

# Untersuchungen zur genetischen Diversität beim Rotwild (*Cervus elaphus*, L.) mit Hilfe von Knochen-DNA-Analysen

---

Jürgen Welte



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition linguistique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Arbeitskreis Wildbiologie e.V. (An- Institut)  
und dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
sowie der Klinik für Wiederkäuer und Schweine  
Professur für Schweinekrankheiten  
(Innere Medizin und Chirurgie)  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. E. Petzinger  
Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

**Untersuchungen zur genetischen Diversität  
beim Rotwild (*Cervus elaphus*, L.)  
mit Hilfe von Knochen-DNA-Analysen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Jürgen Welte**

Tierarzt aus Frankfurt am Main

Gießen 2014

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer**

**Gutachter: Prof. Dr. E. Petzinger  
Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner**

**Tag der Disputation: 14. Januar 2014**

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	VI
Abkürzungsverzeichnis .....	IX
 1 Einleitung und Zielsetzung .....	 1
 2 Literaturübersicht .....	 2
2.1 Hirsche .....	2
2.1.1 Das Geweih .....	3
2.1.2 Rotwildgebiete .....	4
2.2 Populationsgenetik .....	9
2.2.1 Mikrosatelliten .....	9
2.2.2 Kennzahlen der Populationsgenetik .....	10
2.2.3 Inzuchtdepression.....	13
2.3 Kennzahlen anderer Populationen .....	14
 3 Material und Methoden .....	 26
3.1 Materialien .....	26
3.1.1 Geräte .....	26
3.1.2 Chemikalien .....	26
3.1.3 Lösungen und Puffer .....	27
3.2 Probenmaterial .....	28
3.3 DNA-Extraktion .....	29
3.4 Mikrosatelliten .....	30
3.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	32
3.6 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	33
3.6.1 Probenvorbereitung und –auftrag .....	33
3.6.2 Längenstandard .....	33
3.6.3 Auswertung der PAGE .....	35
3.7 Pyrosequenzierung .....	35
3.8 Einzelsequenzierung .....	38
3.9 Auswertungen .....	40

<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Methoden .....</b>	<b>41</b>
4.1.1 Probenahme .....	41
4.1.2 DNA-Isolierung.....	41
4.1.3 Mikrosatelliten und Polymerase Kettenreaktion .....	41
<b>4.2 Mikrosatelliten .....</b>	<b>45</b>
4.2.1 MM12 .....	49
4.2.2 INRA35 .....	51
4.2.3 ETH225 .....	53
4.2.4 RT1 .....	55
4.2.5 BM1818 .....	57
4.2.6 NVHRT48 .....	59
4.2.7 IOBT918 .....	61
4.2.8 CSSM16 .....	63
4.2.9 CSSM22 .....	65
4.2.10 CSPA115 .....	67
4.2.11 ETH3 .....	69
4.2.12 IOBT965 .....	71
4.2.13 CSSM19 .....	73
4.2.14 Haut14 .....	75
4.2.15 RME25 .....	76
4.2.16 RT6 .....	78
4.2.17 CSSM14 .....	80
<b>4.3 Populationsgenetische Ergebnisse .....</b>	<b>81</b>
<b>4.4 Genetische Distanzen .....</b>	<b>81</b>
<b>4.5 Zuordnung der Abwurfstangen .....</b>	<b>86</b>
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>87</b>
5.1 Methoden .....	87
5.2 Bayerische Populationen .....	88
5.3 Europäische und nordafrikanische Populationen .....	92
5.4 Mikrosatelliten .....	102
5.5 Schlussfolgerung .....	116

<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>118</b>
<b>7 Summary .....</b>	<b>120</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>129</b>
<b>Anhang 1 Arbeitsanweisung DNA-Isolierung .....</b>	<b>134</b>
<b>Anhang 2 Arbeitsanweisung zum Gießen eines PAGE-Gels .....</b>	<b>137</b>
<b>Anhang 3 Durchführung eines PAGE-Analysenlaufs .....</b>	<b>138</b>
<b>Anhang 4 Probenvorbereitung für die Pyrosequenzierung .....</b>	<b>139</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Jagdszenen aus der Cueva de la Alpera .....	4
Abb. 2	Nixen einen Hirsch tränkend, Moritz von Schwind, 1846 .....	5
Abb. 3	Die Hessischen Rotwildgebiete .....	8
Abb. 4	Brachygnathie eines zweijährigen Hirsches aus dem Gebiet Hasselbusch .....	17
Abb. 5	Rothirschschädel, Ansicht von caudodorsal .....	30
Abb. 6	Pyrogramm (Beispiel) .....	38
Abb. 7	Ansicht der proximalen Fläche einer Geweihstange .....	41
Abb. 8	Allelfrequenzen MM12 .....	49
Abb. 9	Einzelsequenzen MM12 .....	50
Abb. 10	Allelfrequenzen INRA35 .....	51
Abb. 11	Einzelsequenzen INRA35 .....	52
Abb. 12	Allelfrequenzen ETH225 .....	53
Abb. 13	Einzelsequenzen ETH225 .....	54
Abb. 14	Allelfrequenzen RT1 .....	55
Abb. 15	Einzelsequenzen RT1 .....	56
Abb. 16	Allelfrequenzen BM1818 .....	57
Abb. 17	Einzelsequenzen BM1818 .....	58
Abb. 18	Allelfrequenzen NVHRT48 .....	59
Abb. 19	Einzelsequenzen NVHRT48 .....	60
Abb. 20	Allelfrequenzen IOBT918 .....	61
Abb. 21	Einzelsequenzen IOBT918 .....	62
Abb. 22	Allelfrequenzen CSSM16 .....	63
Abb. 23	Einzelsequenzen CSSM16 .....	64
Abb. 24	Allelfrequenzen CSSM22 .....	65
Abb. 25	Einzelsequenzen CSSM22 .....	66
Abb. 26	Allelfrequenzen CSPA115 .....	67
Abb. 27	Einzelsequenzen CSPA115 .....	68
Abb. 28	Allelfrequenzen ETH3 .....	69
Abb. 29	Allelfrequenzen IOBT965 .....	71
Abb. 30	Einzelsequenzen IOBT965 .....	72



Abb. 31	Allelfrequenzen CSSM19 .....	73
Abb. 32	Einzelsequenzen CSSM19 .....	74
Abb. 33	Allelfrequenzen Haut14 .....	75
Abb. 34	Allelfrequenzen RME25 .....	76
Abb. 35	Einzelsequenzen RME25 .....	77
Abb. 36	Allelfrequenzen RT6 .....	78
Abb. 37	Einzelsequenzen RT6 .....	79
Abb. 38	Allelfrequenzen CSSM14 .....	80
Abb. 39	Einzelsequenzen CSSM14 .....	80
Abb. 40	PCA: Alle untersuchten Hirsche im Krofdorfer Forst .....	82
Abb. 41	PCA: Untersuchte lebende Hirsche im Krofdorfer Forst .....	83
Abb. 42	Dendrogramm: Alle untersuchten Hirsche im Krofdorfer Forst.....	84
Abb. 43	Dendrogramm: Untersuchte lebende Hirsche im Krofdorfer Forst.....	85
Abb. 44	Mittlere Allelzahl, Krofdorfer Forst und bayerische Populationen .....	89
Abb. 45	Effektive Allelzahl, Krofdorfer Forst und bayerische Populationen .....	90
Abb. 46	F-Werte, Krofdorfer Forst und bayerische Populationen .....	91
Abb. 47	Mittlere Allelzahl von 96 Populationen .....	97
Abb. 48	Mittlere Allelzahl von 40 Populationen .....	98
Abb. 49	F-Werte von 96 Populationen .....	100
Abb. 50	F-Werte von 40 Populationen .....	101
Abb. 51	Mikrosatellit MM12: Allelzahl im Vergleich .....	103
Abb. 52	Mikrosatellit RT6: Allelzahl im Vergleich .....	104
Abb. 53	Mikrosatellit NVHRT48: Allelzahl im Vergleich .....	105
Abb. 54	Mikrosatellit RT1: Allelzahl im Vergleich .....	106
Abb. 55	Mikrosatellit IOBT965: Allelzahl im Vergleich .....	107
Abb. 56	Mikrosatellit ETH3: Allelzahl im Vergleich .....	108
Abb. 57	Mikrosatellit CSSM16: Allelzahl im Vergleich .....	109
Abb. 58	Mikrosatellit Haut14: Allelzahl im Vergleich .....	110
Abb. 59	Mikrosatellit RME25: Allelzahl im Vergleich .....	111
Abb. 60	F-Werte der Mikrosatelliten .....	114

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Die hessischen Rotwildgebiete .....	7
Tab. 2	Verteilung der eingesetzten Mikrosatelliten über das Genom beim Rothirsch.	31
Tab. 3	PCR-Ansatz Probe .....	33
Tab. 4	Zur Herstellung der Längenstandards verwendete Primer .....	34
Tab. 5	PCR-Ansatz Längenstandard .....	34
Tab. 6	Programm der Längenstandard-PCR .....	35
Tab. 7	Für die Pyrosequenzierung verwendete Primer .....	36
Tab. 8	PCR-Ansatz Pyrosequenzierung .....	36
Tab. 9	Programm der Pyrosequenzierungs-PCR .....	37
Tab. 10	PCR-Ansatz Einzelsequenzierung .....	39
Tab. 11	Programm der Einzelsequenzierungs-PCR .....	39
Tab. 12	Programm der ExoSAP-Behandlung .....	40
Tab. 13	Sequenzen der eingesetzten Primer .....	42
Tab. 14	Herstellung von 100 µl Monoplex-Primerlösungen .....	43
Tab. 15	Herstellung von 250 µl Multiplex-Primerlösungen .....	44
Tab. 16	Programm der Proben-PCR .....	45
Tab. 17	Kennzahlen der Mikrosatelliten .....	46
Tab. 18	Übersicht Genotypen .....	47
Tab. 19	Chi-Quadrattest, Überprüfung des Hardy-Weinberg-Equilibriums .....	48
Tab. 20	Allelfrequenzen MM12 .....	49
Tab. 21	Genotypen MM12 .....	49
Tab. 22	Allelfrequenzen INRA35 .....	51
Tab. 23	Genotypen INRA35 .....	51
Tab. 24	Allelfrequenzen ETH225 .....	53
Tab. 25	Genotypen ETH225 .....	53
Tab. 26	Allelfrequenzen RT1 .....	55
Tab. 27	Genotypen RT1 .....	55
Tab. 28	Allelfrequenzen BM1818 .....	57
Tab. 29	Genotypen BM1818 .....	57
Tab. 30	Allelfrequenzen NVHRT48 .....	59

Tab. 31	Genotypen RT1 .....	59
Tab. 32	Allelfrequenzen IOBT918 .....	61
Tab. 33	Genotypen IOBT918 .....	61
Tab. 34	Allelfrequenzen CSSM16 .....	63
Tab. 35	Genotypen CSSM16 .....	63
Tab. 36	Allelfrequenzen CSSM22 .....	65
Tab. 37	Genotypen CSSM22 .....	65
Tab. 38	Allelfrequenzen CSPA115 .....	67
Tab. 39	Genotypen CSPA115 .....	67
Tab. 40	Allelfrequenzen ETH3 .....	69
Tab. 41	Genotypen ETH3 .....	70
Tab. 42	Allelfrequenzen IOBT965 .....	71
Tab. 43	Genotypen IOBT965 .....	71
Tab. 44	Allelfrequenzen CSSM19 .....	73
Tab. 45	Genotypen CSSM19 .....	73
Tab. 46	Allelfrequenzen Haut14 .....	75
Tab. 47	Genotypen Haut14 .....	75
Tab. 48	Allelfrequenzen RME25 .....	76
Tab. 49	Genotypen RME25 .....	76
Tab. 50	Allelfrequenzen RT6 .....	78
Tab. 51	Genotypen RT6 .....	78
Tab. 52	Allelfrequenzen CSSM14 .....	80
Tab. 53	Genotypen CSSM14 .....	80
Tab. 54	Kennzahlen Kroidorfer Forst und bayerische Populationen .....	88
Tab. 55	Kennzahlen von 96 Populationen .....	93
Tab. 56	Mikrosatelliten, Allelzahl verschiedener Populationen im Vergleich .....	102
Tab. 57	Übersicht Allelzahl der Mikrosatelliten .....	112
Tab. 58	Allelfrequenzvergleich RT1 .....	113
Tab. 59	Allelfrequenzvergleich NVHRT48 .....	113
Tab. 60	Anzahl Genotypen in verschiedenen Rotwildpopulationen im Vergleich .....	115
Tab. 61	Probenahmeprotokolle .....	129
Tab. 62	DNA-Konzentrationen .....	135
Tab. 63	Sequenzen der getesteten Primer .....	136
Tab. 64	Kennzahlen IOBT965 .....	140

Tab. 65	Kennzahlen RME25 .....	140
Tab. 66	Kennzahlen CSSM16 .....	141
Tab. 67	Kennzahlen MM12 .....	141
Tab. 68	Kennzahlen Haut14 .....	142
Tab. 69	Kennzahlen INRA35 .....	142
Tab. 70	Kennzahlen CSPS115 .....	142
Tab. 71	Kennzahlen CSSM22 .....	142
Tab. 72	Kennzahlen ETH225 .....	143
Tab. 73	Kennzahlen ETH3 .....	143
Tab. 74	Kennzahlen RT1 .....	144
Tab. 75	Kennzahlen CSSM14 .....	144
Tab. 76	Kennzahlen RT6 .....	145
Tab. 77	Kennzahlen CSSM19 .....	145
Tab. 78	Kennzahlen BM1818 .....	145
Tab. 79	Kennzahlen NVHRT48 .....	146
Tab. 80	Kennzahlen IOBT918 .....	146
Tab. 81	Verwendete Mikrosatelliten aller beschriebenen Veröffentlichungen .....	147

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Acc. No.	Accession number, Zugangsnummer der Gendatenbank
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aq. bidest.	Gereinigtes, zweifach destilliertes Wasser
BAB	Bundesautobahn
bp	Basenpaare
c	Konzentration
C	Cytosin
<i>C. e.</i>	<i>Cervus elaphus</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
G	Guanin
ha	Hektar
H <sub>e</sub>	Erwartete Heterozygotie (expected heterozygosity)
H <sub>o</sub>	Beobachtete Heterozygotie (observed heterozygosity)
Hz	Hertz
int. Nr.	Interne Nummer
M	Molar, c = 1 mol/Liter
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mM	Millimolar, c = 0,001 mol/Liter
mtDNA	Mitochondriale DNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP	Nationalpark
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCA	Principal Coordinates Analyse
PCR	Polymerasekettenreaktion

rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
s	Sekunde
T	Thymin
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> - DNA- Polymerase
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)- aminomethan
u	Unit (Einheit)
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar, $c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/Liter

In dieser Arbeit wird für den Begriff „Rothirsch“ auch synonym der Begriff „Hirsch“ verwendet. Andere Hirscharten werden beim vollständigen Artnamen (z.B. Damhirsch) benannt.

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Rothirsche (*Cervus elaphus*, L.) sind die größten freilebenden Wildtiere in Deutschland. Ihr Lebensraum ist durch den Menschen aber stark eingeschränkt. Viele Populationen leben isoliert, mit der Gefahr einer drohenden Inzuchtdepression. Dies galt es bei den Rothirschen im Krofdorfer Forst, nördlich von Gießen in Hessen, zu überprüfen.

Die Rotwildhegegemeinschaft Krofdorfer Forst strebte eine genetische Untersuchung der Rothirsche im Krofdorfer Forst an. Sie stellte dazu auch finanzielle Mittel zur Verfügung.

Als Probenmaterial standen Geweihe von erlegten sowie Abwurfstangen von noch lebenden Hirschen zur Verfügung. Eine Methode zur Isolierung der DNA aus Knochenmaterial musste etabliert werden. Mit genetischen Markern (Mikrosatelliten) sollten DNA-Analysen durchgeführt werden. Auch hierzu musste eine Methode etabliert werden.

Die Analysenergebnisse waren mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen zu vergleichen und zu bewerten. Anhand der genetischen Diversität sollte indirekt eine Aussage zur Fitness der Rothirsche getroffen werden.

Die Ergebnisse waren auf das Vorliegen von Anzeichen einer Inzuchtdepression hin zu untersuchen.

Rothirsche mit Allelen, die zu einem Erhalt oder zur Verbesserung der genetischen Diversität beitragen, sollten identifiziert werden. Die Ergebnisse der genetischen Untersuchung sollten in die Bejagungspläne einfließen.

Es sollte gezeigt werden, ob und in welchem Maß Immigration zur „Blutauffrischung“, zum Erhalt oder sogar zur Verbesserung der genetischen Diversität nötig ist. Dies sollte der Rotwildhegegemeinschaft als Argumentationshilfe in der jagdpolitischen Diskussion dienen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Hirsche

Geweihtragende Säugetiere existieren in Europa schon seit Jahrtausenden. Dies belegen Geweih- beziehungsweise Stangenfunde. In Mosbach bei Wiesbaden wurde eine Stange gefunden, die der ersten Zwischeneiszeit (vor ca. 750.000 Jahren) zugeordnet wird. Aus der mittleren Zwischeneiszeit (vor ca. 250.000 Jahren) stammt ein Geweih, das in Steinheim an der Murr gefunden wurde (Beninde, 1937).

Die Familie der Hirsche wird nach heutiger Systematik in vier Unterfamilien eingeteilt: Wasserrehe (Hydropotinae), Trughirsche (Capreolinae), Muntjakhirsche (Muntiacinae) und Echte Hirsche (Cervinae). Zur kleinen Unterfamilie der Wasserrehe zählt das Wasserreh (*Hydropotes inermis*). Der Unterfamilie der Trughirsche gehören unter anderem das europäische Reh (*Capreolus capreolus*), der Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus*), das Ren (*Rangifer tarandus*) und der Elch (*Alces alces*) an. Die Muntjaks (*Muntiacus*) sind Vertreter der Unterfamilie der Muntjakhirsche. Die in dieser Arbeit untersuchten Rothirsche (*Cervus elaphus*) gehören zur Unterfamilie der Echten Hirsche. Dieser Unterfamilie gehören ebenfalls der Sikahirsch (*Cervus nippon*) und der Damhirsch (*Dama dama*) an.

Die folgende Übersicht zeigt die systematische Stellung des Rothirsches (Linnaeus, 1758) innerhalb der Klasse der Säugetiere:

Ordnung	Artiodactyla (Paarhufer)
Unterordnung	Ruminantia (Wiederkäuer)
Familie	Cervidae (Hirsche)
Unterfamilie	Cervinae (Echte Hirsche)
Gattung	Cervus
Art	<i>Cervus elaphus</i> (L.)

Ursprünglich waren Rothirsche hauptsächlich auf der nördlichen Erdhalbkugel verbreitet. Hirsche sind sehr anpassungsfähig. Sie leben auf Höhe des Meeresspiegels und im Gebirge, sie leben in atlantischen und in kontinentalen Klimazonen. In der Vergangenheit wurden



Rothirsche zum Beispiel in Neuseeland und in Südamerika erfolgreich angesiedelt (v. Raesfeld und Reulecke, 1988). So kann man heute von einer weltweiten Verbreitung der Rothirsche sprechen.

Diese weite Verbreitung spiegelt auch die Systematik der Anzahl der Unterarten wider. Die Unterarten unterscheiden sich zum Beispiel im Körperbau, in Körpergröße und Gewicht, in der Fellfarbe, im Mähnenbehang und in der geografischen Verbreitung. Aufgrund von bewussten Einkreuzungen zur Blutauffrischung kam es auch immer wieder zur Vermischung von Unterarten (Beninde, 1937).

Wildwiederkäuer werden in drei unterschiedliche Äsungstypen eingeteilt. Man unterscheidet den Rauhfutterfresser, den Konzentratsselektierer und den Intermediärtyp als Zwischenstellung der beiden erstgenannten Typen. Der Rothirsch ist als Mischäser ein Intermediärtyp (Hofmann, 1981). Gräser und Kräuter in Bodennähe stellen die Hauptnahrung dar. Je nach Jahreszeit und Futterangebot spielt aber auch die Äsung an Sträuchern und Bäumen eine wichtige Rolle (Dzieciolowski, 1969). In der Krautschicht werden fast alle Pflanzen genutzt. Lediglich einige Sauergräser werden gemieden (Petrak, 1982). Es werden jedoch nicht alle Pflanzen gleichermaßen aufgenommen. Bei den Bäumen werden die Rinden der Esche (*Fraxinus spec.*) und Fichte (*Pices abies*) bevorzugt geschält (Ueckermann, 1960). Weitere Untersuchungen zeigten, dass ungefähr 85 - 90 % der vorhandenen Pflanzenarten zur Nahrungsaufnahme genutzt werden. Der Bevorzugungsgrad der beästen Pflanzenarten im Zusammenhang mit der Wildtierdichte war Gegenstand einer Untersuchung von Kraus (1985). Danach hat der Rothirsch ein breites Nahrungsspektrum und kann sich so Veränderungen im Nahrungsangebot leicht anpassen.

Das Rotwild ist nach seinem Verhalten und seinem Körperbau ein Läufer Typ. Merkmale hierfür sind die gerade gestreckte Wirbelsäule und die geraden Hinterläufe. Der aufrechte Gang und das oft mächtige Geweih sind Beleg, dass das Rotwild ursprünglich ein Bewohner von offenen Landschaften und lichten Wäldern war (Bützler, 2001). Heute ist das Rotwild fast ausschließlich in Wäldern anzutreffen.

