, N. BUMSTEAD & M. SOLLER (1993): Sequence-tagged microsatellite sites as markers in chicken reference and resource populations. *Anim. Genet.* **24**, 355-362
- KIMURA, M. & J. F. CROW (1964): The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **49**, 725-738
- KIRKPATRICK, B. W. (1992): Identification of a conserved microsatellite site in the porcine and bovine insulin-like growth factor-I gene 5' flank. *Anim. Genet.* **23**, 543-548
- KOLLER, E., A. R. HAYMAN & B. TRUEB (1991): The promoter of the chicken $\alpha 2(\text{VI})$ collagen gene has features characteristic of house-keeping genes and of proto-oncogenes. *Nucl. Acids Res.* **19**, 485-491
- KRUGLYAK, S., R. T. DURRETT, M. D. SCHUG & C. F. AQUADRO (1998): Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10774-10778
- LANG, K. D. M., Y. WANG & Y. PLANTE (1996): Fifteen polymorphic dinucleotide microsatellites in llamas and alpacas. *Anim. Genet.* **27**, 293-294
- LEHMANN, T., W. A. HAWLEY & F. H. COLLINS (1996): An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. *Genetics* **144**, 1155-1163
- LENSCH, J. (1999): The two-humped camel (*Camelus bactrianus*). *World Anim. Rev.* **92**, 1-11 (siehe auch <http://www.fao.org/docrep/x1700t/x1700t05.htm>)
- LEVINSON, G. & G. A. GUTMAN (1987a): High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucl. Acids Res.* **15**, 5323-5338
- LEVINSON, G., G. A. GUTMAN (1987b): Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 203-221
- LITT, M., & J. A. LUTY (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* **44**, 397-401
- LOTTSPEICH, F. & H. ZORBAS (1998): *Bioanalytik*. Spectrum Acad. Verl., Heidelberg-Berlin
- LUE, N. L., A. R. BUCHMANN & R. D. KORNBERG (1989): Activation of yeast RNA polymerase II transcription by a thymidine-rich upstream element *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 486-490

- MA, R. Z., I. RUSS, C. PARK, D. W. HEYEN, J. E. BEEVER, C. A. GREEN & H. A. LEWIN (1996): Isolation and characterisation of 45 polymorphic microsatellites from the bovine genome. *Anim. Genet.* 27, 43-47
- MACAUBAS, C., L. JIN, J. HALLMAYER, A. KIMURA & E. MIGNOT (1997): The complex mutation pattern of a microsatellite. *Genome Research* 7, 635-641
- MacHUGH, D. E., R. T. LOFTUS, D. G. BRADLEY, P. M. SHARP & P. CUNNINGHAM (1994): Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 256, 25-31
- MacHUGH, D. E., R. T. LOFTUS, P. CUNNINGHAM & D. G. BRADLEY (1998): Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Anim. Genet.* 29, 333-340
- MARKLUND, S., H. ELLEGREN, S. ERIKSSON, K. SANDBERG & L. ANDERSSON (1994): Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim. Genet.* 25, 19-23
- MARSHALL, C. R. (1990): The fossil record and estimating divergence times between lineages: maximum divergence times and the importance of reliable phylogenies. *J. Mol. Evol.* 30, 400-408
- McPARTLAN, H. C., M. E. MATTHEWS & N. A. ROBINSON (1998): Alpaca microsatellites at the VIAS A1 and VIAS A2 loci. *Anim. Genet.* 29, 150-160
- McPHERSON & MØLLER (2000): PCR. BIOS Scientific Publishers Limited
- MESSIER, W., S.-H. LI & C.-B. STEWART (1996): The birth of microsatellites. *Nature* 6, 483
- MOORE, G. P. (1983): Slipped-mispairing and the evolution of introns. *TIBS* 11, 411-414
- MOORE, S. S., L. L. SARGEANT, T. J. KING, J. S. MATTICK, M. GEORGES & D. J. S. HETZEL (1991): The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* 10, 654-660
- NADIR, E., H. MARGALIT, T. GALLILY & S. A. BEN-SASSON (1996): Microsatellite spreading in the human genome: Evolutionary mechanisms and structural implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6470-6475
- NAKAMURA, Y., M. LEPPERT, P. O'CONNELL, R. WOLFF, T. HOLM, M. CULVER, C. MARTIN, E. FUJIMOTO, M. HOFF, E. KUMLIN & R. WHITE (1987): Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235, 1616-1622