### **2.1.1 Das Geweih**

In der Regel wirft ein Hirsch sein Geweih im Februar ab. Auf dem knöchernen Sockel, dem Rosenstock, wird binnen ca. 120 Tagen ein neues Geweih gebildet. In der Bildungszeit ist es vom Bast umgeben. Im Bast, der dem Knochenperiost entspricht, verlaufen für die Bildung

und Ernährung nötige Blut- und Nervengefäße. Ebenso befinden sich Duftdrüsen in der Basthaut. Im Juli wird der Bast abgestreift. In der Jägersprache wird „der Bast gefegt“. Das Geweih, nun nicht mehr innerviert, kann als Waffe eingesetzt werden. Im Februar bildet sich unterhalb der Rose eine Demarkationslinie. Diese zeigt den baldigen Abwurf der Geweihstangen an dieser Linie an (v. Raesfeld und Reulecke, 1988).

Der Zyklus der Geweihbildung und des Abwurfes ist von mehreren Faktoren abhängig. Generell ist der Zyklus hormonell gesteuert. Witterung, Nahrungsangebot, Konkurrenten im Revier, Krankheiten und Alter des Hirsches haben Einfluss auf den Zyklus (Bubenik, 1966). Die Gehalte an Spurenelementen im Geweih sind nicht konstant. Bei bekannten Böden kann man dadurch zum Beispiel Rückschlüsse auf die Herkunft eines immigrierten Hirsches ziehen (Boßler, 1994).

### 2.1.2 Rotwildgebiete

Das Rotwild gehört von Beginn an zu den gejagten Tieren. Höhlenmalereien in der „Cueva de la Vieja“ bei Alpera in Spanien zeigen solche Jagdszenen auf geweihtragende Tiere (Abb.1). Diese Malereien sind auf 10.000 bis 6.000 v. Chr. datiert (Reichholf, 2006). Im Altertum wurde der Hirsch eher als scheues, feiges und ängstliches Tier wahrgenommen. Bei Homer wirft Achilleus dem Agamemnon vor „er habe das Herz eines Hirschen“. Dies ist mit dem heutigen Vergleich eines Hasenherzens beziehungsweise eines Angsthasen gleichzusetzen (Herzog, 2006).



Abb.1: Jagdszenen aus der Cueva de la Alpera

Die jagdliche und emotionale Stellung zum Rotwild bildete sich im Mittelalter. Um 700 n. Chr. entstand die Hubertuslegende. Hubertus von Lüttich erschien auf der Jagd ein kapitaler weißer Hirsch mit einem leuchtenden Kreuz zwischen den Geweihstangen, der zu ihm mit Gottes Stimme sprach.

Weißlinge oder Albinos unter den Tieren galten als friedfertig und besonders rein. Diese Mystifizierung schlug sich auch in der Kunst wider. Hirsche sind hier oft friedfertig und zahm dargestellt. Zum Beispiel malte Moritz v. Schwind 1846 in seinem Bild „Nixen einen Hirsch tränkend“ einen weißen Damhirschen (Abb. 2).

Im Mittelalter entwickelte sich die Hirschjagd zu einem Privileg der Oberschicht, bestehend aus Adel und hoher Geistlichkeit. Zu dieser Zeit wurden auch Hirschgärten angelegt. Diese dienten zur Versorgung der Höfe mit frischem Wildbret. So wurde auch in Hessen im Jahre

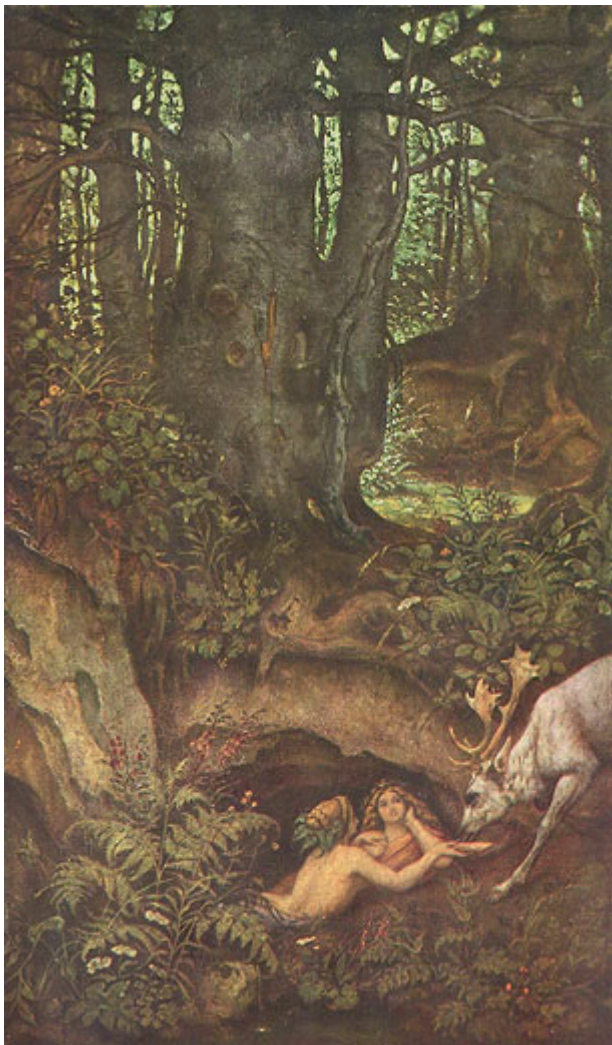


Abb. 2

Nixen einen Hirsch tränkend

Moritz von Schwind, 1846

Quelle: [www.malerei-meisterwerke.de](http://www.malerei-meisterwerke.de)

(Stand 01.12.2012)

1590 der Tierpark Weilburg von dem Grafen Albrecht II. von Nassau-Weilburg und Saarbrücken-Ottweiler gegründet. Die Bewirtschaftung des Tierparks wurde den umliegenden Ortschaften aufgebürdet (Hessen-Forst, 2007).

Das Rotwild war in der Bevölkerung unbeliebt. Bei Jagden musste die Bevölkerung Frondienste tun. Die Bauern mussten Rotwild auf ihren Feldern nicht nur dulden, sie durften es auch nicht hetzen oder vertreiben. Rotwild war Nahrungskonkurrenz für das Vieh. Für die Waldbesitzer war es ein Baumschädling (Rösener, 2004).

Der Unmut wuchs ständig, so dass es schon im 18. Jahrhundert Überlegungen zu Rotwildgebieten und rotwildfreien Gebieten gab. Eine Wende gab es im 19. Jahrhundert. Durch die Französische Revolution und die bürgerliche Revolution von 1848 in Deutschland bedingt, wurde das Jagdrecht an das Eigentum von Grund und Boden gebunden. Dies führte dazu, dass das Rotwild von den bäuerlichen Grundeigentümern stark dezimiert wurde. In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts bedurfte es des Schutzes des Rotwildes, um es vor der Ausrottung zu bewahren (Herzog, 2006). Das Reichsjagdgesetz von 1934 und das darauf aufbauende Bundesjagdgesetz sind die aus dieser Situation entstandenen gesetzlichen Regelungen. Hier wird der Bedeutung der Land- und Forstwirtschaft, dem Naturschutz, der Landschaftspflege und dem Schutz des Wildes Rechnung getragen.

Paragraph 21 des Bundesjagdgesetzes (BJagdG in der Fassung vom 06.12.2011) beschreibt die Abschussregelung des Rotwildes:

„(1) Der Abschuss des Wildes ist so zu regeln, dass die berechtigten Ansprüche der Land-, Forst- und Fischereiwirtschaft auf Schutz gegen Wildschäden voll gewahrt bleiben sowie die Belange von Naturschutz und Landschaftspflege berücksichtigt werden. Innerhalb der hierdurch gebotenen Grenzen soll die Abschussregelung dazu beitragen, dass ein gesunder Wildbestand aller heimischen Tierarten in angemessener Zahl erhalten bleibt und insbesondere der Schutz von Tierarten gesichert ist, deren Bestand bedroht erscheint.

(2) Schalenwild (mit Ausnahme von Schwarzwild) sowie Auer-, Birk- und Rackelwild dürfen nur auf Grund und im Rahmen eines Abschussplanes erlegt werden, der von der zuständigen Behörde im Einvernehmen mit dem Jagdbeirat (§ 37) zu bestätigen oder festzusetzen ist...

... In gemeinschaftlichen Jagdbezirken ist der Abschussplan vom Jagdausübungsberechtigten im Einvernehmen mit dem Jagdvorstand aufzustellen. Innerhalb von Hegegemeinschaften sind die Abschusspläne im Einvernehmen mit den Jagdvorständen der Jagdgenossenschaften und den Inhabern der Eigenjagdbezirke aufzustellen, die der Hegegemeinschaft angehören. Das Nähere bestimmt die Landesgesetzgebung. Der Abschussplan für Schalenwild muss erfüllt werden. Die Länder treffen Bestimmungen, nach denen die Erfüllung des

Abschussplanes durch ein Abschussmeldeverfahren überwacht und erzwungen werden kann; sie können den körperlichen Nachweis der Erfüllung des Abschussplanes verlangen.“

Das für Hessen geltende Hessische Jagdgesetz (HJagdG in der Fassung vom 10.06.2011) regelt im Paragraph 26 b (4):

„Außerhalb abgegrenzter Rot-, Dam- und Muffelwildgebiete ist der Abschuss dieser Arten so zu regeln, dass die Ausbreitung der jeweiligen Wildart über die abgegrenzten Gebiete hinaus verhindert wird.“

Hessen ist in Rotwildgebiete und rotwildfreie Gebiete unterteilt (Tab. 1 und Abb. 3). Es kommt somit zu einer gesetzlich bestimmten Verinselung von Rotwildpopulationen.

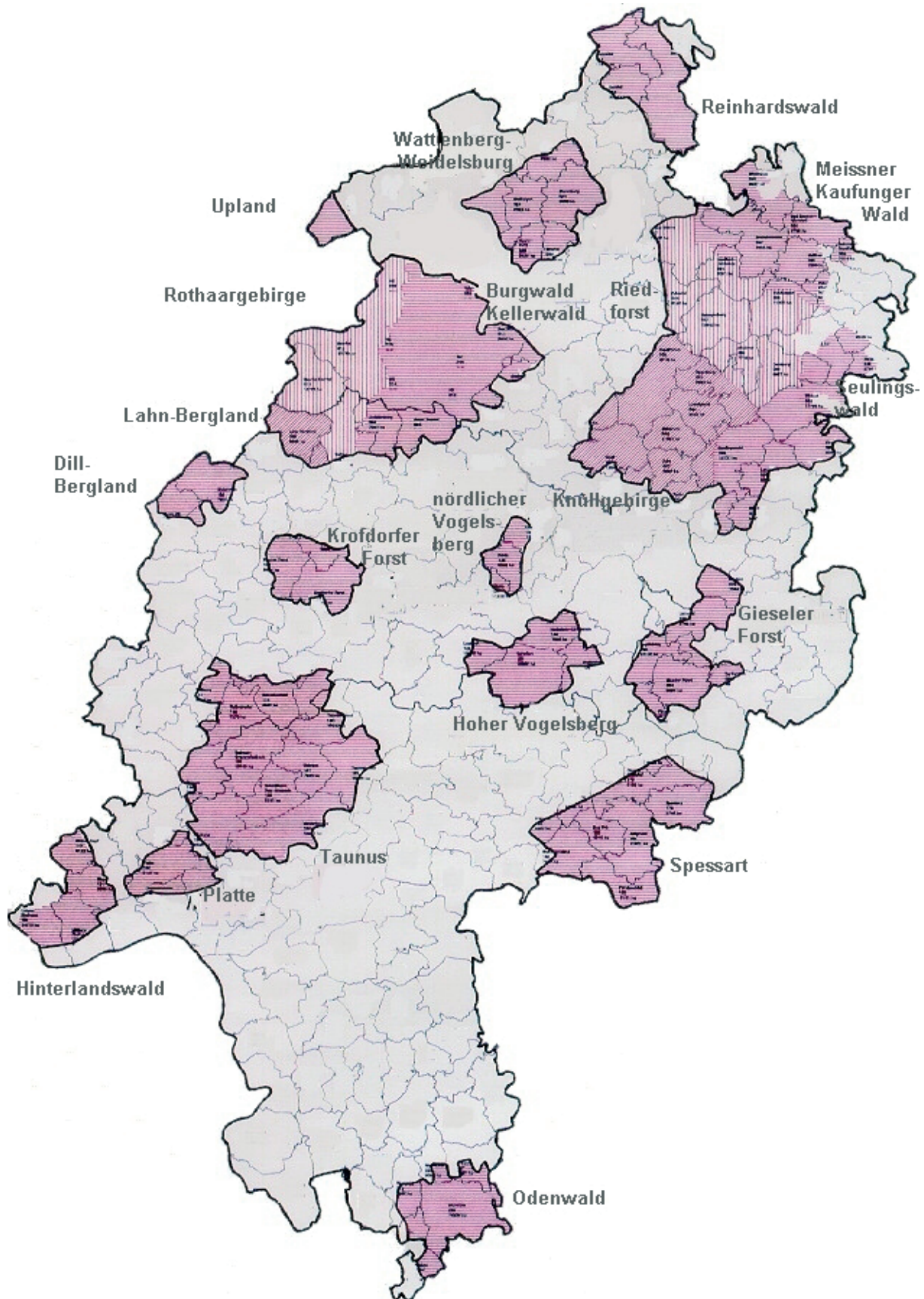
**Tab. 1: Die hessischen Rotwildgebiete**

Reinhardswald	17.450 ha
Upland	1.696 ha
Wattenberg-Weidelsburg	22.843 ha
Kaufunger Wald / Meißner	43.800 ha
Riedforst	57.276 ha
Knüll	54.720 ha
Seulingswald	43.986 ha
Rothaargebirge	39.362 ha
Burgwald-Kellerwald	55.265 ha
Nördlicher Vogelsberg	14.586 ha
Hoher Vogelsberg	22.856 ha
Gieseler Forst	29.615 ha
Lahn-Bergland	17.600 ha
Dill-Bergland	10.505 ha
<b>Krofdorfer Forst</b>	<b>16.189 ha</b>
Taunus	94.000 ha
Platte	13.409 ha
Hinterlandswald	25.406 ha
Spessart	48.000 ha

Quelle: Landesjagdverband Hessen, Stand Juni 2010 ([www.ljv-hessen.de](http://www.ljv-hessen.de))



Abb. 3: Die Hessischen Rotwildgebiete



Quelle: Landesjagdverband Hessen, Stand Juni 2010 ([www.ljv-hessen.de](http://www.ljv-hessen.de))

## 2.2 Populationsgenetik

Ende des 20. Jahrhunderts wurden genetische Untersuchungen am Rotwild oft auf der Basis von Protein- und Enzymmustern durchgeführt. Zum Beispiel beschäftigte sich Mushövel (1986) in ihrer Dissertation mit Serumtransferrinen beim Rotwild. Herzog (1988) untersuchte Polymorphismen bei der Erythrozyt-6-Phosphogluconatdehydrogenase und bei der Erythrozyt-Superoxiddismutase (Herzog, 1990). Insgesamt 467 Tiere aus zwölf deutschen Populationen wurden auf ihren Transferrinpolymorphismus und genetische Differenzierung hin untersucht (Herzog et al., 1991). Bei dieser Anzahl an untersuchten Tieren wurden drei Allele des Transferrins gefunden. In einer Arbeit von Ströhlein et al. (1995) wurde die Veränderung der Isoenzymgenetik im Zusammenhang mit der Öffnung der innerdeutschen Mauer untersucht. Von 26 untersuchten Genloci waren zwei Loci polymorph. Jeweils zwei Allele wurden an den Exprimierungsloci der Mannosephosphatisomerase und der Superoxiddismutase entdeckt.

Um die Jahrtausendwende erschienen viele Veröffentlichungen, die Mikrosatelliten als Basis ihrer Untersuchungen hatten. Diese sind polymorpher als Genloci von Enzymen.

### 2.2.1 Mikrosatelliten

Mikrosatelliten sind kurze DNA- Sequenzen mit sich wiederholenden Basenabfolgen. Nach Anzahl der beteiligten Basen unterscheidet man Mono-, Di-, Tri- und Tetranukleotidwiederholungen. Am häufigsten treten Dinukleotidwiederholungen auf. Man bezeichnet sie auch als „short tandem repeats“ (STRs) oder „variable number of tandem repeats“ (VNTRs). Diese können in reiner („pure“) Form (z.B.  $(GT)_n$ ), unterbrochen („interrupted“) (z.B.  $(GT)_n X (GT)_m$ ) oder vermischt („compound“) (z.B.  $(GT)_n (TA)_m (GT)_s$ ) vorliegen. Mikrosatelliten treten am häufigsten in nicht kodierenden Bereichen des Genoms auf und werden kodominant vererbt (Litt und Luty, 1989).

Punktmutationen im Genom treten mit einer Rate von  $10^{-9}$  bis  $10^{-10}$  / Locus / Generation auf. Die Mutationsrate von Mikrosatelliten ist wesentlich höher. *In vivo* werden folgende Raten geschätzt: *E. coli*  $10^{-2}$ , Hefen  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$ , Maus  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$  und *Drosophila*  $6 \times 10^{-6}$  Mutationen / Locus / Generation (Hancock, 1999).

Es werden zwei Hauptmodelle beschrieben, die diese hohen Raten erklären. „DNA-Slippage“ als erstes Modell geht von einer Fehlpaarung eines verrutschten Stranges während der

Replikation aus. Trennt sich der wachsende DNA-Strang vom Templatestrang, so kann sich dieser verschoben wieder anlagern. Bei diesem Modell besteht die Mutation aus einer veränderten Anzahl der Wiederholungen des Mikrosatelliten (Levinson und Gutman, 1987). Das zweite Modell geht von Fehlern in der Rekombination aus. Durch ungleiches „Crossing-over“ zwischen zwei falsch zueinander angelagerten Chromosomensträngen kommt es zur Insertion in einem, und zur Deletion im anderen Strang. Dies kann zu unterschiedlichsten Mutationen verschiedenster Länge führen (Harding et al., 1992). Schlötterer und Tautz (1992) haben nachgewiesen, dass die DNA-Slippage in einer sehr hohen Rate auftritt.

Der hohe Polymorphiegrad, die kodominante Vererbung und die Verteilung über das ganze Genom machen Mikrosatelliten zu häufig verwendeten molekulargenetischen Markern. Sie werden in der Populationsgenetik, bei Diversitätsstudien, Abstammungskontrollen, aber auch zum Beispiel zur Identifizierung von QTLs (quantitative trait loci) und zur Erstellung genetischer Karten angewandt.

Nachteile bei der Verwendung von Mikrosatelliten sind das Auftreten von Stotterbanden, von Plus-A-Veränderungen und von Nullallelen. Sowohl Stotterbanden als auch Plus-A-Veränderungen sind durch die bei der Amplifikation verwendeten DNA-Polymerasen bedingt. Durch ungleiches Anhängen von unspezifischen Adenin-Nukleotiden am 3'-Ende der Amplifikationsprodukte kann es zu Fehltypisierungen kommen. Nullallele entstehen meist durch Mutation in der Primerregion. Die Primer können nicht binden, und es kommt zu einer verminderten oder gar keiner Amplifikation. Dies kann eine höhere Homozygotierate vortäuschen (Schlötterer, 2004).

### **2.2.2 Kennzahlen der Populationsgenetik**

Zur Berechnung der populationsgenetischen Kennzahlen werden verschiedene frei zugängliche Programme verwendet, zum Beispiel Genepop<sup>©</sup>, Arlequin<sup>©</sup> oder GenAlEx<sup>©</sup>. Im Nachfolgenden werden die wichtigsten Kennzahlen beschrieben (Peakall und Smouse, 2006):



Allelfrequenz (*allele frequency for codominant data*):

$$FreqAllele_x = \frac{2N_{xx} + N_{xy}}{2N}$$

FreqAllele\_x = Frequenz des Allels x

N<sub>xx</sub> = Anzahl der Homozygoten für das Allel x (xx)

N<sub>xy</sub> = Anzahl der Heterozygoten mit dem Allel x (y ist ein beliebiges anderes Allel)

N = Anzahl der Proben

Beobachtete Heterozygotie H<sub>o</sub> (*observed heterozygosity*):

$$H_o = \frac{\text{No. of Het.}}{N}$$

H<sub>o</sub> = beobachtete Heterozygotie

No. of Het. = Anzahl der heterozygoten Allelloci

N = Anzahl der Proben

Erwartete Heterozygotie H<sub>e</sub> (*expected heterozygosity*):

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

H<sub>e</sub> = erwartete Heterozygotie

p<sub>i</sub> = Allelfrequenz des i-ten Allels

Unter der Annahme der zufälligen Paarung beschreibt H<sub>e</sub> die erwartete Frequenz an heterozygoten Allelloci.

F-Wert (*fixation index*):

$$F = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

F = F-Wert oder Fixationsindex

$H_e$  = erwartete Heterozygotie

$H_o$  = beobachtete Heterozygotie

Der Fixationsindex F oder F-Wert, kann Werte von -1 bis +1 annehmen. Er beschreibt das Maß der Zu- oder Abnahme der Heterozygotie. Positive Werte deuten auf Inzucht oder eine scheinbare hohe Homozygotie durch Nullallele hin. Werte um Null beschreiben den Zustand der zufälligen Paarung nicht verwandter Tiere. Negative Werte zeigen ein Übermaß an Heterozygoten an, bedingt durch zum Beispiel Selektion auf Heterozygotie oder durch Migration.

Effektive Allelzahl  $N_e$ :

$$N_e = \frac{1}{\sum p_i^2}$$

$N_e$  = Anzahl effektiver Allele

$p_i$  = Frequenz des i-ten Allels

Hardy-Weinberg-Gleichgewicht HWE (Hardy-Weinberg-Equilibrium):

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht stellt einen theoretischen, modellhaften Idealzustand dar. Bedingungen für das Vorliegen dieses Gleichgewichtes sind eine unendlich große Population mit Panmixie, ohne Migration, Mutationen und ohne genetische Drift. Diese Voraussetzungen existieren in der Realität nicht. Trotz dieses modellhaften Charakters findet es Anwendung in der populationsgenetischen Berechnung. Bei großen Populationen sind die Fehler zu

vernachlässigen, Berechnungen sind vergleichbar. Ob die zu untersuchende Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vorliegt wird mit dem Chi-Quadrat-Test abgeschätzt.