NAVEILHAN, P., C. BAUDET, W. JABBOUR & D. WION (1994): A theory that may explain the Hayflick limit - a means to delete one copy of a repeating sequence during each cell cycle in certain human cells such as fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.* **75**, 205-213

NEI, M. (1972): Genetic distance between populations. *The American Naturalist* **106**, 283-292

NEI, M. (1977): F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* **41**, 225-233

OBREQUE, V., L. COOGLE, P. J. HENNEY, E. BAILEY, R. MANCILLA, J. GARCIA-HUIDOBRO, P. HINRICHSEN & E. G. COTHRAN (1998a): Characterisation of 10 polymorphic alpaca dinucleotide microsatellites. *Anim. Genet.* **29**, 461-462

OBREQUE, V., P. HINRICHSEN, E. G. COTHRAN, E. BAILEY, L. COOGLE, R. MANCILLA & J. GARCIA-HUIDOBRO (1998b): Advances in the development of a panel of microsatellites in alpaca. XXVth International Conference on Animal Genetics, Auckland, New Zeland, 23

OBREQUE, V., R. MANCILLA, J. GARCIA-HUIDOBRO, E. G. COTHRAN & P. HINRICHSEN (1999): Thirteen new dinucleotide microsatellites in alpaca. *Anim. Genet.* **30**, 397-398

OJASTI J. (1996): Wildlife Utilization in Latin America: Current Situation and Prospects for Sustainable Management. *FAO Conservation Guide-25*

ORTI, G., D. E. PEARSE & J. C. AVISE (1997): Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10745-10749

OSTRANDER, E. A., G. F. SPRAGUE, J. R. & J. RINE (1993): Identification and Characterisation of Dinucleotide Repeat (CA)_n Markers for Genetic Mapping in Dog. *AP-Genomics.* **16**, 1-7

OSTRANDER, E. A., F. A. MAPA, M. YEE & J. RINE (1995): One hundred and one new simple sequence repeat-based markers for the canine genome. *Mammal. Genome* **6**, 192-195

PEELMAN, L. J., F. MORTIAUX, A. VAN ZEVEREN, A. DANSERCOER, G. MOMMENS, F. COOPMAN, Y. BOUQUET, A. BURNY, R. RENAVILLE & D. PORTETELLE (1998): Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Anim. Genet.* **29**, 161-167

PENEDO, M. C., A. R. CAETANO & K. CORDOVA (1999a): Eight microsatellite markers for South American camelids. *Anim. Genet.* **30**, 166-167

PENEDO, M. C. T., A. R. CAETANO & K. I. CORDOVA (1999b): Six microsatellite markers for South American camelids. *Anim. Genet.* **30**, 399

- PEPIN, L. Y. AMIGUES, A. LEPINGLE, J.-L. BERTHIER, A. BENSAID & D. VAIMAN (1995): Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity* 74, 53–61
- PUPKO, T. & D. GRAUR (1999): Evolution of microsatellites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Role of length and number of repeated units. *J. Mol. Evol.* 48, 313-316
- RIEDER S., H. U. BÄRLOCHER, H. JÖRG, Ch. HAGGER & G. STRANZINGER (2000): Charakterisierung von Schweizer-Neuweltkamelidenrassen mittels Mikrosatelliten-Markern. *SAT.* 142(3), 120-125
- RIQUET, J., W. COPPIETERS, N. CAMBISANO, J. J. ARRANZ, P. BERZI, S. K. DAVIS, B. GRISTART, F. FARNIR, L. KARIM, M. MNI, P. SIMON, J. F. TAYLOR etc. (1999): Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: Application to milk production in dairy cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9252–9257
- ROBIC, A., J - L. PARROU, M. YERLE, A. GOUREAU, M. DALENS, D. MILAN & J. GELLIN, (1995): Pig microsatellites isolated from cosmids revealing polymorphism and localized on chromosomes. *Anim. Genet.* 26, 1-6
- ROGERS, J. S. (1972): Measures of genetic similarity and genetic distance. University of Texas Publication (7213): 145-153
- ROMERO, E.C. (1927): Llamas, alpacas, vicunas y guanacos. *Fac. Agr. C. Vet., Buenos Aires, Diss*
- ROSE, O. & D. FALUSH (1998): A threshold size for microsatellite expansion. *Mol. Biol. Evol.* 15, 613-615
- ROY, M. S., E. GEFEN, D. SMITH, E. A. OSTRANDER & R. K. WAYNE (1994): Patterns of differentiation and hybridization in North American Wolflike Canids, revealed by analysis of microsatellite Loci. *Mol. Biol. Evol.* 11, 553-570
- SAITBEKOVA, N., C. GAILLARD, G. OBEXER-RUFF & G. DOLF (1999): Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis. *Anim. Genet.* 30, 36-41
- SASSE, J., M. MARIASEGARAM, R. BABU, J. KINNE & U. WERNERY (2000): South American camelid microsatellite amplification in *Camelus dromedarius*. *Anim. Genet.* 31, 75-76
- SCHALLER, G.B. (1998): *Wildlife of the Tibetan Steppe*. Univ. of Chicago Press, Chicago
- SCHLÖTTERER, C (1998): Genome evolution: are microsatellites really simple sequences? *Curr. Biol.* 8, R132-R134

- SCHLÖTTERER, C. & J. PEMBERTON (1994): The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. *Mol. Ecol. Evol.*, 203-214
- SCHLÖTTERER, C. (2000): Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109, 365-371
- SCHLÖTTERER, C. & D. TAUTZ (1992): Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucl. Acids Res.* 20, 211–215
- SCHLÖTTERER, C., R. RITTER, B. HARR & G. BREM (1998): High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1269–1274
- SCHUG, M. D., C. M. HUTTER, K. A. WETTERSTRAND, M. S. GAUDETTE, T. F. C. MACKAY, C. F. AQUADRO (1998): The mutation rates of di-, tri- and tetranucleotide repeats in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1751–1760
- SCHWAIGER, F.-W. & J. T. EPPLEN (1995): Exonic MHC-DRB polymorphisms and intronic simple repeat sequences: Janus' faces of DNA sequence evolution. *Immun. Rev.* 143, 199-224
- SEMORILE, L.C., J. V. CRISCI & L. VIDAL-RIOJA (1994): Restriction site patterns in the ribosomal DNA of Camelidae. *Genetica* 92, 115-122
- SHARIFLOU, M. R. & C. MORAN (2000): Conservation within artiodactyls of an AATA interrupt in the IGF-I microsatellite for 19-35 million years. *Mol. Biol. Evol.* 17, 665-669
- SHEN, L.-P. & W. J. RUTTER (1984): Sequence of the human somatostatin gene. *Science* 224, 168-70
- SIA, E. A., R. J. KOKOSKA, M. DOMINSKA, P. GREENWELL & T. D. PETES (1997): Microsatellite instability in Yeast: Dependence on repeat unit size and DNA mismatch repair genes. *Mol. Cel. Biol.* 5, 2851-2858
- SKIDMORE, J. A., M. BILLAH, M. BINNS, R. V. SHORT & W. R. ALLEN (1999): Hybridizing Old and New World camelids: *Camelus dromedarius* x *Lama guanicoe*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 266, 649-56
- SMITH, G. P. (1976): Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science.* 191, 528-535
- SNEATH, P. H. A. & R. R. SOKAL (1973): Numerical taxonomy. W. H. Freeman, San Francisco
- STANLEY, H. F., M. KADWELL & J. C. WHEELER (1994): Molecular evolution of the family Camelidae: a mitochondrial DNA study. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 256, 1-6