Bei der Anwendung von mehr als einem Mikrosatellit kommt es zu multiplen abhängigen Vergleichen. Um dies zu berücksichtigen, wird die berechnete Signifikanz nach Bonferroni korrigiert (Rice, 1989).

Weicht eine Population vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab, kommen mehrere Ursachen in Betracht. Es kann eine physikalische Kopplung der Allele vorliegen, genetische Drift liegt vor, es findet Migration statt oder es kann ein Artefakt für das Vorliegen von Subpopulationen sein (Otha, 1982).

In dieser Arbeit wurde nur eine Population untersucht. In der Populationsgenetik gibt es noch weitere Kennzahlen. Diese betreffen aber die Beziehung zwischen verschiedenen Populationen und Subpopulationen. Sie finden in dieser Arbeit keine Anwendung und werden deshalb nicht beschrieben.

### **2.2.3 Inzuchtdepression**

Kommt es aufgrund von Paarung eng verwandter Tiere zu einem Fitnessverlust, so spricht man von Inzuchtdepression. Mit dem Begriff Fitness werden meist Kennzahlen der Reproduktion zusammengefasst. Bei einer Untersuchung am Göttinger Miniaturschwein wurden die Parameter Anzahl lebend und tot geborener Ferkel, das durchschnittliche und individuelle Geburtsgewicht und die Gewichtsentwicklung in den ersten sechs Lebensmonaten untersucht (Brandt und Möllers, 1999). In einer Untersuchung zur Inzucht bei Tauernscheckenziegen wurden die Merkmale Exterieur, Langlebigkeit, Fruchtbarkeit, Lebensfähigkeit der Kitze und das 30-Tage-Gewicht von Kitzen zur Beurteilung der Inzuchtdepression angewandt (Wokac, 2003). Auch bei Hirschen wurde eine Untersuchung zur Inzuchtdepression durchgeführt (Walling et al., 2011). Das Pedigree der Hirsche auf der Isle of Rum in Schottland ist erforscht. Die Inzuchtkoeffizienten der Muttertiere und der Kälber waren somit bekannt. Untersucht wurden hier das Geburtsdatum, das Geburtsgewicht und die Überlebensrate nach einem Jahr.

In einer Wildpopulation mit unbekanntem Pedigree kann man solche Parameter nicht ermitteln. Eine Aussage über den Grad der Inzucht kann über den Verlust von Allelen und eine gesteigerte Homozygotie beziehungsweise eine verminderte Heterozygotie geschätzt werden. Kommt es zu einem Verlust von Allelen und zu einer erhöhten Homozygotie, so ist

die Wahrscheinlichkeit größer, dass rezessive Gene, die zum Beispiel zu einer schlechteren Spermienreifung führen, reinerbig vorliegen. Eine geringe Allelzahl und eine hohe Homozygotierate erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer schlechten Fitness.

### 2.3 Kennzahlen anderer Populationen

Nicht nur in Hessen sind Rotwildgebiete per Gesetz ausgewiesen. Im Bayerischen Jagdgesetz (BayJG in der Fassung vom 20.12.2007) werden Hegegebiete für Rotwild erwähnt. Diese Rotwildgebiete werden in der Verordnung zur Ausführung des Bayerischen Jagdgesetzes (AVBayJG in der Fassung vom 03.07.2008) detailliert beschrieben.

Kuehn und Mitarbeiter (2003) untersuchten 395 Hirsche verschiedenen Geschlechts und Alters. Diese stammten aus elf Rotwildgebieten. Davon lagen acht Gebiete in Bayern, zwei (Rhön und Thüringer Wald) im nördlich angrenzenden Thüringen und ein Gebiet (Böhmerwald) östlich an den Nationalpark Bayerischer Wald angrenzend in der Tschechischen Republik.

Untersucht wurde Herzgewebe von Tieren, die in den Jahren 1994 bis 1997 erlegt wurden. Die Autoren verwendeten 19 Mikrosatelliten. Bei diesen Mikrosatelliten wurden zwischen drei (ETH3 und CSSM14) und 17 Allele (Haut14) detektiert. Im Mittel waren es  $9,5 \pm 4,5$  Allele. Die erwartete Heterozygotie  $H_e$  schwankte zwischen 0,209 (ETH3) und 0,888 (ILSTS06) mit einem Mittelwert von  $0,680 \pm 0,216$ . Bei den Populationen fand man bei der erwarteten Heterozygotie  $H_e$  Werte von 0,527 (Isarau) bis 0,666 (Thüringer Wald). Die Werte der beobachteten Heterozygotie  $H_o$  erstreckten sich von 0,497 (Isarau) bis 0,610 (Nationalpark Bayerischer Wald).

Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die Rotwildpopulationen in einem stabilen genetischen Zustand sind. Die Gebiete Hassberge und Isarau zeigten die geringste Variabilität. Die Autoren beschreiben, dass diese Gebiete durch wenige Tiere in der Mitte des 19. Jahrhunderts gegründet wurden. Die Lage dieser Gebiete scheint auch keine Immigration zuzulassen. Dagegen scheint es im Nationalpark Bayerischer Wald Immigration zu geben. Hier war die berechnete effektive Populationsgröße signifikant größer als die reale Populationsgröße. In allen anderen untersuchten Gebieten lag die berechnete effektive Populationsgröße nahe der realen Populationsgröße.

Mit Jagdforschungsmitteln des Landes Niedersachsen wurde ein genetisches Monitoring in drei Rotwildgebieten in Niedersachsen durchgeführt. Eine Fragestellung dieser Untersuchung war der Einfluss der landschaftlichen Zerschneidung durch Autobahnen auf die genetische Struktur beim Rothirsch. Das nördliche Rotwildgebiet Lüneburger Heide ist durch die BAB 2 von den südlichen Gebieten Solling und Harz getrennt. Die beiden südlichen Gebiete werden wiederum durch die BAB 7 getrennt. Zudem war das Gebiet Solling bis in das Jahr 2001 jahrzehntelang durch ein Umfanggatter von den beiden anderen Gebieten getrennt.

In den Jahren 2005 bis 2007 wurden von insgesamt 263 erlegten Tieren unterschiedlichen Alters und Geschlechts Proben entnommen. Hierbei handelte es sich um Nieren-, Leber- und Herzmuskelgewebe. Als genetische Marker wurden fünf Mikrosatelliten verwendet.

Es wurden zwischen drei (RME25) und 14 Allele (Haut14) gefunden. Die Werte der beobachteten Heterozygotie  $H_o$  reichten von 0,482 (Solling) bis 0,598 (Lüneburger Heide), die Werte der erwarteten Heterozygotie  $H_e$  von 0,563 (Solling) bis 0,671 (Lüneburger Heide). Das Gebiet Lüneburger Heide wies die größte genetische Diversität auf, das Gebiet Solling die kleinste.

Nach Meinung der Autoren (Kinser und Herzog, 2008) liegen die ermittelten Werte auf vergleichbarem Niveau mit anderen Untersuchungen. Das Gebiet Solling zeige nicht nur aufgrund des geringeren Stichprobenumfangs, sondern auch durch die jahrelange Isolation die kleinste Diversität auf. Anzeichen für eine Inzuchtdepression sahen die Autoren jedoch nicht. Dass das Gebiet Lüneburger Heide eine höhere Diversität aufwies als das Gebiet Harz, erklärten sich die Autoren aufgrund der Lage der Lebensräume. Das Gebiet Lüneburger Heide hat Anschluss an die rotwildreichen Gebiete in den östlichen Bundesländern. Das Gebiet Harz hingegen liegt isoliert. Es ist durch besiedelte und landwirtschaftlich stark genutzte Flächen umgeben. Diese seien rotwildunfreundlich und verhinderten Migration in sowie aus diesem Rotwildgebiet.

Eine weitere Arbeitsgruppe um Kuehn (Kuehn et al., 2004) untersuchte Rotwild der östlichen Schweiz. In der zweiten Hälfte des 17. Jahrhunderts war das Rotwild wegen Überjagung in der östlichen Schweiz fast ausgerottet. Ziel der Untersuchung war es, anhand von genetischen Analysen den Weg der Wiederbesiedlung nachzuzeichnen. Untersucht wurden acht Rotwildgebiete, fünf in der östlichen Schweiz, eins in Liechtenstein, eins in Italien und eins in Österreich. Die Ergebnisse einer Untersuchung des Gebietes Ammergebirge in Deutschland aus einer früheren Studie von Kuehn (Kuehn et al., 2003, siehe oben) wurden ebenfalls in die Auswertungen einbezogen.

Von 207 Hirschen verschiedenen Alters und Geschlechts wurden in den Jahren 1997 und 1998 Proben genommen. Auch hier gelangte Herzgewebe zur Untersuchung. Verwendet wurden 18 Mikrosatelliten.

Es wurden 2 (ETH3) bis 19 (CSSM19) Allele gefunden. Über alle 18 Mikrosatelliten erstreckte sich die erwartete Heterozygotie  $H_e$  zwischen 0,638 und 0,689, die beobachtete Heterozygotie  $H_o$  zwischen 0,506 und 0,599.

Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Rotwildpopulationen der östlichen Schweiz eine engere Beziehung untereinander und zu den Populationen aus Liechtenstein und Österreich haben. Zu den Populationen aus Italien (Südtirol) und Deutschland (Ammergebirge) gibt es nur geringe Beziehungen. Die genetische Variabilität ist generell hoch, so dass die Autoren dies als einen guten genetischen Zustand des Rotwildes der östlichen Schweiz bewerteten.

Eine Studie aus Schleswig Holstein von Zachos et al. (2007) beschreibt Inzuchteffekte. Um 1870 immigrierten Hirsche aus Segeberg nach Hasselbusch. Dieses Rotwildgebiet ist mittlerweile, zum Beispiel durch Autobahnen, von anderen Rotwildgebieten abgeschnitten. Nach mündlichen Mitteilungen der dortigen Jägerschaft beschreiben die Autoren einen zuletzt immigrierten Rothirsch im Jahr 1987. Seitdem sei kein neuer eingewanderter Rothirsch mehr gesichtet worden. Die Populationsgröße umfasse etwa 50 Tiere. Das Geschlechterverhältnis sei ausgewogen. Nach Aussagen der dortigen Jägerschaft seien circa 70 % der Tiere adult und geschlechtsreif. Alle weiblichen, aber nur 10 % der männlichen Tiere würden an der Reproduktion teilnehmen. Somit paaren sich 18 weibliche ( $N_f$ ) und 2 männliche ( $N_m$ ) Tiere. Die effektive Populationsgröße  $N_e$  kann mit folgender Formel geschätzt werden:

$$N_e = (4 * N_m * N_f) / (N_m + N_f) \text{ Tiere; } N_e = (4 * 2 * 18) / (2 + 18) \text{ Tiere; } N_e = 7,2 \text{ Tiere.}$$

Die Autoren untersuchten 18 Tiere aus Hasselbusch und 27 Tiere aus Segeberg. Von den erlegten Tieren wurde aus Lebergewebe DNA isoliert. Für die Genotypisierung wurden neun Mikrosatelliten verwendet.

In Hasselbusch ergab sich eine erwartete Heterozygotie  $H_e$  von 0,66 und eine beobachtete Heterozygotie  $H_o$  von 0,58. In Segeberg betrugen die Werte  $H_e = 0,75$  und  $H_o = 0,49$ . Eine Auswertung der einzelnen Mikrosatelliten ergab für den Mikrosatelliten RT1 folgende Werte: In Hasselbusch betrug die erwartete Heterozygotie  $H_e = 0,58$  und die beobachtete Heterozygotie  $H_o = 0,50$  bei 4,0 unterschiedlichen Allelen (allelic richness); in Segeberg waren die Werte  $H_e = 0,59$  und  $H_o = 0,59$  bei 4,33 Allelen.

Es wird berichtet, dass in den letzten Jahren ein Kalb ohne Augen und sieben Tiere mit Brachygnathie (Abb. 4) geboren wurden. Die Autoren postulierten die Verkürzung des

Unterkiefers als eine Auswirkung der Inzucht. Diese Auswirkung wurde ebenfalls bei anderen Tierarten beobachtet und beschrieben (Hartl et al., 1991; Renecker und Blake, 1993).



Abb. 4: Brachygnathia inferior eines zweijährigen Hirsches aus dem Gebiet Hasselbusch. Der Unterbiss beträgt circa 5 cm. Fotograf: H. A. Hewicker (Zachos et al., 2007).

Im Jahr 2003 wurde eine Untersuchung von Zachos und Mitarbeitern veröffentlicht, die sich mit dem phylogeographischen Ursprung der Unterart *Cervus elaphus corsicanus* auf Korsika und Sardinien befasste. Taxonomisch wird *C. e. corsicanus* den Unterarten *C. e. barbarus* aus Nordafrika und *C. e. hispanicus* aus Spanien zugeordnet. Um diese Beziehung zu untersuchen, verwendeten die Autoren Proben aus fünf Populationen: L. Navas (südliches Spanien), Val die Susa (nordwestliches Italien), Tarvis (nordöstliches Italien nahe der österreichischen Grenze), Haskovo (Bulgarien) und Campione (Sardinien).

Untersucht wurden Blutproben aus der spanischen Population und Gewebeproben (Leber, Niere oder Herz) aus den anderen Populationen. Aus diesen Proben wurde die mtDNA analysiert und sieben Mikrosatelliten kamen zur Anwendung. Zusätzlich wurden eine einzelne Hautprobe von einem Tier aus dem Kaukasus und zwei Geweihproben, eine von einem Tier aus Turkestan und eine von einem Tier aus Tunesien, mit den Mikrosatelliten

untersucht. Die Populationen der untersuchten Tiere stammten aus fünf verschiedenen Unterarten und deren Kreuzungen: *Cervus elaphus barbarus*, *C. e. corsicanus*, *C. e. hispanicus*, *C. e. maral* und *C. e. hippelaphus*.

Bei den Mikrosatelliten wurden für die erwartete Heterozygotie  $H_e$  Werte zwischen 0,68 und 0,83, und für die beobachtete Heterozygotie  $H_o$  Werte zwischen 0,52 und 0,80 berechnet (differenziert nach Mikrosatelliten). Es wurden 9 bis 24 verschiedene Allele gefunden.

In der Diskussion der Untersuchung beschreiben die Autoren, dass aufgrund der Ergebnisse eine eindeutige Herkunft der korsischen Hirsche nicht bestimmt werden konnte. Dies könnte der geringen Probenanzahl geschuldet sein. Außerdem gab es widersprüchliche Ergebnisse zwischen Mikrosatellitenanalyse und Analyse der mtDNA. Die mitochondriale Kontrollregion legte eine sehr enge Verwandtschaft zu den spanischen Hirschen (*C. e. hispanicus*) nahe. Dem widersprach aber das Ergebnis der Mikrosatellitenanalyse, die zwischen den spanischen und korsischen Hirschen die größte genetische Distanz der untersuchten Populationen aufwies. Die geringste genetische Distanz der korsischen Hirsche bestand zu den Hirschen aus dem im nordöstlichen Italien gelegenen Tarvis (*C. e. hippelaphus*). Die Vermutungen, dass die korsischen Hirsche von Hirschen aus Spanien oder von Hirschen aus Italien abstammen, konnten weder bestätigt noch widerlegt werden. Auszuschließen sei aber eine Verwandtschaft der korsischen Hirsche mit Tieren aus Nordafrika (*C. e. barbarus*). Die Autoren konnten zeigen, dass es sich bei den Hirschen auf Korsika und Sardinien um eine eigene Unterart handelt. Dies begründeten sie mit der hohen Anzahl an privaten Allelen, also Allelen, die nur in den Proben aus Campione auf Sardinien gefunden wurden.

Einen ähnlichen Untersuchungsansatz verfolgten Feulner et al. (2004) mit der Unterart *Cervus elaphus montanus*. An diese in den Karpaten vorkommende Unterart schließen sich westlich die Unterart *C. e. hippelaphus* und östlich die Unterart *C. e. maral* an. Mit Hilfe der mtDNA und neun Mikrosatelliten sollte untersucht werden, ob man diese Unterarten genetisch differenzieren kann. Ebenfalls sollte untersucht werden, ob beziehungsweise wie weit eine Vermischung der Unterarten nachgewiesen werden kann.

Aus zehn Gebieten, zwei aus Serbien und acht aus Rumänien, wurden in den Jahren 2000 bis 2002 insgesamt 120 Muskelproben von erlegten Hirschen gewonnen. Bei einem Gebiet in Rumänien handelte es sich um eine Gehegehaltung.

Die durchschnittliche Allelanzahl pro Population reichte von 5,4 bis 12,8 Allele. Die Werte für die erwartete Heterozygotie  $H_e$  und die beobachtete Heterozygotie  $H_o$  reichten von  $H_e = 0,79$  bis  $0,90$  und von  $H_o = 0,47$  bis  $0,62$ . Die Hirsche aus der Gehegehaltung hatten mit



durchschnittlich 5,4 Allelen die geringste Anzahl an Allelen. Die Heterozygotiewerte betrugen  $H_e = 0,79$  und  $H_o = 0,61$ . Die vier östlichen Populationen Rumäniens waren von den Haplotypen und den privaten Allelen sehr ähnlich und konnten von den anderen Populationen deutlich abgegrenzt werden.

Die Autoren (Feulner et al., 2004) kommen zu dem Schluss, dass diese vier Populationen der Unterart *Cervus elaphus montanus* entsprechen. Aufgrund des Allelreichtums bescheinigen die Autoren diesen Hirschen eine gute genetische Gesundheit. Leider finden sich in der Veröffentlichung keine Angaben über die Populationsgrößen. Zwei Populationen sind Mischpopulationen aus den östlichen und westlichen Haplotypen. Bei der Population aus Arad war das zu erwarten, da hier Mitte des 20. Jahrhunderts Hirsche aus den Karpaten eingekreuzt wurden. Die westlichen Populationen, so schreiben die Autoren, zeigen Einfluss vom europäischen Typ und sind genetisch nicht so deutlich abzugrenzen.

Mit den korsischen Hirschen befassten sich ebenfalls Hmwe et al. (2006b). Aufbauend auf der Arbeit von Zachos et al. (2003, siehe oben) zum phylogeographischen Ursprung der korsischen Hirsche untersuchte Hmwe Hirsche aus Mesola im Podelta im östlichen Italien. Mesola ist ein Resort, in dem sich nach dem zweiten Weltkrieg nur noch zehn Tiere befanden. Eine Immigration sei unwahrscheinlich, da das Resort von anderen Populationen isoliert sei. Zur Untersuchung gelangten Blutproben von 28 Tieren aus Mesola und 29 Tieren aus Sardinien. Mitochondriale DNA und 12 Mikrosatelliten wurden für die Untersuchung eingesetzt.

Die Werte für die erwartete Heterozygotie  $H_e$  und die beobachtete Heterozygotie  $H_o$  betrugen für Sardinien  $H_e = 0,66$  und  $H_o = 0,48$  bei durchschnittlich 6,4 Allelen. Die Werte für Mesola betrugen  $H_e = 0,62$  und  $H_o = 0,51$  bei durchschnittlich 7,0 Allelen. Während die Hirsche auf Sardinien acht Haplotypen aufwiesen, wurde bei den Hirschen aus Mesola nur ein Haplotyp gefunden. Vergleichende Analysen mit neun Mikrosatelliten zeigten eine Verwandtschaft zwischen den Hirschen aus Mesola und Sardinien.

Wie bereits Zachos et al. (2003) kommen auch Hmwe et al. (2006b) zum Schluss, dass der phylogeographische Ursprung der Hirsche auf Korsika und Sardinien nicht einwandfrei zu erklären ist. Eine Verwandtschaft auf Basis von Mikrosatellitenuntersuchungen sei zu Hirschen aus Italien zu vermuten, nicht aber auf Basis der mtDNA-Untersuchungen. Hier zeigten die sardischen Hirsche eine Verwandtschaft zu Hirschen aus Spanien. Die Ergebnisse der Mikrosatellitenuntersuchungen zeigten aber eine große genetische Distanz zwischen diesen beiden Populationen.

Die Unterart *Cervus elaphus corsicanus* ist ebenfalls Gegenstand der Untersuchung von Hajji et al. (2008). Diese Studie baut auf den bereits vorhandenen Untersuchungen zum phylogeographischen Ursprung der korsischen und sardischen Hirsche (Hmwe et al., 2006b; Zachos et al., 2003) auf. Der Unterschied zu den bereits vorhandenen Veröffentlichungen ist, dass Proben aus mehreren Gebieten neu analysiert wurden. Dazu wurden acht Mikrosatelliten verwendet, die sich von denen der anderen Untersuchung unterscheiden.

Die Autoren kommen zum Schluss, dass die Hirsche auf Korsika und Sardinien vom italienischen Festland abstammen und eine enge Verwandtschaft zu Hirschen aus Tunesien haben. Die Theorie einer Abstammung dieser Tiere von spanischen Hirschen verwerfen sie.

Eine Gruppe um Hajji (2007) untersuchte erstmals Hirsche aus Nordafrika. Hierbei handelte es sich um 30 Hirsche (*Cervus elaphus barbarus*) aus drei tunesischen Gebieten. Die Autoren berichten, dass sich die heutigen Populationen auf sieben Tiere zurückführen lassen. Die Besonderheit der tunesischen Hirsche besteht darin, dass sie seit 1963 durch die tunesische Regierung unter besonderen Schutz gestellt wurden und die Jagd verboten ist. Deshalb wurde die DNA der Hirsche hauptsächlich aus Haar- und Kotproben gewonnen. Neben mtDNA kamen 13 Mikrosatelliten zur Anwendung. Es wurden zwei unterschiedliche Haplotypen bestimmt. Dies legt nahe, dass sich die Populationen aus zwei nicht verwandten mütterlichen Linien aufbauen. Aufgrund des genetischen Flaschenhalses waren die Werte für die beobachtete Heterozygotie  $H_o$  mit 0,46 und die erwartete Heterozygotie  $H_e$  mit 0,78 sehr gering. Die Werte lagen aber höher, als die Autoren erwarteten.