- STRAND, M., M. C. EARLEY, G. F. CROUSE & T. D. PETES (1995): Mutations in the MSH3 gene preferentially lead to deletions within tracts of simple repetitive DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 10418–10421
- STREISINGER, G. & J. E. OWEN (1985): Mechanisms of spontaneous and induced frameshift mutation in bacteriophage T4. Genetics 109, 633–659
- SUTHERLAND, G. R., & R. I. RICHARDS (1995): Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 3636–3641
- SUTTON, M. D., N. G. HOLMES, F. B. BRENNAN, M. M. BINNS, E. P. KELLY & E. J. DUKE (1998): A comparative genetic analysis of the Irish greyhound population using multilocus DNA fingerprinting, canine single locus minisatellites and canine microsatellites. Anim. Genet. 29, 168-172
- SWOFFORD, D. L. & R. B. SELANDER (1989): BIOSYS-1: A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Polycop
- TALBOT, J., J. HAIGH & Y. PLANTE (1996): A parentage evaluation test in North American Elk (Wapiti) using microsatellites of ovine and bovine origin. Anim. Genet. 27, 117-119
- TAN, B.J. (1996): Into the wild - the rare and endangered species of china. New World Press, Beijing
- TAUTZ, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucl. Acids Res. 17, 6463-6471
- TAUTZ, D., & M. RENZ (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucl. Acids Res. 12, 4127-4137
- TAUTZ, D., M. TRICK & G. A. DOVER (1986): Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. Nature 322, 652-656
- TÓTH, G., Z. GÁSPÁRI & J. JURKA (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. Genome Res. 10, 967–981
- VIARD, F., P. FRANCK, M.-P. DUBOIS, A. ESTOUP & P. JARNE (1998): Variation of microsatellite size homoplasy across electromorphs, loci, and populations in three invertebrate species. J. Mol. Evol. 47, 42-51
- VIDAL-RIOJA, L., A. ZAMBELLI & L. SEMORILE (1994): An assessment of the relationships among species of Camelidae by satellite DNA comparisons. Hereditas 121, 283-290
- VIDAL-RIOJA, L., L. SEMORILE, N. O. BIANCHI & J. PADRON (1987): DNA composition in South American camelids: Characterization and *in situ* hybridisation of satellite DNA fractions. Genetica 72, 137-146

- VIDAL-RIOJA, L., M. L. LARRAMENDY & L. SEMORILE (1989): Ag-NOR staining and *in situ* hybridisation of rDNA in the chromosomes of the South American camelids. *Genetica* 79, 215-222
- WEBER, J. L. & C. WONG (1993): Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1123–1128
- WEBER, J. L. & P. E. MAY (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 388-396
- WEIR, B. S. (1995): Genetic data analysis. „Mir“, Moscow
- WIERDL, M., M. DOMINSKA, & T. D. PETES (1997): Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Genetics* 146, 769-779
- WRIGHT, S. (1978): Evolution and the genetics of population, Vol. 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago
- XU, W., L. LIU, , P. C. EMSON, C. R. HARRINGTON & I. G. CHARLES (1997): Evolution of a homopurine-homopyrimidine pentanucleotide repeat sequence upstream of the human inducible nitric oxide synthase gene. *Gene* 204, 165-170
- YUE, G. H., P. BEECKMANN, H. BARTENSCHLAGER, G. MOSER & H. GELDERMANN (1999): Rapid and precise genotyping of porcine microsatellites. *Electrophoresis* 20, 3358-3363
- ZHU, Y., D. C. QUELLER & J. E. STRASSMANN (2000): A phylogenetic perspective on sequence evolution in microsatellite loci. *J. Mol. Evol.* 50, 324-338

Herrn Prof. Dr. H. Geldermann danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und seine ständige Unterstützung sowie wertvollen Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. A. Valle Zárate danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Bei Frau Dr. Y. Han möchte ich mich für die Betreuung und Hilfe bedanken. Ebenso danke ich Frau A. Oliveira für die Durchführung eines Teils der Arbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeit.

Ich möchte mich besonders bei Herrn H. Bartenschlager für die Hilfe bei den Auswertungsarbeiten, wertvollen Vorschlägen und Bemerkungen sowie für die Hilfe bei der Bearbeitung der Grafiken bedanken. Bei Herrn Dr. S. Preuss bedanke ich mich ganz herzlich für die zahlreiche Konsultationen und Vorschlägen im Bezug auf die Hardware- bzw. Softwareangelegenheiten.

Ich möchte mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Institutes für die ständige Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit bedanken, wobei mein besonderer Dank Faruk Bozkaya und Deniz Çardak für ihre Freundschaft und zahllose kreative Teepause gilt.

Bei Frau C. Lex möchte ich mich für die Hilfe bei der redaktionellen Bearbeitung der Texte und ständige Unterstützung bei dem Ausfüllen verschiedener Formulare bedanken.

Ich bedanke mich außerdem bei den russischen Kollegen Frau Dr. N. Rudishina, Frau Dr. T. Lobanova und Herrn Dr. O. Rudishin aus AGAU (Barnaul) für die Hilfe bei der Organisation der Blutprobensammlung von Kamelen in Kosh-Agach und ihre weitere Unterstützung.

Zum Schluß möchte ich mich bei DAAD für die finanzielle Unterstützung bedanken.