Die Autoren geben eine gewisse Unschärfe ihrer Ergebnisse aufgrund der geringen Probenanzahl zu bedenken, vermuten aber auch einen genetischen Austausch mit algerischen Hirschen. Dies wäre eine Erklärung für die genetische Diversität, bedürfe aber weiterer Untersuchungen.

Die wohl am häufigsten studierten Hirsche sind die auf der schottischen Insel Isle of Rum. Es existieren über 140 Veröffentlichungen über diese Hirsche. Da das Pedigree dieser Tiere sehr umfassend erforscht ist, konnten zum Beispiel Aussagen über Inzuchteffekte bei Hirschkalbern, unterschieden nach Geburtsdatum, Geburtsgewicht und Überlebensrate nach einem Jahr, gemacht werden (Walling et al., 2011). Eine andere Untersuchung befasste sich mit dem Zusammenhang zwischen Geweihwachstum und Geweihgröße und dem Reproduktionserfolg im Folgejahr (Clements et al., 2010). Auch Umwelteinflüsse auf die

Hirsche waren Gegenstand einiger Untersuchungen. So untersuchte zum Beispiel Nussey et al. (2007) den Zusammenhang der Umweltbedingungen im juvenilen Alter auf den Alterungsprozess beziehungsweise die Fitness im Alter. Eine Arbeitsgruppe um Nussey (2006) befasste sich auch mit dem menschlichen Einfluss auf die genetische Struktur der Hirsche auf der Isle of Rum. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag aber auf der Kontrollregion der mtDNA. Es wurden zwar auch Mikrosatelliten angewandt, jedoch wurden keine detaillierten Ergebnisse über Heterozygotien veröffentlicht.

Hmwe et al. (2006a) untersuchten den Einfluss des Menschen auf die Rotwildpopulationen in England und Schottland. Es wurden insgesamt 69 Gewebeproben von Hirschen, die im Jahr 2004 erlegt wurden, untersucht. Es handelte sich hierbei um eine Population aus England und sechs Populationen aus Schottland. Zwei schottische Populationen sind Inselformationen (Islay und Arran). Die Autoren beschreiben, dass im 19. Jahrhundert bis Mitte des 20. Jahrhunderts viele Hirsche durch den Menschen umgesiedelt wurden, und es so zu einer regen Mischung aus verschiedenen Populationen kam.

Die isolierte DNA wurde mit Hilfe von elf Mikrosatelliten untersucht. Die mtDNA wurde ebenfalls untersucht. Insgesamt fanden die Autoren 156 verschiedene Allele, von denen 50 nur in jeweils einer einzigen Population bestimmt werden konnten (private Allele). Die Werte der erwarteten Heterozygotie  $H_e$  reichten von 0,76 bis 0,84, die der beobachteten Heterozygotie  $H_o$  von 0,39 (Islay) bis 0,50, bei einer Allelzahl (allelic richness) von 4,8 (Islay) bis 6,0 Allele.

Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass sich der Einfluss des Menschen auch im Genom widerspiegelt. Mitochondriale DNA sei weniger polymorph und ein gutes Mittel um längerfristige Einflüsse zu bestimmen. So wurde auf der Insel Islay nur ein Haplotyp gefunden. Dies decke sich mit der Historie dieser Population, die auf nur wenigen weiblichen Tieren basiert. Die Mikrosatelliten, stärker polymorph, spiegelten die kürzerfristigen Einflüsse wider. Hier lag die Population von Islay im Mittel aller getesteten Populationen. Die Autoren beschreiben ebenfalls, dass eine Auswertung aufgrund der geringen Probenanzahl je Population schwierig sei. Da maximal zehn Proben pro Population zur Untersuchung gelangten, sehen die Autoren in dieser Untersuchung hauptsächlich einen Anfang für weitere Studien, um effektive Aussagen zur Populationsgenetik oder zu Managementmaßnahmen treffen zu können.

Mc Devitt et al. (2009) untersuchten die genetische Struktur von Rotwild (*Cervus elaphus*), Sikawild (*Cervus nippon*) und deren Hybride in Irland. Der Mensch nahm viele Jahre, bis in das späte 20. Jahrhundert, Einfluss auf die Zusammensetzung der Wildpopulationen. Viele Tiere wurden umgesiedelt und vom europäischen Festland eingekreuzt.

85 Rothirsche aus sechs Regionen und 47 Sikahirsche aus drei Regionen wurden untersucht. Für die genetische Analyse wurden mtDNA und Mikrosatellitenmarker verwendet. In den Jahren 2007 und 2008 wurden den Untersuchungstieren Gewebeproben entnommen.

Die Untersuchung ergab, dass die Rothirsche in drei Cluster unterteilt werden konnten. Der südliche Cluster war isoliert von den anderen, die Werte der erwarteten ( $H_e$ ) und beobachteten ( $H_o$ ) Heterozygotie waren hier mit  $H_e = 0,55$  und  $H_o = 0,50$  bei 3,65 Allelen (allelic richness) am Kleinsten. Zwischen dem westlichen und östlichen Cluster wurde eine engere Verwandtschaft beschrieben. Der westliche Cluster bestand aus zwei Populationen, deren Werte  $H_e = 0,702$  und  $H_o = 0,598$  bei 3,99 Allelen und  $H_e = 0,846$  und  $H_o = 0,687$  bei 6,49 Allelen betrugen. Für den östlichen Cluster wurden Werte von  $H_e = 0,775$  und  $H_o = 0,633$  bei 4,79 Allelen ermittelt. Hybride zwischen Rothirsch und Sikahirsch sind in Irland existent. Es wurden mehrere Tiere phänotypisch als Hybride angesprochen. Auch genetisch wurden Hybride identifiziert.

Dänische Hirsche wurden bis in das 19. Jahrhundert durch Überjagung stark dezimiert. Eine Arbeitsgruppe um Nielsen (2008) untersuchte 394 Hirsche, erlegt in den Jagdsaisons 2001 bis 2004, auf ihre genetische Vielfalt. Eine weitere Intention dieser Untersuchung war die Frage nach einer möglichen Existenz einer dänischen Urpopulation.

Hierzu wurden 294 Muskel- und 55 Haarproben untersucht, die aus 14 verschiedenen Populationen stammten. Drei dieser Populationen entstammten Gehegen mit 250, 300 und 750 Tieren. Zusätzlich wurden aus einem Museum von sieben Hirschen Proben genommen. Diese Hirsche stammten aus den Jahren 1848 bis 1921. Die Autoren verwendeten elf Mikrosatelliten.

Bis zu drei Mikrosatelliten wichen signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab. Die Werte für die erwartete Heterozygotie  $H_e$  betrugen 0,37 bis 0,50 für die Gehegepopulationen und 0,43 bis 0,57 für die anderen Populationen. Die Werte für die beobachtete Heterozygotie  $H_o$  betrugen 0,32 bis 0,46, beziehungsweise 0,36 bis 0,57. Die genetische Diversität bei den Hirschen in Dänemark war im Vergleich geringer als bei untersuchten Hirschpopulationen aus Serbien, Rumänien, Spanien und Bayern.

Die Autoren führen verschiedene mögliche Ursachen an. Dies seien zum Beispiel starke Winter mit einer hohen Mortalität sowie Jagdausübung und Hegemaßnahmen. In der Kontrollregion der mtDNA (826 bp lang) fanden die Autoren sieben Haplotypen. Drei Haplotypen waren sehr eng verwandt mit der in einer Datenbank beschriebenen Unterart *Cervus elaphus atlanticus* und können als Urpopulation angesehen werden. Die anderen Haplotypen zeigten Verwandtschaft zu *C. e. hispanicus*, *C. e. hippelaphus* und eine nicht so enge Verwandtschaft zu *C. e. corsicanus* und *C. e. barbarus*. Die mtDNA der historischen Proben war stark degradiert, es wurde deshalb ein Bereich von 175 bp Länge analysiert. Diese hier gefundenen Haplotypen fanden sich auch in aktuellen Proben wieder. Bei der genetischen Strukturanalyse wurden alle Gehegetiere fehlerfrei zugeordnet. Bei den anderen Populationen war die Zuordnung nicht eindeutig. Die Hirsche konnten aber regional zugeordnet werden, so dass man von vier Clustern sprechen konnte, in denen es durch Migration zum Genaustausch kam.

Wie in allen anderen Ländern, wurden auch norwegische Hirsche (*Cervus elaphus atlanticus*) im 19. Jahrhundert stark dezimiert. Eine Arbeitsgruppe um Haanes (2010) untersuchte 419 Hirsche aus 24 Gemeinden. Von erlegten Tieren aus den Jahren 2000 bis 2004 wurden Blut- oder Muskelproben genommen. Zur Auswertung wurden die Hirsche in 15 Gruppen zusammengefasst.

14 Mikrosatelliten kamen zur Anwendung. Die Heterozygotie wurde mit  $H = 0,61 (\pm 0,2)$  berechnet. Durchschnittlich wurden  $4,1 (\pm 0,3)$  Allele bei insgesamt 74 Allelen gefunden. Die Autoren berechneten in 14 der 15 Gruppen einen zurückliegenden genetischen Flaschenhals. Auffallend war, dass man in Norwegen zwei genetische Rotwildgruppen, eine nordwestliche und eine südöstliche fand. In diesen Gruppen konnte man fünf unterschiedliche Populationen differenzieren.

In Frankreich wurden Hirsche in einem 2800 ha großen Waldgebiet untersucht (Frantz et al., 2008). Ziel dieser Arbeit war es, Korrelationen zwischen genetischer und geografischer Distanz, unterschieden nach Geschlecht und Alter, zu erforschen. Hierzu wurden Gewebe- und Knochenproben aus den Jahren 1979 bis 2005 mit Hilfe von 14 Mikrosatelliten untersucht.

Die gefundenen Werte waren inhomogen. Bei dem Mikrosatelliten IOBT918 wurden 2 Allele gefunden, die Werte für die erwartete Heterozygotie  $H_e$  und die beobachtete Heterozygotie  $H_o$  betrugen jeweils 0,112. Für den Mikrosatelliten Cer14 betrugen die Heterozygotiewerte  $H_e =$

0,842 und  $H_o = 0,823$  bei elf gefundenen Allelen. Allerdings hatten alle Mikrosatelliten nur eine maximale Differenz von 0,04 zwischen erwarteter und beobachteter Heterozygotie. Aufgrund von ungleicher Probenanzahl über die Jahre und eines Wechsels im Jagdmanagement, war, so schreiben die Autoren, eine Auswertung der Daten schwierig. Es wurden teilweise Jahrgänge zusammengefasst, teilweise wurden juvenile und adulte Tiere gemeinsam ausgewertet.

Die Autoren konnten zeigen, dass es eine Korrelation zwischen genetischer und geografischer Distanz bei den weiblichen Tieren gibt. Weibliche Tiere hatten im Durchschnitt einen Lebensraum mit einem Radius von circa acht Kilometer um ihren Estand. Eine Korrelation bei den männlichen Tieren konnte nicht nachgewiesen werden.

Aus Vorpommern stammten 30 Rothirsche, 30 Rehe und 22 Damhirsche, die im Rahmen einer vergleichenden Mikrosatellitenanalyse untersucht wurden (Poetsch et al., 2001). Die Tiere wurden in den Jahren 1998 und 1999 erlegt, Muskelproben wurden entnommen. Zwölf sequenzierte Mikrosatelliten des Rentiers (*Rangifer tarandus*) mit veröffentlichten Primersequenzen wurden beim Rotwild (*Cervus elaphus*), Rehwild (*Capreolus capreolus*) und Damwild (*Dama dama*) angewandt und sequenziert.

Die Autoren fanden bei dem Mikrosatelliten RT1 fünf verschiedene Allele mit einer Länge von 213 bp bis 223 bp bei einer beobachteten Heterozygotie  $H_o = 0,60$ , beim Mikrosatelliten RT6 sechs Allele, 93 bp – 108 bp,  $H_o = 0,80$  und beim Mikrosatelliten NVHRT48 acht Allele, 94 bp – 110 bp,  $H_o = 0,67$ . Mit Hilfe der getesteten Mikrosatelliten konnten die Autoren in Blindproben die jeweilige Tierart richtig zuordnen.

Um polymorphe Mikrosatelliten für die Untersuchung von Iberischen Rothirschen (*Cervus elaphus hispanicus*) zu finden, wurden 45 Mikrosatelliten getestet, die bei anderen Klauentieren beschrieben wurden (Sanchez-Fernandez et al., 2008). Zungengewebe von acht andalusischen Hirschen, erlegt 2003 bis 2006, wurden für diesen Vortest verwendet. 21 der getesteten Mikrosatelliten waren polymorph. Die Autoren etablierten aus elf dieser Mikrosatelliten vier Multiplex-PCRs. 30 andalusische Hirsche wurden hiermit untersucht. Es wurden zwischen 5 und 14 Allele gefunden. Die erwartete Heterozygotie  $H_e$  schwankte zwischen 0,617 und 0,881, die beobachtete Heterozygotie  $H_o$  zwischen 0,600 und 0,931.

Eine ungarische Arbeitsgruppe um Zsolnai (2009) etablierte einen Abstammungsnachweis für Rothirsche. Blut- und Muskelproben von 119 Hirschen aus zwei Gehegehaltungen waren die

Basis für diese Untersuchung. Aus insgesamt 41 getesteten Mikrosatelliten stellten die Autoren ein System aus neun Mikrosatelliten zusammen. Die Sicherheit der richtigen Zuordnung betrug > 99%.

Die Werte der Heterozygotien waren für Farm A:  $H_e = 0,654 - 0,860$ ;  $H_o = 0,642 - 0,851$  und für Farm B:  $H_e = 0,566 - 0,866$ ;  $H_o = 0,596 - 0,962$ . Je nach Mikrosatellit wurden acht bis 17 Allele gefunden.

Eine phylogeographische Auswertung von europäischen und nordafrikanischen Hirschen wurde von Skog et al. (2009) durchgeführt. Aus 39 Gebieten wurden zwei mitochondriale Marker, cyt- b und D- Loop, analysiert. Die Autoren fanden drei verschiedene Linien. Eine westliche, Skandinavien bis Spanien, eine östliche, Balkan und Norditalien und eine mediterrane Linie, Sardinien und Nordafrika umfassend. Leider berücksichtigt diese Studie nur Proben aus Bayern. Nördlich der Mainlinie kamen keine Proben zur Auswertung. Genau hier treffen aber die westliche und östliche Linie aufeinander.

Der Verlauf dieser Linie, beziehungsweise der Differenzierungsgrad der Populationen in diesem Gebiet ist interessant. Um einer Inzuchtdepression durch Inselpopulationen entgegenzuwirken, wäre eine Vernetzung der Rotwildgebiete durch Wanderkorridore ein mögliches Mittel. Um solche Wanderkorridore möglichst effizient anzulegen, also eine hohes Maß an „Blutauffrischung“ zu erlangen, wären detaillierte Informationen wünschenswert.

### 3 Material und Methoden

Aus Knochenbohrproben von Abwurfstangen und Geweihen wurde DNA isoliert. Diese wurde mittels PCR amplifiziert und die PCR-Amplifikate elektrophoretisch mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Sequenzen ausgewählter PCR-Amplifikate wurden mit Pyro- und Sangersequenzierung überprüft. Populationsgenetische Kennzahlen wurden mit frei zugänglichen Programmen berechnet.

Alle Arbeiten wurden im molekulargenetischen Labor der Professur für Schweinekrankheiten der JLU Gießen durchgeführt.

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Geräte

- DNA-Sequenzierautomat: DNA-Analyser 4200, LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA
- Kugelmühle: MM200, Retsch GmbH, Haan
- Laborwaage: Ohaus Scout II, Ohaus Corp. Pine Brook, N. J., USA
- PCR-Thermocycler: T-Gradient, Whatman Biometra, Göttingen
- Photometer: Ultrospec 1100pro, Amersham Biosciences, Freiburg
- pH-Meter: Hanna HI 991000, Hanna Instruments, Portugal
- Pipetten: Biohit GmbH, Rosbach v. d. Höhe; Roth, Karlsruhe
- Pyrosequenzierautomat: Pyromark ID, Biotage AB, Uppsala, Schweden
- Spectrometer: ND-1000, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, USA
- Thermocycler: HLC BioTec, Bovenden
- Vortexer: Heidolph Elektro KG, Kelheim
- Wasserbad: Memmert WB14, Firma Memmert, Schwabach
- Zentrifuge: Biofuge fresco, Heraeus, Hanau

##### 3.1.2 Chemikalien

- Acrylamidlösung (LongRanger Gel Solution), Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf
- Annealingpuffer für Pyrosequenzierung, Biotage AB, Uppsala, Schweden
- APS (Ammoniumperoxodisulfat), Roth, Karlsruhe
- Bindungspuffer für Pyrosequenzierung, Biotage AB, Uppsala, Schweden
- Borsäure, Roth, Karlsruhe



- dNTPs, Biotage AB, Uppsala, Schweden
- EDTA, Roth, Karlsruhe
- Enzymlösung für Pyrosequenzierung, Roth, Karlsruhe
- Ethanol 99,8 %, Roth, Karlsruhe
- Exonuclease I, *E.coli*, 20 u /  $\mu$ L, Fermentas, St. Leon-Rot
- Formamid, deionisiert, Roth, Karlsruhe
- Fuchsin, AppliChem GmbH, Darmstadt
- Harnstoff, Roth, Karlsruhe
- Invisorb® Spin Forensic Kit, Firma Invitex GmbH, Berlin
- Isopropanol, Roth, Karlsruhe
- Micro-90 cleaning solution, Sigma-Aldrich, Hamburg (Waschlotion für Glasplatten)
- Natronlauge, Roth, Karlsruhe
- pBluescript II KS +(Vektor- DNA), Stratagene, Waldbronn
- Pipettenspitzen, Roth, Karlsruhe
- Primer, Biomers GmbH, Ulm (Längenstandardprimer)
- Primer, metabion international AG, Martinsried
- Primer, Sigma Aldrich, Hamburg (Pyrosequenzierungsprimer)
- Proteinase K, Qiagen GmbH, Hilden
- Qiagen Multiplex PCR- Kit, Qiagen GmbH, Hilden
- Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml), Roth, Karlsruhe
- Shrimp Alkaline Phosphatase 1 u / L, Fermentas, St. Leon-Rot
- Streptavidin-Beads, 7,5 %-ige Lösung, GE Healthcare, Freiburg
- Substratlösung für Pyrosequenzierung, Biotage AB, Uppsala, Schweden
- TEMED p.a., Roth, Karlsruhe
- Tris, Roth, Karlsruhe
- TrisHCl, Roth, Karlsruhe
- Waschpuffer für Pyrosequenzierung, Biotage AB, Uppsala, Schweden

### 3.1.3 Lösungen und Puffer

1 x TE-Puffer:            10 mM TrisHCl  
                                  1 mM EDTA

10 x TE-Puffer: 100 mM TrisHCl  
10 mM EDTA

1 x TBE-Puffer: 100 mM Tris  
100 mM Borsäure  
2 mM EDTA

10 x TBE-Puffer: 1000 mM Tris  
1000 mM Borsäure  
20 mM EDTA

Licor-Auftragspuffer (Stammlösung):  
12,5 ml Formamid  
0,5 ml 0,5 M EDTA-Lösung  
6 mg/ml Fuchsin

Licor-Auftragspuffer (Gebrauchslösung):  
14,4 ml Formamid  
600 µl 0,5 M EDTA-Lösung  
1 ml Licor-Auftragspuffer-Stammlösung

ExoSAP-Mix: 0,5 µL Exonuclease I  
1,0 µL Shrimp Alkaline Phosphatase

### 3.2 Probenmaterial

Die Anzahl der Hirsche im Rotwildhegegebiet Krofdorfer Forst (Gießen, Hessen) beträgt circa 300 Tiere in einem ungefähr 16.000 Hektar umfassenden Hegering. Die Hirsche werden in einem Hirschbuch erfasst und besondere Merkmale beschrieben. Das Hirschbuch enthält neben einer eindeutigen Nummer für jedes Tier, das geschätzte Alter und ob der Hirsch zu schonen oder zum Abschuss freigegeben ist (persönliche Mitteilungen, Forstamtsleiter Hr. Voll).

Es wurden 108 Abwurfstangen und 41 Geweihe von insgesamt 56 Hirschen untersucht. Die Abwurfstangen wurden in den Jahren 2002 bis 2010 im Krofdorfer Forst gesammelt. Durch fachkundige Personen des Hegerings und des Forstamtes wurden die Abwurfstangen den Hirschnummern auf Grund phänotypischer Merkmale zugeordnet und deren Massen bestimmt. Die Geweihe stammten von Tieren, die in den Jahren 2007 bis 2009 erlegt oder verendet aufgefunden wurden (Tab. 61 im Anhang).

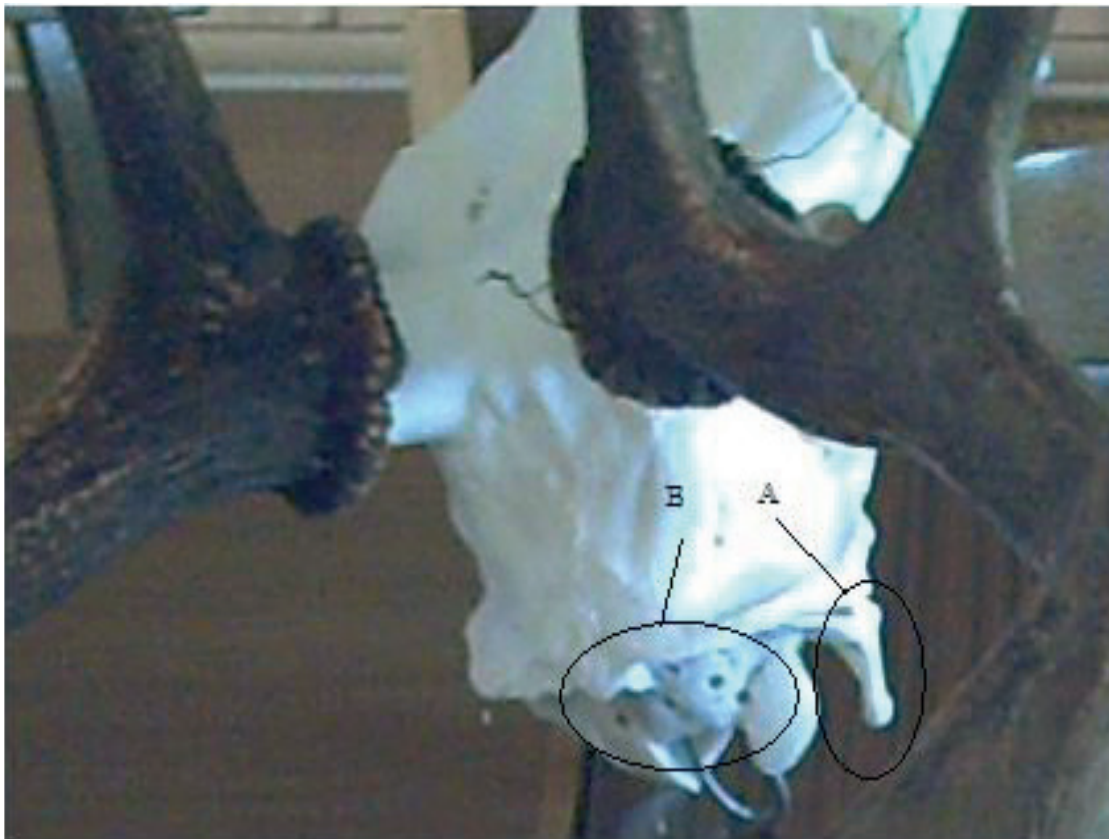
Als Untersuchungsmaterial wurden Knochenbohrproben entnommen. Die Probennahme erfolgte mit Hilfe eines handelsüblichen Akkuschaubers und 5 mm HSS-Bohrern. Die Probenahmestellen wurden bis ein Millimeter tief vorgebohrt, um eventuelle Verschmutzungen zu entfernen. Direkt im Anschluss wurde mit einem gereinigten Bohrer die Probenahme durchgeführt. Die Bohrspäne wurden mit einem Schiffchen aus Alufolie aufgefangen und in ein Probenröhrchen überführt. Dieses wurde beschriftet und die Probe bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert. Das Schiffchen wurde verworfen. Der Bohrer wurde zur Reinigung mit einer Drahtbürste abgebürstet und in einer offenen Flamme bis zur Rotglut ausgeglüht.

An den Abwurfstangen erfolgte die Probennahme aus dem Petschaft (Bruchfläche der Geweihstange). Bei den Geweihen wurden Proben, wie oben beschrieben, aus dem *Os occipitale* entnommen. Dies geschah aus der *Squama*, aus der *Pars lateralis* und / oder aus dem *Processus paracondylaris* (Abb. 5).

### 3.3 DNA- Extraktion

Als Basis für die Gewinnung der DNA aus den Bohrspänen diente das Protokoll „DNA isolation from bones or teeth“ des Invisorb® Spin Forensic Kit der Firma Invitex GmbH, Berlin. In Vorversuchen wurde das Protokoll optimiert, um die Ausbeuten der gewonnenen DNA zu erhöhen. Von den DNA-Proben wurde die Konzentration bestimmt. Hierzu wurden 1,5 µl der jeweiligen Probe mit dem NanoDrop Spektrometer bei 260 nm photometrisch gemessen und die Konzentration automatisch berechnet. Angestrebt, beziehungsweise für die PCR notwendig, ist eine Konzentration im Bereich  $c_{\text{DNA}} = 20 - 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ . Die Messergebnisse sind in Tabelle 62 im Anhang zusammengefasst. Die DNA-Proben wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Abb. 5: Rothirschschädel, Ansicht von caudodorsal



A) *Processus paracondylaris* und B) *Squama und Pars lateralis des Os occipitalis*

Bei diesem Hirschschädel ist die Probenahme bereits durchgeführt worden, die Probenahmestellen sind deutlich sichtbar.

### 3.4 Mikrosatelliten

Es wurden insgesamt 22 Primerpaare getestet (Tab. 63 im Anhang). Neunzehn der 22 Primerpaare wurden nach einer Studie zur Untersuchung der Gendiversität der Rotwildpopulationen in Bayern (Kuehn et al., 2003) und drei nach einer Studie über Mikrosatellitenpolymorphismen zwischen Rotwild, Rehwild und Damwild (Poetsch et al., 2001) gewählt. Nach Literaturangaben waren durch Verwendung dieser Primer Fragmentlängen im Bereich von 88 bis 299 bp zu erwarten.

Die Sequenzen der Primer wurden der NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)-Datenbank entnommen.

Die verwendeten Mikrosatelliten waren gleichmäßig über das Hirschgenom verteilt. Eine Übersicht der Lokalisation (nach Slate et al., 2002) zeigt Tabelle 2.

Tab. 2: Verteilung der verwendeten Mikrosatelliten über das Genom beim Rothirsch

Mikrosatellit	Chromosom	Mikrosatellit	Chromosom
IOBT965	5	CSRM60	12
CSSM16	11	BM1818	7
MM12	26	CSSM66	21
RME25	12	CSSM14	5
INRA35	14	RT1	26
ETH225	28	RT6	19
CSSM19	19		

Alle Primer wurden bei der Firma „metabion international AG“, Martinsried, synthetisiert. Die Forward-Primer waren am 5'-Ende mit dem Farbstoff IRD800 markiert. Geliefert wurden die Primer als Lyophilisat. Sie wurden nach Herstellerangabe in 1 x TE-Puffer gelöst und ihre Konzentration photometrisch bestimmt. Dazu wurden 5 µl der jeweiligen Primerlösung in ein 2 ml Eppendorfcup pipettiert und mit 395 µl 1 x TE-Puffer verdünnt. Mit dem Photometer Ultrospec 1100 pro wurde die Extinktion dieser Lösung bei 260 und 320 nm Wellenlänge gemessen. Die Konzentrationen in µmol/l (µM) der Primerlösungen wurden nach folgender Formel berechnet und auf dem Synthesereport vermerkt:

$$c = \frac{E}{((15200 * \#A) + (7500 * \#C) + (12010 * \#G) + (840 * \#T)) * d} * VF$$

mit    c =      Konzentration in  $\mu\text{mol/l}$  ( $\mu\text{M}$ )  
        E =      korrigierter Extinktionswert ( $E_{260\text{ nm}} - E_{320\text{ nm}}$ )  
        #X =      Anzahl des jeweiligen Nukleotides im Primer  
        d =      Schichtdicke der Küvette (hier d = 1 cm)  
        VF =      Verdünnungsfaktor (hier VF = 80)

Aus Teilmengen dieser Originallösungen wurden 16  $\mu\text{M}$  Stammlösungen hergestellt. Um die Probenanzahl zu reduzieren, wurden mehrere Primer in Multiplex-Lösungen gemischt und getestet. Alle Primer-Lösungen wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.5 Polymerase Kettenreaktion

Zuerst wurde für jedes Primerpaar eine PCR-Optimierung durchgeführt. Hierzu wurde im Temperaturgradienten die optimale Annealingtemperatur ermittelt. In Vorversuchen wurde die Zyklenzahl für die durchschnittliche DNA-Konzentration von 70 ng/ $\mu\text{l}$  bestimmt. Ebenso wurden verschiedene Primerkombinationen getestet. Das Verwenden von Multiplexansätzen reduziert die Anzahl der durchzuführenden PCR-Reaktionen und den Materialaufwand.

Für die PCRs wurde das *Qiagen Multiplex PCR-Kit* der Firma Qiagen verwendet. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zeigt Tabelle 3. Um Kreuzkontaminationen auszuschließen, wurden zuerst Mastermix und Primerlösung in das PCR-Gefäß pipettiert. Erst dann wurde unter einer Werkbank die DNA-Probe zugegeben. Danach wurde das PCR-Gefäß verschlossen und durch Herabschütteln die Lösungen gemischt.

Tab. 3: PCR-Ansatz Probe

Substanz	Menge [ $\mu$ l]
Qiagen Multiplex PCR Master Mix	5,0
Primerlösung (Mono- oder Multiplex)	2,5
Proben-DNA-Lösung	2,5
Gesamtvolumen	10,0

Die PCR-Gefäße wurden nach durchgeführter PCR bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

### 3.6 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Da durch die Primerauswahl Fragmentlängen im Bereich von 88 - 299 bp zu erwarten waren, wurde die PAGE als Elektrophoreseverfahren ausgewählt. Diese ist speziell zur Analyse kurzer DNA-Fragmente ausgelegt und zeichnet sich durch eine hohe Auflösung aus. Selbst Größenunterschiede der Fragmente von nur einem Basenpaar können in geeigneten Gelen aufgelöst werden.

#### 3.6.1 Probenvorbereitung und -auftrag

Zu analysierende PCR-Produkte wurden mit Licor-Auftragspuffer im Verhältnis 1/8 verdünnt. Diese wurden anschließend zusammen mit dem Längenstandard im Wasserbad für 3 Minuten bei 92°C denaturiert und auf Eis abgeschreckt. Von den so denaturierten PCR-Produkten wurden 0,25  $\mu$ l auf ein 6% iges Polyacrylamidgel aufgetragen (Arbeitsanweisung zum Gießen eines 6%igen Gels siehe Anhang 2). Zur Bestimmung der exakten Größe der PCR- Produkte wurde nach jeder 4. bis 6. Probe der Längenstandard aufgetragen.

#### 3.6.2 Längenstandard

Als Längenstandard wurde ein laboreigener Standard hergestellt. Zur Herstellung des Längenstandards wurde Vektor-DNA (pBluescript II KS +) verwendet. Aus den Primern MS,

MS71, MS141, MS180, MS225 und MS281 (Firma Biomers) wurden Amplifikate der Länge 71, 141, 180, 225 und 281 bp generiert (Tab. 4). Dabei diente der am 5'-Ende mit dem Farbstoff IRD800 markierte Primer MS als Forwardprimer. Alle anderen Primer wurden in Kombination mit MS als Reverseprimer eingesetzt. Der PCR-Reaktionsansatz für die Multiplex-PCR zur Herstellung des Längenstandards sowie das entsprechende PCR-Programm sind in Tabelle 5 und 6 aufgeführt.

Tab. 4: Zur Herstellung der Längenstandards verwendete Primer

Primernamen	Sequenz 5' - 3'
MS (forward)	GTG TAA AGC CTG GGG TGC
MS71 (reverse)	GGA AAG CGG GCA GTG AG
MS141 (reverse)	ATA CGC AAA CCG CCT CTC
MS180 (reverse)	CGC AGC GAG TCA GTG AGC
MS225 (reverse)	GCC TTT GAG TGA GCT GAT ACC
MS281 (reverse)	TTG CTC ACA TGT TCT TTC CTG

Tab. 5: PCR-Ansatz Längenstandard

Substanz	Menge [µl]
Qiagen Multiplex PCR Master Mix	12,5
Primermix (reverse Primer MS71, MS141, MS180, MS225, MS281; forward Primer MS)	10,0
DNA (10 <sup>6</sup> Moleküle/µl; pBluescript II KS)	2,5
Gesamtvolumen	25,0



Tab. 6: Programm der Längenstandard-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit		Zyklenzahl
1	95	15 min	Denaturierung und Taq-Aktivierung	1 x
2	94	30 s	Denaturierung	30 x
3	58	90 s	Annealing	
4	72	90 s	Extension	
5	72	10 min	Final Extension	1 x
6	4		Ende	

### 3.6.3 Auswertung der PAGE

Die Auswertung der PAGE erfolgte mit der Software GeneImagIR 4.05 (Scanalytics Inc., Fairfax, USA), die eine automatische Erkennung der Banden beinhaltet. Bei der Nachbearbeitung wurden die Probennummern eingegeben und die Längenstandards zugeordnet. Alle automatisch erkannten Banden wurden kontrolliert, bei Bedarf korrigiert und Stotterbanden entfernt. Anhand der Längenstandards wurden die Längen der Allele bestimmt und in eine Excel-Tabelle übernommen. Diese Tabelle diente als Grundlage für alle sich anschließenden Auswertungen.

### 3.7 Pyrosequenzierung

Zur Bestimmung der Sequenz eines Mikrosatelliten mittels Pyrosequenzierung wurden die PCR- und Sequenzierungsprimer mit der Software *PSQ Assay Design* (Biotage AB, Uppsala, Schweden) entwickelt. Verfahrensabhängig war jeweils ein PCR-Primer biotinyliert. Eine Übersicht der verwendeten Primersequenzen zeigt Tabelle 7, die Zusammensetzung der PCR-Ansätze Tabelle 8.

Tab. 7: Für die Pyrosequenzierung verwendete Primer

Primer	Forward	Reverse	Sequenzierung
5	<b>B</b> -CCAGGGAAGATGAAGTGACC	ACTAAGGAGCCCCCCTAC	AGGAGCCCCCCTAC
7	<b>B</b> -TGCTTTATGACACTATCCG	TTTGCAGCCTCCACATTG	ATTTCTGAGGCATAATGA
9	<b>B</b> -TCAGGATTTGTGCCTAAACCTAA	TGGAGGATTTGGAACATGC	CATGCCAGATGACACTA
11F	<b>B</b> -GAACCTGCCTCTCCTGCATT	GGTTCCCAGGTGGGTAGTGGT	CAGGTGGGTAGTGGTTT
11R	GAACCTGCCTCTCCTGCATTG	<b>B</b> -TGCCTGTGGCCAAGTAGGG	TGCATTGGCAGGTGG
14	<b>B</b> -ATGGAAACCGCACCTAAGTTATCT	TTTCAAGGTCCATGCATGTTATCA	GACTAAATAATATTCCATC
20	<b>B</b> -GAAATTGCAACCCATCTTCC	CAAAGATTTTACGCCCTACAGAACT	GGTGATAAACGCCCC
21	ATGTCGGATTTTGAGACTGTTACC	<b>B</b> -TGGGCAGAGTGATTCCTCTT	CGGATTTTGAGACTGTTAC

**B** = Biotin

Die Primer für die Pyrosequenzierung wurden bei der Firma Sigma-Aldrich, Hamburg synthetisiert. Auch sie wurden als Lyophilisat geliefert und in 1 x TE-Puffer gelöst. Die Verdünnung und Konzentrationsbestimmung erfolgte analog den unter Kapitel 3.4 beschriebenen Primern.

Tab. 8: PCR-Ansatz Pyrosequenzierung

Substanz	Menge [µl]
Qiagen Multiplex PCR Master Mix	20
Primerlösung aus Forward- und Reverse- Primer	10
Proben-DNA-Lösung	10
Gesamtvolumen	40

Tab. 9: Programm der Pyrosequenzierungs-PCR

Schritt Nr.	Temperatur [°C]	Zeit		Zyklenzahl
1	95	15 min	Denaturierung und Taq-Aktivierung	1 x
2	95	30 s	Denaturierung	36 x
3	57	90 s	Annealing	
4	72	90 s	Extension	
5	72	10 min	Final Extension	1 x
6	4		Ende	

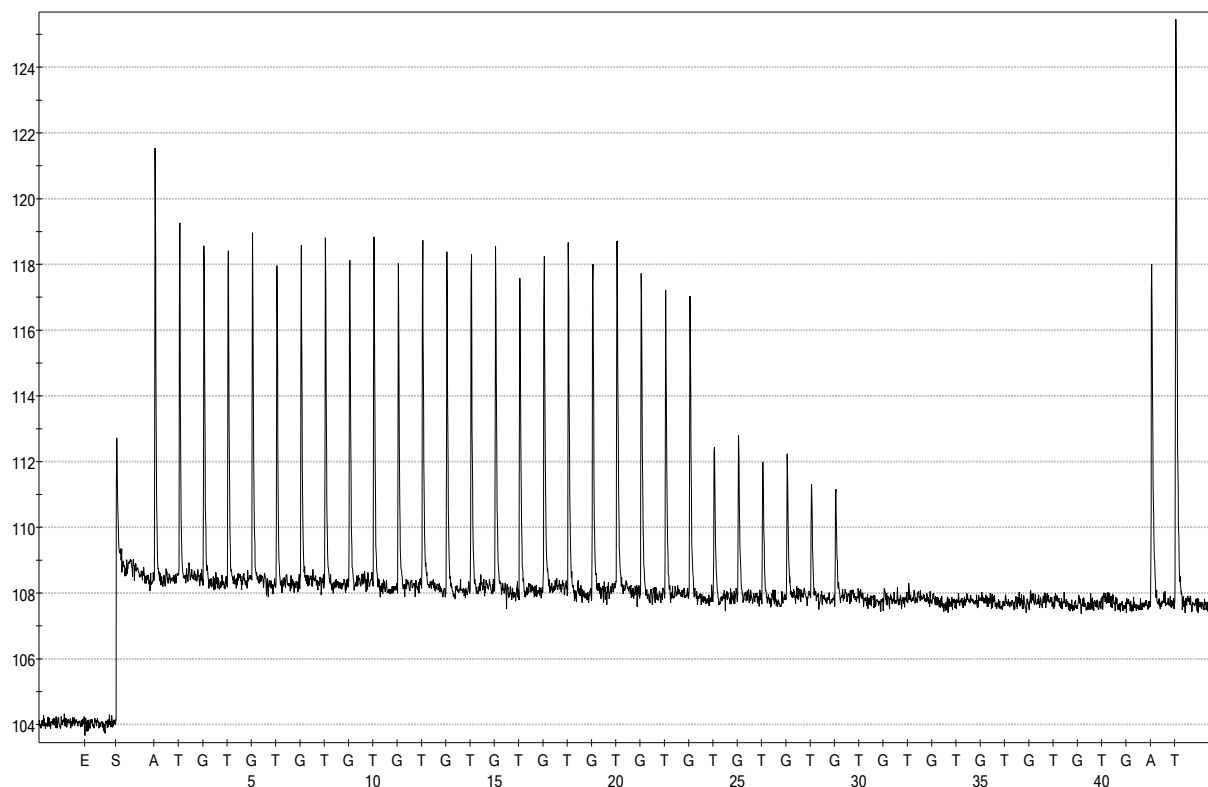
Eine Arbeitsanweisung für die Probenvorbereitung zur Pyrosequenzierung befindet sich im Anhang (Anhang 4).

Die Pyrosequenzierung wurde mit dem Pyromark ID der Firma Biotage AB durchgeführt. Nach der Eingabe der zu analysierenden Sequenz berechnete die Software (Pyromark ID 1.0) die notwendigen Mengen an Enzymmix, Substrat und Nukleotiden. Diese Mengen wurden in die dafür vorgesehene, auf Durchgängigkeit der Düsen überprüfte Kartusche pipettiert. Die befüllte Kartusche und die PSQ 96-Platte wurden in das Pyromark-Gerät eingesetzt und der Analysenlauf gestartet.

Aus den Pyrogrammen wurde die Anzahl der Basenwiederholungen ermittelt (Abb. 6). Aus diesen Wiederholungen und den bekannten Primersequenzen wurde die Gesamtlänge des DNA-Fragmentes berechnet.

Die durch die Pyrosequenzierung ermittelten Gesamtlängen dienten der Kontrolle der gefundenen Fragmentlängen derselben DNA-Probe aus der PAGE. Bei Differenzen wurde die Länge aus der PAGE korrigiert.

Abb.6: Pyrogramm (Beispiel)



Probennr. 180, Mikrosatellit INRA35: Sequenz:  $A(TG)_{11}ATT\dots$  und  $A(TG)_{14}ATT\dots$

E: Enzymmix, S: Substrat; Einheit der Ordinate: rfu (relative fluorescence unit)

### 3.8 Einzelsequenzierung

Die Einzelsequenzierung nach Sanger (*single read sequencing*) wurde als Auftrag bei der Firma GATC Biotech durchgeführt. Für diese Sequenzierung dürfen Primer nicht mit Farbstoff markiert sein. Deshalb wurden unmarkierte Forward-Primer, wie unter Kapitel 3.4 beschrieben, bei der Firma metabion international AG in Martinsried synthetisiert, mit 1 x TE-Puffer gelöst und deren Konzentration bestimmt. Mit ausgewählten DNA-Proben wurde eine PCR für die Einzelsequenzierung durchgeführt. Die Zusammensetzung des Ansatzes und das PCR-Programm zeigen Tabelle 10 und 11.

Tab. 10: PCR-Ansatz Einzelsequenzierung

Substanz	Menge [µl]
Qiagen Multiplex PCR Master Mix	15,0
Primerlösung aus unmarkierten Forward- und Reverse-Primer	7,5
Proben-DNA-Lösung	7,5
Gesamtvolumen	30,0

Tab. 11: Programm der Einzelsequenzierungs-PCR

Schritt Nr.	Temperatur [°C]	Zeit		Zyklenzahl
1	95	15 min	Denaturierung und Taq-Aktivierung	1 x
2	95	30 s	Denaturierung	35 x
3	56	90 s	Annealing	
4	72	90 s	Extension	
5	72	10 min	Final Extension	1 x
6	4		Ende	

Vier Mikroliter von jedem PCR-Produkt wurden auf ein Ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (1,9%) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 10 min bei 120 V. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert. Die PCR-Produkte von allen positiven Proben wurden mit 4 µl Exo/SAP-Mix behandelt (Tab. 12).

Tab. 12: Programm der ExoSAP-Behandlung

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
1	37	30 min
2	80	15 min
3	4	

Danach wurden die behandelten PCR-Produkte entsprechend den Vorgaben des Sequenzierungslabors versendet.

Die Sequenzierungsdaten wurden mit dem „ApE- A plasmid Editor v1.17“- Programm bearbeitet und ausgewertet. Die Gesamtlänge der Einzelsequenzen diente auch hier der Kontrolle der Fragmentlänge derselben DNA-Probe aus der PAGE. Bei Differenzen wurde die Länge aus der PAGE korrigiert.

### 3.9 Auswertungen

Die ermittelten Fragment- beziehungsweise Allellängen wurden in eine Excel-Tabelle übertragen. Mit Hilfe von „GenAlEx<sup>©</sup> Version 6.4“, einem Add-In für „Microsoft Excel“, wurden die populationsgenetischen Daten berechnet. Mit anderen Programmen, wie z.B. Genepop<sup>©</sup> V4.0 oder Arlequin<sup>©</sup> V3.5.1.2, wurde stichprobenweise ein Vergleich der mit GenAlEx<sup>©</sup> berechneten Daten durchgeführt.

Mit der Anwendung „neighbor.exe“ (aus dem *Phylogenetic Inference Package* [PHYLIP]) wurden die genetischen Distanzen berechnet, die als Eingabe für das Programm TreeView<sup>©</sup> (Win32) V.1.6.6 zur Darstellung von Dendrogrammen dienten.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Methoden

#### 4.1.1 Probenahme

In Vorversuchen zeigte sich, dass die DNA-Ausbeuten an den Bruchstellen der Abwurfstangen nicht überall gleich waren. Die höchste DNA-Konzentration wurde in Proben gefunden, die am Übergang von Petschaft zur Rose gewonnen wurden (siehe Abb. 7).



Abb.7: Ansicht der proximalen Fläche einer Geweihstange

#### 4.1.2 DNA-Isolierung

Das Protokoll „DNA isolation from bones or teeth“ des Invisorb® Spin Forensic Kit der Firma Invitex GmbH, Berlin wurde optimiert, um die DNA-Ausbeuten aus den Bohrspänen zu erhöhen. Die Arbeitsanweisung des modifizierten Protokolls befindet sich im Anhang (Anhang 1).

#### 4.1.3 Mikrosatelliten und Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Von den 22 getesteten Primern wurden 17 eingesetzt. Die Sequenzen dieser Primer zeigt Tabelle 13. In Vorversuchen amplifizierte der Mikrosatellit Cer14 nur unspezifische Produkte. Bei den vier Mikrosatelliten CSRM60, CSSM66, Haut24 und ILSTS06 konnten keine PCR-Produkte amplifiziert werden.

Alle Primerpaare wurden zunächst bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen getestet, wobei die meisten bei einer Annealingtemperatur von 56°C PCR-Produkte in ausreichender

Menge und Qualität generierten. Um alle PCRs bei der gleichen Annealingtemperatur durchführen zu können, wurde bei PCRs, die bei 56°C kein zufriedenstellendes Ergebnis lieferten, die Primer-Konzentration angepasst (Tab. 14). Schließlich wurden die 17 Primer in fünf Multiplex-PCRs zusammengefasst. Auch diese wurden durch Anpassen der Primerkonzentrationen für eine Annealingtemperatur von 56°C optimiert (Tab. 15).

Tab. 13: Sequenzen der eingesetzten Primer

int. Nr.	Name	Sequenz Forward- Primer	Sequenz Reverse- Primer
1	IOBT965	IRD800-GGGGTTGTGGGTAAGCGGAGTT	GATCTAGCGCCAGACAGACGTGTCAT
2	CSSM16	IRD800-AGAGCCACTTGTTACACCCCAAAG	GATGCAGTCTCCACTTGATTCAAA
3	MM12	IRD800-CAAGACAGGTGTTTCAATCT	ATCGACTCTGGGGATGATGT
4	RME25	IRD800-AGTGGGTAAAGGAGCCTGGT	TTAAAGATCCCAGCCTGTGC
5	Haut14	IRD800-CCAGGGAAGATGAAGTGACC	TGACCTTCACTCATGTTATTAA
7	INRA35	IRD800-TTGTGCTTTATGACACTATCCG	TTTGCAGCCTCCACATTG
8	CSPS115	IRD800-AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG	AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG
9	CSSM22	IRD800-TCTCTCTAATGGAGTTGGTTTTTG	CTTTCTCTTCAATCAATCCTCATC
10	ETH225	IRD800-ACATGACAGCCAGCTGCTACT	GATCACCTTGCCACTATTTCTT
11	ETH3	IRD800-GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG	ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG
12	CSSM19	IRD800-TTGTGAGCAACTTCTTGATCTTT	TGTTTTAAGCCACCCAATTATTTG
14	BM1818	IRD800-AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	AGCTGGGAATATAACCAAAGG
15	IOBT918	IRD800-ACTTATGAAAAATTACTGAGAGCG	TTACTACTCCTGTCGCCTCTGA
17	CSSM14	IRD800-AAATGACCTCTCAATGGAAGCTTG	GAATTCTGGCACTTAATAGGATTCA
20	RT1	IRD800-TGCCTTCTTTTCATCCAACAA	CATCTTCCCATCCTCTTTAC
21	RT6	IRD800-TTCCTCTTACTCATTCTTGG	CGGATTTTGACACTGTTAC
22	NVHRT48	IRD800-CGTGAATCTTAACCAGGTCT	GGTCAGCTTCATTTAGAAAC



Tab.14: Herstellung von 100 µl Monoplex-Primerlösungen

Interne Mikrosatelliten- nummer	Volumen Forwardprimerlösung [16 µM] in µl	Volumen Reverseprimerlösung [16 µM] in µl	Volumen 1 x TE- Puffer in µl
1	0,5	0,5	99,0
2	1,2	1,2	97,6
3	0,5	0,5	99,0
4	1,0	1,0	98,0
5	1,0	1,0	98,0
7	1,0	1,0	98,0
8	6,0	6,0	88,0
9	4,0	4,0	92,0
10	2,0	2,0	96,0
11	2,0	2,0	96,0
12	2,0	2,0	96,0
14	2,0	2,0	96,0
15	6,0	6,0	88,0
17	2,0	2,0	96,0
20	2,0	2,0	96,0
21	6,0	6,0	88,0
22	1,2	1,2	97,6

Tab.15: Herstellung von 250 µl Multiplex-Primerlösungen

Multiplex-Ansatz	Interne Mikrosatelliten-nummer	Volumen Forwardprimerlösung [16 µM] in µl	Volumen Reverseprimerlösung [16 µM] in µl	Volumen 1xTE- Puffer in µl
A	3	1,0	1,0	213,0
	7	2,5	2,5	
	10	5,0	5,0	
	14	5,0	5,0	
	20	5,0	5,0	
B	2	3,0	3,0	158,0
	8	15,0	15,0	
	9	10,0	10,0	
	15	15,0	15,0	
	22	3,0	3,0	
C	1	1,25	1,25	227,5
	11	5,0	5,0	
	12	5,0	5,0	
D	4	2,5	2,5	240,0
	5	2,5	2,5	
E	17	5,0	5,0	210,0
	21	15,0	15,0	

Das PCR-Programm für die Proben-DNA-Lösung zeigt die folgende Tabelle 16.

Tab. 16: Programm der Proben-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit		Zyklenzahl
1	95	15 min	Denaturierung und Taq-Aktivierung	1 x
2	95	30 s	Denaturierung	29 x
3	56	90 s	Annealing	
4	72	90 s	Extension	
5	72	10 min	Final Extension	1 x
6	4		Ende	

## 4.2 Mikrosatelliten

Tabelle 17 zeigt die gefundenen und berechneten Kennzahlen der 17 verwendeten Mikrosatelliten. Die Anzahl unterschiedlicher Allele ( $N_a$ ) variierte zwischen zwei (CSSM14) und zehn (NVHRT48) Allelen pro Mikrosatellit. Insgesamt wurden mit den 17 untersuchten Mikrosatelliten 95 verschiedene Allele nachgewiesen. Die effektive Allelzahl ( $N_e$ ) reichte von 1,1 (CSSM14) bis 9,2 (NVHRT48). Die Werte der erwarteten Heterozygotie  $H_e$  lagen im Bereich von 0,101 (CSSM14) bis 0,891 (NVHRT48), die der beobachteten Heterozygotie  $H_o$  von 0,107 (CSSM14) bis 0,875 (CSSM19). Die F-Werte (Fixationsindex) reichten von -0,136 (RME25) bis 0,440 (ETH3).

Tab. 17: Kennzahlen der Mikrosatelliten

Mikrosatellit	interne Nr.	Na	Ne	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F
MM12	3	3	1,5	0,315	0,334	0,058
INRA35	7	6	3,7	0,696	0,728	0,043
ETH225	10	7	2,7	0,661	0,631	-0,048
RT1	20	7	2,6	0,554	0,613	0,097
BM1818	14	6	3,9	0,625	0,742	0,158
NVHRT48	22	10	9,2	0,821	0,891	0,078
IOBT918	15	4	2,5	0,589	0,597	0,013
CSSM16	2	4	3,6	0,821	0,724	-0,135
CSSM22	9	3	1,9	0,393	0,466	0,158
CSPS115	8	6	4,0	0,607	0,753	0,193
ETH3	11	3	1,6	0,214	0,383	0,440
IOBT965	1	6	2,2	0,589	0,546	-0,079
CSSM19	12	8	5,5	0,875	0,817	-0,071
Haut14	5	8	5,3	0,786	0,813	0,033
RME25	4	3	2,2	0,625	0,550	-0,136
RT6	21	9	5,4	0,750	0,815	0,080
CSSM14	17	2	1,1	0,107	0,101	-0,057

Na: Anzahl Allele, Ne: effektive Allelanzahl, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, F: Fixationsindex

Bei diploiden Organismen ergeben sich durch Allelkombinationen verschiedene Genotypen. Eine Übersicht über die maximal mögliche Anzahl und die gefundene Anzahl an Genotypen zeigt Tabelle 18.

Tab 18: Übersicht Genotypen

Mikrosatellit		Anzahl Allele	Anzahl Genotypen		
Name	int. Nr.		maximal möglich	gefunden	%
MM12	3	3	6	5	83
INRA35	7	6	21	14	67
ETH225	10	7	28	12	43
RT1	20	7	28	14	50
BM1818	14	6	21	18	86
NVHRT48	22	10	55	36	65
IOBT918	15	4	10	8	80
CSSM16	2	4	10	10	100
CSSM22	9	3	6	6	100
CSPS115	8	6	21	16	76
ETH3	11	3	6	6	100
IOBT965	1	6	21	10	48
CSSM19	12	8	36	21	58
Haut14	5	8	36	18	50
RME25	4	3	6	5	83
RT6	21	9	45	22	49
CSSM14	17	2	3	2	67

Die Ergebnisse der Abschätzung auf das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes zeigt Tabelle 19. Um eine bessere Vergleichbarkeit mit der Untersuchung der bayerischen Hirschpopulationen zu haben (Kuehn et al., 2003), wurde auch eine Bonferronikorrektur mit den hier 14 übereinstimmenden Mikrosatelliten durchgeführt.

Bei dem Test auf das Vorliegen von Subpopulationen wurden statistisch keine Subpopulationen detektiert.

Tab. 19: Chi-Quadrattest, Überprüfung des Hardy-Weinberg-Equilibrium

Mikrosatellit	int. Nr.	DF	ChiSq	Prob	Signif	Sig. Bonf. 1)	Sig. Bonf. 2)
MM12	3	3	0,693	0,875	ns	ns	ns
INRA35	7	15	17,240	0,305	ns	ns	ns
ETH225	10	21	10,797	0,967	ns	ns	ns
RT1	20	21	16,978	0,712	ns	ns	-
BM1818	14	15	34,722	0,003	**	*	*
NVHRT48	22	45	42,435	0,581	ns	ns	-
IOBT918	15	6	22,062	0,001	**	*	*
CSSM16	2	6	14,583	0,024	*	ns	*
CSSM22	9	3	3,446	0,328	ns	ns	ns
CSPS115	8	15	38,244	0,001	***	*	*
ETH3	11	3	21,390	0,000	***	**	**
IOBT965	1	15	6,927	0,960	ns	ns	ns
CSSM19	12	28	26,610	0,540	ns	ns	ns
Haut14	5	28	48,145	0,010	*	ns	*
RME25	4	3	5,142	0,162	ns	ns	ns
RT6	21	36	71,172	0,000	***	**	-
CSSM14	17	1	0,179	0,672	ns	ns	ns

DF = Anzahl der Freiheitsgrade

ChiSq = Chi-Quadratwert

Prob = probability (Wahrscheinlichkeitswert)

Signif = Signifikanz

Sig. Bonf. 1) = Signifikanz nach Bonferronikorrektur 17 Mikrosatelliten

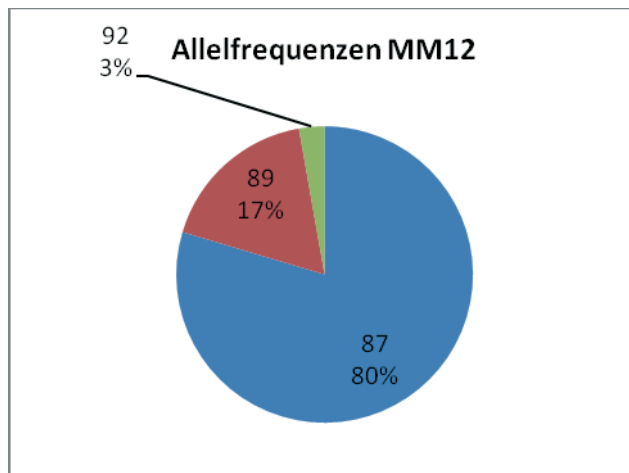
Sig. Bonf. 2) = Signifikanz nach Bonferronikorrektur 14 Mikrosatelliten

ns= nicht signifikant, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; - nicht Bestandteil dieser Berechnung

### 4.2.1 MM12

Es wurden drei Allele bei dem Mikrosatelliten MM12 gefunden (Abb. 8 und Tab. 20). Bei drei Allelen sind maximal sechs verschiedene Allelkombinationen / Genotypen möglich. Bei diesem Mikrosatelliten wurden fünf verschiedene Genotypen gefunden. Eine Übersicht über deren Verteilung zeigt Tabelle 21.

Abb. 8: Allelfrequenzen MM12



Tab. 20: Allelfrequenzen MM12

Allellänge	Frequenz
87	0,796
89	0,176
92	0,028

Tab.21: Genotypen MM12

Genotyp	Anzahl
8787	35
8789	14
8989	2
8792	2
8992	1
9292	0

Die Sequenz des vom Hausrind stammenden Mikrosatelliten MM12 (Acc. No. Z30343) besteht aus einer unterbrochenen (CA)-Tandemwiederholung. Die Sequenz der Hirschprobe unterscheidet sich zum Datenbankeintrag um zwei Deletionen mit insgesamt 16 Basen Länge und um zwei Punktmutationen. Ebenso unterscheidet sich die Anzahl der Tandemwiederholungen (Abb. 9).

Abb. 9: Einzelsequenzen MM12

Mikrosatellit MM12, interne Nr. 3 (Datenbank: gi 457719 emb Z30343.1 ; Bos taurus)	
Z30343.1	CCAGCAAGACAGGTGTTTCAATCTTACACAACATAATCACACATGCAATA
MM12_106_52_87	---- <u>CAAGACAGGTGTTTCAATCT</u> TA <u>T</u> ACAACATAATCACACA-----
Z30343.1	(CA) 15 CTCACACTCACACTCACACTCACATACATCATCCCCAGAGTCGAT
MM12_106_52_87	(CA) <u>6</u> CT-----AC <u>A</u> CACACTCACAT <u>ACATCATCCCCAGAGTCGAT</u>

Probenbezeichnung: Mikrosatellit\_Probennummer\_Hirschnummer\_Allellänge in bp

*blaue Schriftzeichen*= Primerregion; *rote Schriftzeichen*= differierende Basen

Bei dem Mikrosatellit MM12 mit drei unterschiedlichen Allelen, kommt ein Hauptallel mit einer Frequenz von 79,6 % vor. Dieser Mikrosatellit weist eine Drift zu dem Allel mit der Länge von 87 Basenpaaren auf.

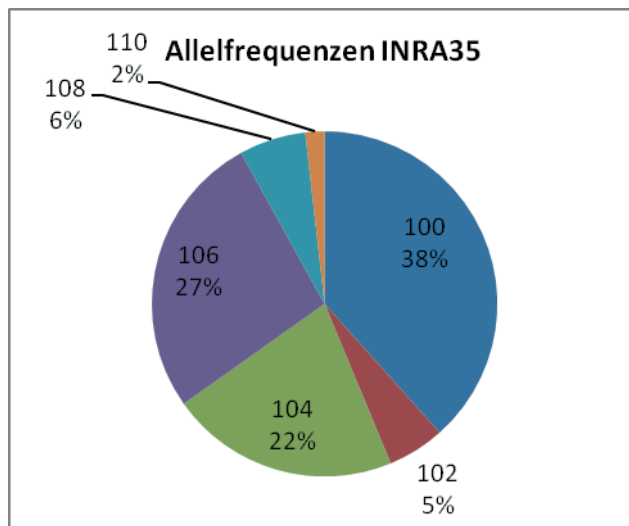
Da dieser Mikrosatellit als Datenbankeintrag nicht vom Rothirsch, sondern vom Hausrind vorliegt, scheint er in der genetischen Analytik beim Rothirsch eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Die Aussagekraft dieses Mikrosatelliten ist begrenzt.



#### 4.2.2 INRA35

Es wurden sechs Allele bei dem Mikrosatelliten INRA35 gefunden (Abb. 10 und Tab. 22). Von maximal 21 unterschiedlichen Genotypen wurden 14 Genotypen gefunden (Tab. 23).

Abb. 10: Allelfrequenzen INRA35



Tab. 22: Allelfrequenzen INRA35

Allellänge	Frequenz
<b>100</b>	0,384
<b>102</b>	0,054
<b>104</b>	0,214
<b>106</b>	0,268
<b>108</b>	0,063
<b>110</b>	0,018

Tab. 23: Genotypen INRA35

Genotyp	Anzahl
100106	13
100104	9
100100	8
104106	5
104104	4
106106	4
100108	3

Genotyp	Anzahl
100102	2
104108	2
106108	2
102102	1
102106	1
102110	1
106110	1

Genotyp	Anzahl
102104	0
102108	0
108108	0
100110	0
104110	0
108110	0
110110	0

Der Mikrosatellit INRA35 (Acc. No. AF236385) weist gemäß Datenbankeintrag eine reine (CA)-Tandemwiederholung auf. Die Sequenz der Hirschprobe unterscheidet sich zum Datenbankeintrag lediglich durch die Anzahl der Wiederholungen (Abb. 11).

Abb. 11: Einzelsequenzen INRA35

Mikrosatellit INRA35, interne Nr. 7 (Datenbank: gi 7621453 gb AF236385.1; Cervus)	
AF236385.1	TTGTGCTTTATGACACTATCCGGTGAAT (CA) 14 TTCATTATGCCT
INRA35_155_70_104	<b>TTGTGCTTTATGACACTATCCGGTGAAT (CA) 13</b> TTCATTATGCCT
AF236385.1	CAGAAATCAGCCTGAGAAGACAATGTGGAGGCTGCAAAGGAT
INRA35_155_70_104	CAGAAATCAGCCTGAGAAGA <b>CAATGTGGAGGCTGCAA</b> ----

Probenbezeichnung: Mikrosatellit\_Probennummer\_Hirschnummer\_Allellänge in bp

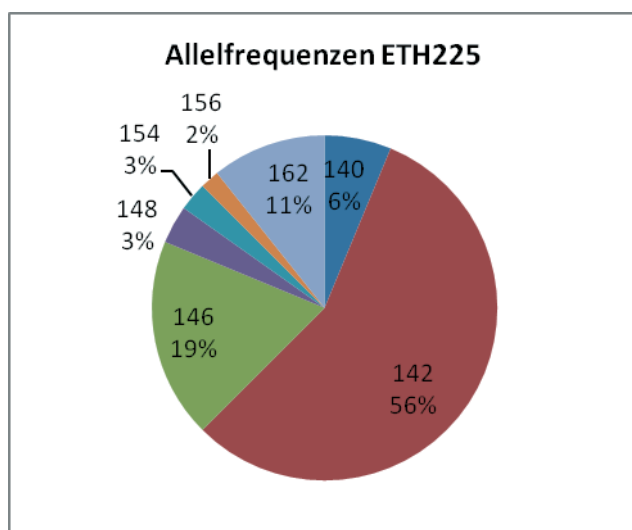
**blaue Schriftzeichen**= Primerregion; **rote Schriftzeichen**= differierende Basen

Der Mikrosatellit INRA35 befindet sich in einer moderaten Drift. Das Allel mit der Länge von 100 Basenpaaren hat eine Frequenz von 38,4 %. Dieses Allel kommt aber bei 32 von 56 Hirschen im Genotyp vor. Insgesamt sind 13 Hirsche (23,2 %) mit diesem Allel reinerbig.

### 4.2.3 ETH225

Es wurden sieben Allele bei dem Mikrosatelliten ETH225 gefunden (Abb. 12 und Tab. 24). Mit sieben unterschiedlichen Allelen sind maximal 28 unterschiedliche Genotypen möglich. Gefunden wurden zwölf Genotypen (Tab. 25)

Abb. 12: Allelfrequenzen ETH225



Tab. 24: Allelfrequenzen ETH225

Allellänge	Frequenz
140	0,063
142	0,563
146	0,188
148	0,036
154	0,027
156	0,018
162	0,107

Tab.25: Genotypen ETH225

Genotyp	Anzahl
142142	17
142146	10
142162	7
140142	5
146162	4
142148	3
142154	3
140146	2
146146	2
146148	1

Genotyp	Anzahl
142156	1
156162	1
140140	0
140148	0
148148	0
140154	0
146154	0
148154	0
154154	0
140156	0

Genotyp	Anzahl
146156	0
148156	0
154156	0
156156	0
140162	0
148162	0
154162	0
162162	0

Bei dem Mikrosatellit ETH225 (Acc. No. AF232767) handelt es sich nach Datenbankeintrag um einen Mikrosatelliten mit einer unterbrochenen (GT)-Tandemwiederholung. Die Sequenz der Hirschprobe weist allerdings eine reine (GT)-Tandemwiederholung auf. Sie unterscheidet sich zum Datenbankeintrag durch drei Punktmutationen, eine Insertion und durch die Anzahl der Wiederholungen (Abb. 13).

Abb. 13: Einzelsequenzen ETH225

Mikrosatellit ETH225, interne Nr. 10 (Datenbank: gi 7621444 gb AF232767.1 ; Cervus)	
AF232767.1	ACATGACAGCCAGCTGCTACTAGAGA-GTTGACTGTGTAATTCTGTGGCCTT
ETH225_149_26_142	<b>ACATGACAGCCAGCTGCTACT</b> AGAGA <u>A</u> GTTGACTGTGTAATTCTGTGGCCTT
AF232767.1	AGAGAAAGGAGTGGCTAGT (GT) 6 GC (GT) 11 GCGTGCACACATATGTTTC
ETH225_149_26_142	AGAGAAAGGAGTGGCTA <u>TT</u> (GT) 6 <u>GT</u> (GT) <u>8</u> GCGTGCACACATATGTT <u>G</u>
AF232767.1	GAGGAAATAGTGGCAAGGTGATC
ETH225_149_26_142	<b>GAGGAAATAGTGGCAAGG</b> <i>tgatC</i>

Probenbezeichnung: Mikrosatellit\_Probennummer\_Hirschnummer\_Allellänge in bp

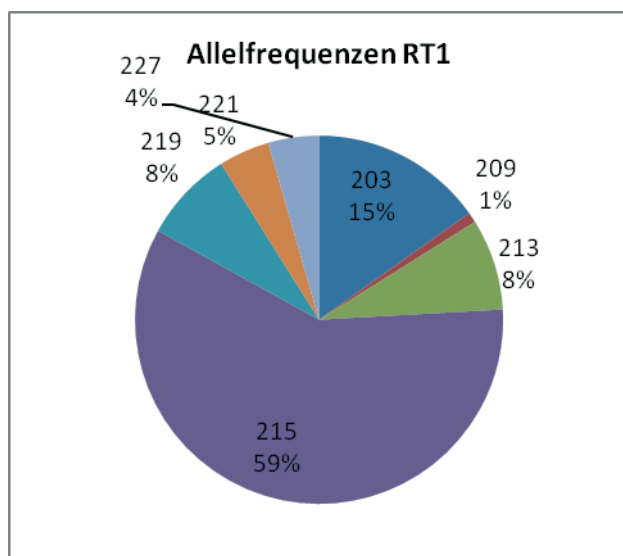
**blaue Schriftzeichen**= Primerregion; **rote Schriftzeichen**= differierende Basen

Auch der Mikrosatellit ETH225 weist eine Drift auf. Das Allel mit 142 Basenpaaren Länge hat eine Frequenz von 56,3 %. 43 der 56 Hirsche (77 %) haben dieses Allel in ihrem Genom, 17 davon reinerbig (30 %).

#### 4.2.4 RT1

Es wurden sieben Allele bei dem Mikrosatelliten RT1 gefunden (Abb. 14 und Tab. 26). Von 28 möglichen Genotypen wurden 14 Genotypen nachgewiesen (Tab. 27).

Abb. 14: Allelfrequenzen RT1



Tab. 26: Allelfrequenzen RT1

Allellänge	Frequenz
<b>203</b>	0,152
<b>209</b>	0,009
<b>213</b>	0,080
<b>215</b>	0,589
<b>219</b>	0,080
<b>221</b>	0,045
<b>227</b>	0,045

Tab. 27: Genotypen RT1

Genotyp	Anzahl
215215	21
203215	8
215219	5
215227	5
215221	3
203203	2
203213	2
213213	2
213215	2
203219	2

Genotyp	Anzahl
209215	1
213219	1
203221	1
219221	1
203209	0
209209	0
209213	0
209219	0
219219	0
209221	0

Genotyp	Anzahl
213221	0
221221	0
203227	0
209227	0
213227	0
219227	0
221227	0
227227	0

Bei dem Mikrosatellit RT1 (Acc. No. U90737) handelt es sich um einen Mikrosatelliten mit reiner (GT)-Tandemwiederholung. Die Sequenz der Hirschprobe unterscheidet sich zum Datenbankeintrag durch eine Punktmutation und die Anzahl der Wiederholungen (Abb. 15).

Abb. 15: Einzelsequenzen RT1

Mikrosatellit RT1, interne Nr. 20 (Datenbank: gi 1906616 gb U90737.1 RTU9073; Cervus)	
U90737	CATCTTCCCATCCTCTTTACCCTGCCCTACTGGTTTTTTGTGTT (GT) 21 AAGG
RT1_183_86_215	<b>CATCTTCCCATCCTCTTTAC</b> CCTGCCCTACTGGTTTTTTGTGTT (GT) <b>14</b> <b>G</b> AGG
U90737	GGCATTATACCTTCCCTCAGGTAATATTCCGCTCTACAATATGTATATTGATG
RT1_183_86_215	GGCATTATACCTTCCCTCAGGTAATATTCCGCTCTACAATATGTATATTGATG
U90737	TTTATTTTCTTGTCCTTGTAGAATGTAAGCGCTGTAGGGCTGAAATCTTTGGGAC
RT1_183_86_215	TTTATTTTCTTGTCCTTGTAGAATGTAAGCGCTGTAGGGCTGAAATCTTTGGGAC
U90737	TCATTTAGTATTTGTTGGATGAAAGAAGGCAT
RT1_183_86_215	TCATTTAGTAT <b>TTGTTGGATGAAAGAAGGCA</b>

Probenbezeichnung: Mikrosatellit\_Probennummer\_Hirschnummer\_Allellänge in bp

**blaue Schriftzeichen**= Primerregion; **rote Schriftzeichen**= differierende Basen

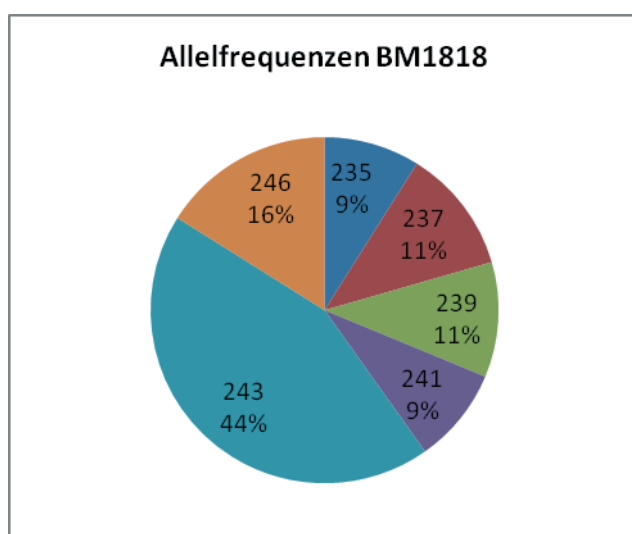
Bei dem Mikrosatellit RT1 herrscht ebenfalls ein Allel vor. Das Allel mit 215 Basenpaaren Länge hat eine Frequenz von 58,9 % und ist im Genom von 45 der 56 Hirsche vertreten, 21 davon reinerbig. Dieser Mikrosatellit weist ebenfalls eine Drift auf. Nur die Hälfte der möglichen Genotypen wurden bei den Analysen gefunden.

#### 4.2.5 BM1818

Bei dem Mikrosatellit BM1818 zeigte der Chi-Quadrat-Test eine statistisch signifikante Abweichung ( $p < 0,05$ ) vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Es wurden sechs Allele bei dem Mikrosatelliten BM1818 gefunden (Abb. 16 und Tab. 28). Von maximal 21 unterschiedlichen Genotypen wurden 18 Genotypen gefunden (Tab. 29).

Abb. 16: Allelfrequenzen BM1818



Tab. 28: Allelfrequenzen BM1818

Allellänge	Frequenz
235	0,089
237	0,116
239	0,107
241	0,089
243	0,438
246	0,161

Tab. 29: Genotypen BM1818

Genotyp	Anzahl
243243	16
243246	6
239246	5
235243	4
237243	4
235239	3
241241	3

Genotyp	Anzahl
237246	3
237239	2
239243	2
235237	1
237237	1
235241	1
237241	1

Genotyp	Anzahl
241243	1
235246	1
241246	1
246246	1
235235	0
239239	0
239241	0

Der Datenbankeintrag des Mikrosatellit BM1818 (Acc. No. G18391) bezieht sich auf die Kuh und weist hier eine reine (GT)-Tandemwiederholung auf. Die Sequenz der Hirschprobe zeigt eine durch eine Punktmutation unterbrochene (GT)-Tandemwiederholung. Sie unterscheidet sich zum Datenbankeintrag durch 16 Punktmutationen, zwei Deletionen mit insgesamt 14 Basen und eine Insertion (Abb. 17).

Abb. 17: Einzelsequenzen BM1818

Mikrosatellit BM1818, interne Nr. 14 (Datenbank: gi 1222848 gb G18391.1 G18391; Cow)	
G18391	AGCTGGGAATATAACCAAAGGAACTAAACATGCACTGAAAAAGATACCTGCAC
BM1818_105_52_243	<b>AGCTGGGAATATAACCAAAGG</b> AAACtaaaAC <b>CT</b> CAC <b>CCA</b> ----GATACCTGCAC
G18391	CCCTATGTTTCATAGCAGCATTATTTATACTAGCCAAGCAAGCCATGGAAACCGCA
BM1818_105_52_243	CCCTATGTTTCATAG <b>A</b> AGCATTATTTATA <b>A</b> TAG <b>A</b> CAAGCAAGCCATGGAAAC <b>AAC</b> -
G18391	CCTAAGTTATCTCCATTCATCAAGGGATGAATGGAGAAATT (GT) 4 GT (GT) 9
BM1818_105_52_243	-----CT <b>GTGT</b> <b>C</b> CATCA <b>A</b> TGGATGAATGGAGAAATT (GT) 4 <b>A</b> T (GT) 9
G18391	ATGATGGAATATTATTTAGTCATAAAA-TGAGGAAATCCTTCCATTTGTGATAAC
BM1818_105_52_243	<b>G</b> TGATGGAATATTATTTAGTCATAAAA <b>A</b> TGAGG <b>C</b> AATCCTTCCATTTGTGATAAC
G18391	ATGCATGGACCTTGAAAGCACTATGCTACGTGAAGTAACTCAGAGAAAAAA
BM1818_105_52_243	AT <b>GCATGGACCTTGAAAGCACT</b>

Probenbezeichnung: Mikrosatellit\_Probennummer\_Hirschnummer\_Allellänge in bp

**blaue Schriftzeichen**= Primerregion; **rote Schriftzeichen**= differierende Basen

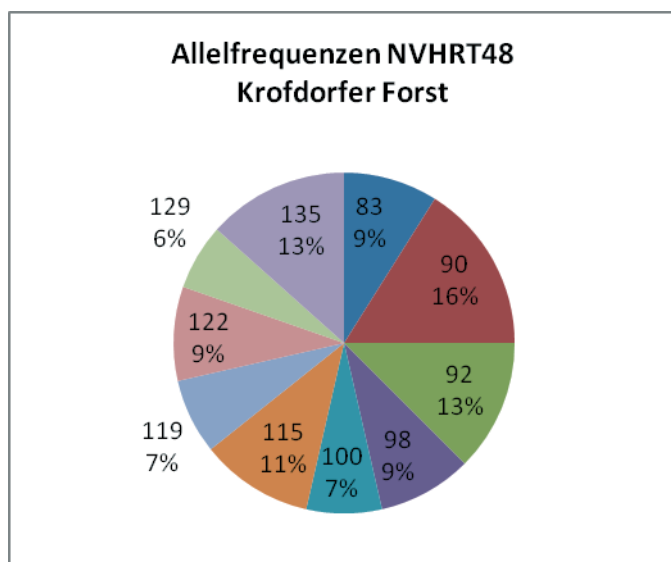
Bei dem Mikrosatelliten BM1818 kommt das Allel mit 243 bp zwar am häufigsten vor, die Häufigkeit der restlichen Allele ist aber annähernd gleich groß. Es wurden fast alle möglichen Genotypvarianten (86 %) gefunden. Eine mögliche Ursache für diesen Effekt ist die Zuwanderung eines genetisch nicht verwandten Hirsches. Interessant wäre hier der Vergleich mit historischen Proben, um zu überprüfen, ob in jüngerer Vergangenheit neue Allele hinzu kamen.



#### 4.2.6 NVHRT48

Es wurden zehn Allele bei dem Mikrosatelliten NVHRT48 gefunden (Abb. 18 und Tab. 30). Bei zehn Allelen sind 55 verschiedene Genotypen möglich. Bei den 56 untersuchten Hirschen wurden 36 Genotypen gefunden (Tab. 31).

Abb. 18: Allelfrequenzen NVHRT48



Tab. 30: Allelfrequenzen NVHRT48

Allellänge	Frequenz
83	0,089
90	0,161
92	0,125
98	0,089
100	0,071
115	0,107
119	0,071
122	0,089
129	0,063
135	0,134

Tab. 31: Genotypen NVHRT48

Genotyp	Anzahl
9090	3
90100	3
92122	3
100135	3
8390	2
9092	2
9292	2
8398	2
83115	2
90115	2
98122	2
115122	2

Genotyp	Anzahl
92129	2
98135	2
115135	2
119135	2
8383	1
9098	1
92115	1
98115	1
115115	1
90119	1
92119	1
98119	1

Genotyp	Anzahl
100119	1
119119	1
83122	1
100122	1
83129	1
98129	1
129129	1
90135	1
92135	1
122135	1
129135	1
135135	1

Der Mikrosatellit NVHRT48 ist gemäß Datenbankeintrag (Acc. No. AF068214) ein Mikrosatellit mit unterbrochener (GT)-Tandemwiederholung. Die untersuchte Probe weist eine Sequenz mit einer reinen (GT)-Tandemwiederholung auf. Sie unterscheidet sich zum Datenbankeintrag durch eine Punktmutation und zwei Deletionen von einer Base und zwei Basen Länge (Abb. 19).

Abb. 19: Einzelsequenzen NVHRT48

Mikrosatellit NVHRT48, interne Nr. 22 (Datenbank: gi 3212066 gb AF068214.1 AF068; Cervus)	
AF068214	CGTGAATCTTAACCAGGTCTCATGTGTATGTA (TG) 6 TA (TG) 12 TATT
<b>NVHRT48</b> _172_108	<i>CGTGAATCTTAACCAGGTCT</i> cAtgtGTATGTa (TG) 6 <u>T</u> G (TG) 12 T <u>---</u> T
AF0682141	GAGACAAAAAATCTATTGTTTCTAAATGAAGCTGACCA
<b>NVHRT48</b> _172_108	GANACAAAAA <u>-</u> Tcatt <i>GTTTCTAAATGAAGCTGACC-</i>

Probenbezeichnung: Mikrosatellit\_Probennummer\_ Allellänge in bp

*blaue Schriftzeichen*= Primerregion; *rote Schriftzeichen*= differierende Basen

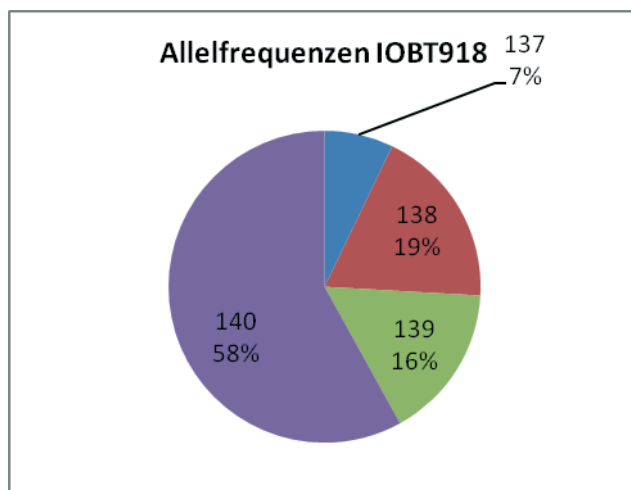
Bei dem Mikrosatellit NVHRT48 sind die zehn Allele in ihrer Häufigkeit fast annähernd gleich verteilt. Es gibt auch keinen vorherrschenden Genotypen. An diesem Genort liegt eine hohe genetische Vielfalt ohne Drift vor.

#### 4.2.7 IOBT918

Bei dem Mikrosatellit IOBT918 muss die Hypothese eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes mit einer statistischen Signifikanz von  $p < 0,05$  abgelehnt werden.

Es wurden vier Allele bei dem Mikrosatelliten IOBT918 gefunden (Abb. 20 und Tab. 32). Von den maximal möglichen zehn unterschiedlichen Genotypen wurden acht Genotypen gefunden (Tab. 33).

Abb. 20: Allelfrequenzen IOBT918



Tab. 32: Allelfrequenzen IOBT918

Allellänge	Frequenz
137	0,071
138	0,188
139	0,161
140	0,580

Tab. 33: Genotypen IOBT918

Genotyp	Anzahl
140140	19
138140	16
139140	11
137139	5
138138	2

Genotyp	Anzahl
137137	1
137138	1
139139	1
138139	0
137140	0

Die Datenbank weist den Mikrosatelliten IOBT918 (Acc. No. AF232753) als zusammengesetzt/unterbrochenen Mikrosatelliten mit (TG)- und (AG)-Wiederholungen aus. Durch Punktmutationen ist die Sequenz der untersuchten Probe mehrmals unterbrochen. Es kommen (TG)- und (AG)-Wiederholungen vor. Insgesamt unterscheidet sich die sequenzierte Probe vom Datenbankeintrag durch sieben Punktmutationen, eine Deletion von zwei Basen, eine Einzelinsertion und eine Insertion von vier Basen (Abb. 21).

Abb. 21: Einzelsequenzen IOBT918

Mikrosatellit IOBT918, interne Nr. 15 (Datenbank: gi 7621430 gb AF232753.1 ; Cervus)	
AF232753	ACTTATGAAAAATTACTGAGAGCGGCCGA (GT) 5 GTGTGTGAGACAG (AG) 6
<b>IOBT918</b> _118_62_140	<b>ACTTATGAAAAATTACTGAGAGCGGCCGA</b> (GT) 5 <b>A</b> TGTGTG <b>TGT</b> --G (AG) 6
AF232753	(TG) 4 TGTGTGAGGGTGTGCGGGGGCGAGGG-CGAGGGTCCC----GGCTGC
<b>IOBT918</b> _118_62_140	(TG) 4 <b>T</b> TGTGTGAGGGTGTGCGGGGG <b>A</b> CGAGGG <b>G</b> CGAGGGT <b>G</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>C</b> GGCTGC
AF232753	TCAGAGGCGACAGGAGTAGTAA
<b>IOBT918</b> _118_62_140	<b>TCAGAGGCGACAGGAGTAGTAA</b>

Probenbezeichnung: Mikrosatellit\_Probennummer\_Hirschnummer\_Allellänge in bp

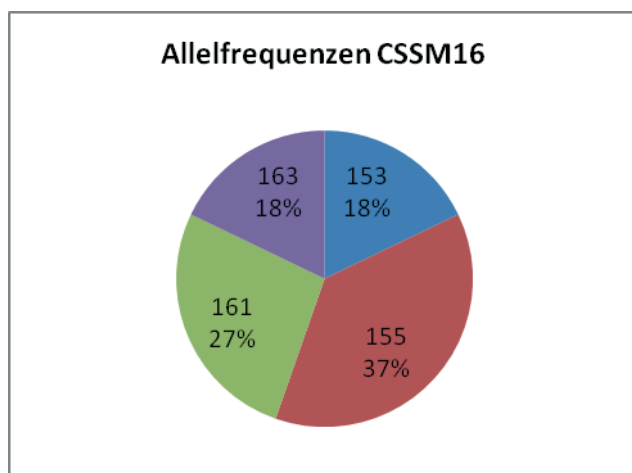
*blaue Schriftzeichen*= Primerregion; *rote Schriftzeichen*= differierende Basen

Auch der Mikrosatellit IOBT918 weist eine Drift auf. Das Hauptallel mit 140 Basenpaaren Länge kommt in 46 der 56 untersuchten Hirsche vor (82 %), in 19 der 56 Hirsche (34 %) reinerbig.

#### 4.2.8 CSSM16

Es wurden vier Allele bei dem Mikrosatelliten CSSM16 (Abb. 22 und Tab. 34) und alle zehn möglichen Genotypen (Tab. 35) gefunden.

Abb. 22: Allelfrequenzen CSSM16



Tab. 34: Allelfrequenzen CSSM16

Allellänge	Frequenz
153	0,179
155	0,375
161	0,268
163	0,179

Tab.35: Genotypen CSSM16

Genotyp	Anzahl
155163	14
155161	11
153161	10
153155	7
155155	5
161161	3
161163	3
153153	1
153163	1
163163	1

Der Mikrosatellit CSSM16 (Acc. No. AF232760) hat eine unterbrochene (GT)-Tandemwiederholung. Von diesem Mikrosatelliten wurden zwei Proben sequenziert. Eine Sequenz ist identisch zum Datenbankeintrag, die andere Sequenz unterscheidet sich nur durch die Anzahl der Tandemwiederholungen (Abb. 23).

Abb. 23: Einzelsequenzen CSSM16

Mikrosatellit CSSM16, interne Nr. 2 (Datenbank: gi 7621437 gb AF232760.1 ; Cervus)	
AF232760	AGAGCCACTTGTTACACCCCAAAGCAGGAAGTGCCATCCTAGTAGTTTCTACT
<b>CSSM16_133_83_155</b>	<b>AGAGCCACTTGTTACACCCCAAAG</b> CAGGAAGTGCCATCCTAGTAGTTTCTACT
<b>CSSM16_158_70_163</b>	<b>AGAGCCACTTGTTACACCCCAAAG</b> CAGGAAGTGCCATCCTAGTAGTTTCTACT
AF232760	AGGGGAGACAGGTA (GT) 4 GC (GT) 7 TGGGGGGTG (CA) 5 TGCGTGCACA
<b>CSSM16_133_83_155</b>	AGGGGAGACAGGTA (GT) 4 GC (GT) 7 TGGGGGGTG (CA) 5 TGCGTGCACA
<b>CSSM16_158_70_163</b>	AGGGGAGACAGGTA (GT) <u>8</u> GC (GT) 7 TGGGGGGTG (CA) 5 TGCGTGCACA
AF232760	TTTGCCTGACATTTGAATCAAGTGGAGACTGCATC
<b>CSSM16_133_83_155</b>	TTTGCCTGACA <b>TTTGAATCAAGTGGAGACTGCATC</b>
<b>CSSM16_158_70_163</b>	TTTGCCTGACA <b>TTTGAATCAAGTGGAGACTGCATC</b>

Probenbezeichnung: Mikrosatellit\_Probennummer\_Hirschnummer\_Allellänge in bp

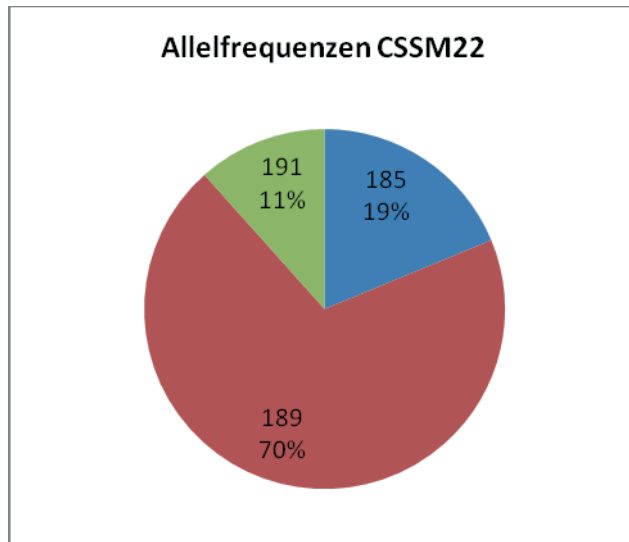
**blaue Schriftzeichen**= Primerregion; **rote Schriftzeichen**= differierende Basen

Die Allele sind im Hinblick auf eine hohe genetische Vielfalt günstig verteilt. Auch kommen alle möglichen Allelkombinationen vor.

#### 4.2.9 CSSM22

Es wurden drei Allele (Abb. 24 und Tab. 36) und alle sechs möglichen Genotypen bei dem Mikrosatelliten CSSM22 gefunden (Tab. 37).

Abb. 24: Allelfrequenzen CSSM22



Tab. 36: Allelfrequenzen CSSM22

Allellänge	Frequenz
185	0,188
189	0,696
191	0,116

Tab. 37: Genotypen CSSM22

Genotyp	Anzahl
189189	29
185189	13
189191	7
185185	3
185191	2
191191	2

Der Mikrosatellit CSSM22 ist gemäß Datenbankeintrag (Acc. No. AF232762) ein Mikrosatellit mit einer reinen (CA)-Tandemwiederholung. Die sequenzierte Probe unterscheidet sich zum Datenbankeintrag durch eine Deletion und die Anzahl der Tandemwiederholungen (Abb. 25).

Abb. 25: Einzelsequenzen CSSM22

Mikrosatellit CSSM22, interne Nr. 9 (Datenbank: gi 7621439 gb AF232762.1 ; Cervus)	
AF232762	TCTCTCTAATGGAGTTGGTTTTTGTTAACAACCTGGGCCCTGTGGATCC
<b>CSSM22_134_83_189</b>	<b><i>TCTCTCTAATGGAGTTGGTTTTG</i></b> TTAACAACCTGGGCCCTGTGGATCC
AF232762	CCAAACTTTTACTTTTCAGGATTTGTGCCTAAACCTAAAA (CA) 9 AT
<b>CSSM22_134_83_189</b>	CCAAACTTTTACTTTTCAGGATTTGTGCCTAAACCTAAAA (CA) <u>10</u> AT
AF232762	AGTGTCATCTGGCATGTTCCAAATCCTCCACAGAATCTTGACTGTTTTTC
<b>CSSM22_134_83_189</b>	AGTGTCATCTGGCATGTTCCAAATCCTCC <u>-</u> CAGAATCTTGACTGTTTTTC
AF232762	TAAAAAGATGAGGATTGATTGAAGAGAAAGAATTC
<b>CSSM22_134_83_189</b>	TAAAAA <b><i>GATGAGGATTGATTGAAGAGAAAG</i></b>

Probenbezeichnung: Mikrosatellit\_Probennummer\_Hirschnummer\_Allellänge in bp

**blaue Schriftzeichen**= Primerregion; **rote Schriftzeichen**= differierende Basen

Bei drei Allelen ist die Aussagekraft des Mikrosatelliten CSSM22 eher gering zu bewerten. Das Allel mit 189 Basenpaaren Länge ist das Hauptallel. 29 der 56 Hirsche tragen dieses Allel reinerbig. Der Mikrosatellit weist eine Drift auf.

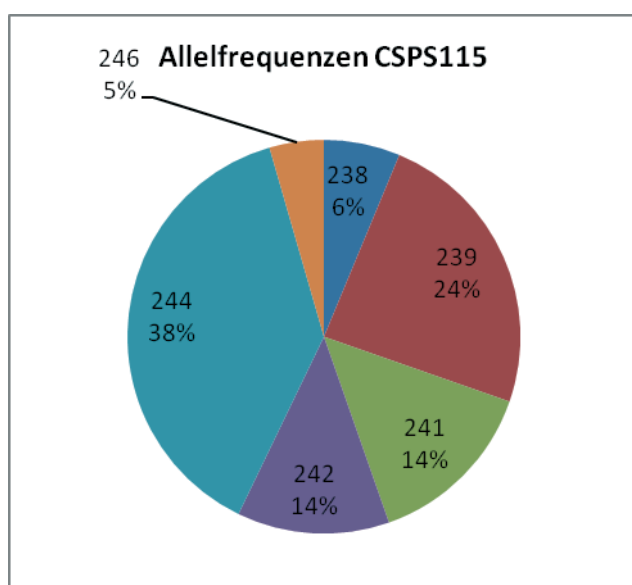


#### 4.2.10 CSPA115

Der Mikrosatellit CSPA115 erfüllt nicht die Kriterien des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes. ( $p < 0,05$ ).

Es wurden sechs Allele bei dem Mikrosatelliten CSPA115 gefunden (Abb. 26 und Tab. 38). Von maximal 21 möglichen Genotypen wurden 16 Genotypen gefunden (Tab. 39).

Abb. 26: Allelfrequenzen CSPA115



Tab. 38 Allelfrequenzen CSPA115

Allellänge	Frequenz
238	0,063
239	0,241
241	0,143
242	0,125
244	0,384
246	0,045

Tab. 39: Genotypen CSPA115

Genotyp	Anzahl
239244	12
244244	11
239242	6
239241	4
241241	4
241244	4
242242	3

Genotyp	Anzahl
238244	3
239239	2
238238	1
238242	1
242244	1
238246	1
239246	1

Genotyp	Anzahl
244246	1
246246	1
238239	0
238241	0
241242	0
241246	0
242246	0

Der Mikrosatellit CSPS115 (Acc. No. AY006388) hat gemäß Datenbank unterbrochene (CA)-Tandemwiederholungen. Zwei sequenzierte Proben konnten nur teilweise ausgewertet werden. Im Vergleich zum Datenbankeintrag unterscheidet sich die erste Probe durch neun Deletionen und vier Punktmutationen. Die zweite Probe unterscheidet sich durch acht Deletionen, eine Insertion und acht Punktmutationen. Im Vergleich der beiden Teilsequenzen ergeben sich ebenfalls Unterschiede. Es handelt sich hierbei um vier Punktmutationen, drei Insertionen und eine Deletion (Abb. 27).

Abb. 27: Einzelsequenzen CSPS115

Mikrosatellit CSPS115, interne Nr. 8 (Datenbank: gi 11245773 gb AY006388.1 ; Cervus)	
AY006388	<b>AAAGTGACACAACAGCTTCTC</b> CAGGACACACAGCCAAACTA (CA) 7 TACACG
<b>CSPS115_186_Tseq138</b>	(CA) 6 TACACG
<b>CSPS115_126_Tseq139</b>	(CA) 7 TAcACG
AY006388	CACACACATCTCATTCCTCTAGTGCTTTTGCC-TTTAAAGAAAANNNNNNNA
<b>CSPS115_186_Tseq138</b>	CACACACATCTCATTCCTCTAGTGCTTTTGCC-TTTAAA- <u>AAAA</u> -----AAA
<b>CSPS115_126_Tseq139</b>	<u>C</u> GCaCACATCTC <u>t</u> cTCCTcTaGtGT <u>G</u> TTTTGcC <u>c</u> tTtAAA <u>A</u> AAAA-----AAA
AY006388	AAACACTAAGCAGATCAACATAAAATCTCCTTTTTGTAGATTTATAGAAAGGG
<b>CSPS115_186_Tseq138</b>	AAA- <u>ACT</u> AAGCAGATCAACAT <u>GGG</u> AtCTCCTTTTTGTAGATTTATAGAAAGGG
<b>CSPS115_126_Tseq139</b>	AAA- <u>ACT</u> AAGCAGATCAACAT <u>GGG</u> ATCTCCTTTTTGTAGATTTATAGAAAGGG
AY006388	TTCCTTTGTTACGCACTCACTTGTAAGAAAATAAGACAAAAACGTAAAACC
<b>CSPS115_186_Tseq138</b>	TTCCTTTGTT <u>G</u> CGCACTCACT- <u>GT</u>
<b>CSPS115_126_Tseq139</b>	TTCCTT- <u>GTT</u> <u>G</u> CGCACTCACT- <u>gt</u>
AY006388	<b>CACAGACCAACTAGGACACTCGTT</b>

Probenbezeichnung: Mikrosatellit\_Probennummer\_ Allellänge der Teilsequenzen in bp

**blaue Schriftzeichen**= Primerregion; **rote Schriftzeichen**= differierende Basen

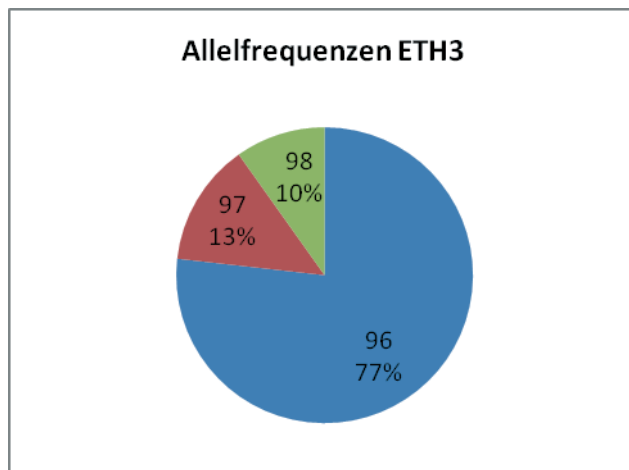
Auch der Mikrosatellit CSPA115 weist eine moderate Drift auf. Auffallend sind hier zwei Gruppen von Allelen. Eine Gruppe mit gerader Anzahl an Basenpaaren und eine Gruppe mit ungerader Anzahl an Basenpaaren, jeweils im Abstand von zwei Basen Länge. Leider geben die Einzelsequenzierungen keinen Aufschluss darüber, ob es sich hierbei um eine Deletion, beziehungsweise eine Insertion innerhalb oder außerhalb des Mikrosatelliten handelt.

#### 4.2.11 ETH3

Der Mikrosatellit ETH3 zeigt eine statistisch hoch signifikante Abweichung ( $p < 0,01$ ) vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Es wurden drei Allele bei dem Mikrosatelliten ETH3 gefunden (Abb. 28 und Tab. 40). Bei drei Allelen sind maximal sechs verschiedene Genotypen möglich. Alle möglichen Genotypen wurden gefunden (Tab. 41).

Abb. 28: Allelfrequenzen ETH3



Tab. 40: Allelfrequenzen ETH3

Allellänge	Frequenz
96	0,768
97	0,134
98	0,098

Tab. 41: Genotypen ETH3

Genotyp	Anzahl
9696	38
9697	7
9797	3
9698	3
9898	3
9798	2

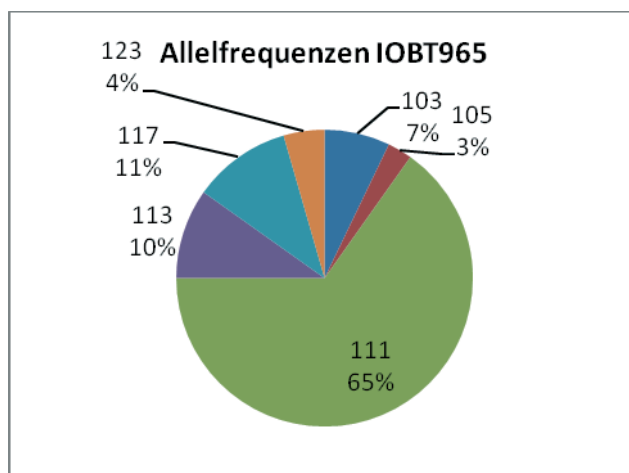
Die Einzelsequenzierung der ETH3-Mikrosatellitenprobe war fehlerhaft und ergab keine auswertbaren Sequenzen.

Die Aussagekraft des Mikrosatelliten ETH3 ist mit drei Allelen sehr gering. Das Allel mit 96 Basen Länge kommt im Genom von 48 der 56 Hirsche vor (86 %). Dieser Mikrosatellit weist eine Drift auf.

#### 4.2.12 IOBT965

Es wurden sechs Allele bei dem Mikrosatelliten IOBT965 gefunden (Abb. 29 und Tab. 42). Einundzwanzig unterschiedliche Genotypen sind bei sechs Allelen maximal möglich. Zehn Genotypen wurden gefunden (Tab. 43).

Abb. 29: Allelfrequenzen IOBT965



Tab. 42: Allelfrequenzen IOBT965

Allellänge	Frequenz
<b>103</b>	0,071
<b>105</b>	0,027
<b>111</b>	0,652
<b>113</b>	0,098
<b>117</b>	0,107
<b>123</b>	0,045

Tab. 43: Genotypen IOBT965

Genotyp	Anzahl
111111	21
111117	9
103111	7
111113	7
111123	5
105111	3
103113	1

Genotyp	Anzahl
113113	1
113117	1
117117	1
103103	0
103105	0
105105	0
105113	0

Genotyp	Anzahl
103117	0
105117	0
103123	0
105123	0
113123	0
117123	0
123123	0

(GT)-Tandemwiederholungen sind das Merkmal des Mikrosatelliten IOBT965 (Acc. No. AF232754). Die sequenzierte Probe unterscheidet sich durch eine Deletion und durch die Anzahl der Wiederholungen vom Datenbankeintrag (Abb. 30).

Abb. 30: Einzelsequenzen IOBT965

Mikrosatellit IOBT965, interne Nr. 1 (Datenbank: gi 7621431 gb AF232754.1 ; Cervus)	
AF232754	GGGGTTGTGGGTAAGCGGAGTTAAAAAAGCATGTCCATATTTCTATA
<b>IOBT965</b> _102_100_111	<b>GGGGTTGTGGGTAAGCGGAGTT</b> AAAAAAGCATGTCCATATTTCTATA
AF232754	TAT (GT) 12 ATTTGTATATGACACGTCTGTCTGGCGCTAGATCT
<b>IOBT965</b> _102_100_111	TAT (GT) <u>13</u> ATTTGTAT <b>ATGACACGTCTGTCTGGCGCTAGATC</b>

Probenbezeichnung: Mikrosatellit\_Probennummer\_Hirschnummer\_Allellänge in bp

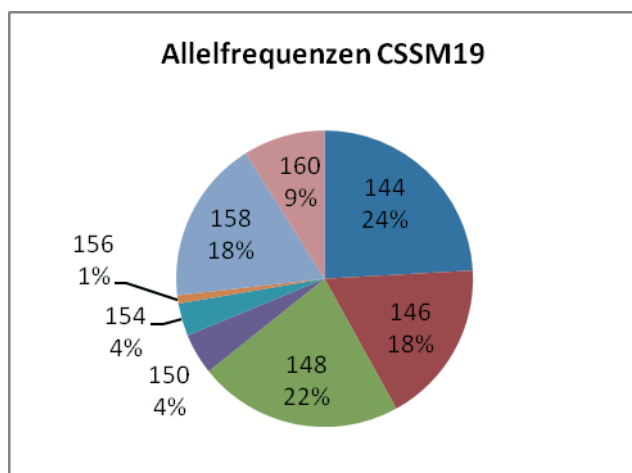
**blaue Schriftzeichen**= Primerregion; **rote Schriftzeichen**= differierende Basen

Auch der Mikrosatellit IOBT965 weist eine Drift zu dem Allel mit 111 Basen Länge auf. Dieses Allel kommt im Genom von 52 der 56 untersuchten Hirsche vor. Auch die geringe Anzahl unterschiedlicher Genotypen ist ein Hinweis auf eine bereits fortgeschrittene Drift.

### 4.2.13 CSSM19

Es wurden acht Allele bei dem Mikrosatelliten CSSM19 gefunden (Abb. 31 und Tab. 44). In dieser Untersuchung wurden 21 von 36 möglichen Genotypen gefunden (Tab. 45).

Abb. 31: Allelfrequenzen CSSM19



Tab. 44: Allelfrequenzen CSSM19

Allellänge	Frequenz
144	0,241
146	0,179
148	0,223
150	0,045
154	0,036
156	0,009
158	0,179
160	0,089

Tab. 45: Genotypen CSSM19

Genotyp	Anzahl
144148	9
146158	7
148158	5
146148	4
144158	4
144146	3
144150	3
144144	2
146146	2
148148	2
144154	2
144160	2

Genotyp	Anzahl
146160	2
158160	2
148150	1
148154	1
150158	1
154158	1
148160	1
156160	1
160160	1
146150	0
150150	0
146154	0

Genotyp	Anzahl
150154	0
154154	0
144156	0
146156	0
148156	0
150156	0
154156	0
156156	0
156158	0
158158	0
150160	0
154160	0

Im Datenbankeintrag wird der Mikrosatellit CSSM19 (Acc. No. AF232761) mit unterbrochener (GT)-Tandemwiederholung beschrieben. Durch zwei Insertionen ist die sequenzierte Probe ein reiner Mikrosatellit. Desweiteren weist die untersuchte Probe zum Datenbankeintrag eine Punktmutation auf (Abb. 32).

Abb. 32: Einzelsequenzen CSSM19

Mikrosatellit CSSM19, interne Nr. 12 (Datenbank: gi 7621438 gb AF232761.1 ; Cervus)	
AF232761	TTGTCAGCAACTTCTTGTATCTTTATGATAATTAATCACTGT (GT) 4 -TGT
<b>CSSM19_196_68_148</b>	<b>TTGTCAGCAACTTCTTGTATCTTT</b> ATGATAATTAATCACT <u>C</u> T (GT) 4 <u>G</u> TGT
AF232761	---T (GT) 6 ATGTGTATCTCAGACCCTGTGTTAGTTTCCCAGGGCTGCCAT
<b>CSSM19_196_68_148</b>	<u>GTG</u> T (GT) 6 ATGTGTATCTCAGACCCTGTGTTAGTTTCCCAGGGCTGCCAT
AF232761	AACAAAGTATCACAAATAATTGGGTGGCTTAAAACA
<b>CSSM19_196_68_148</b>	AACAAAGTATCA <b>CAAATAATTGGGTGGCTTAAAACA</b>

Probenbezeichnung: Mikrosatellit\_Probennummer\_Hirschnummer\_Allellänge in bp

*blaue Schriftzeichen*= Primerregion; *rote Schriftzeichen*= differierende Basen

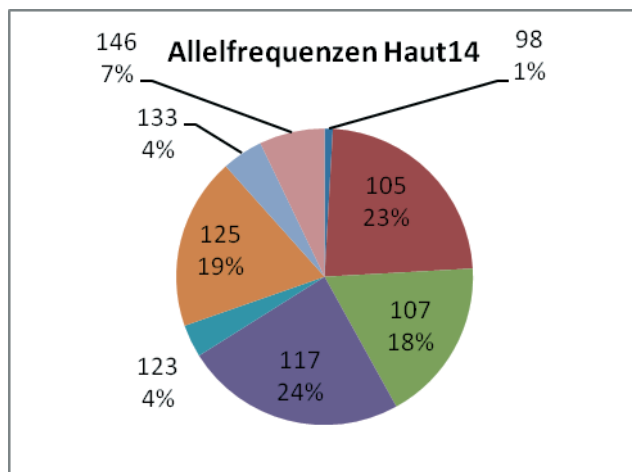
Die Frequenzen der Allele und die Verteilung der Genotypenanzahl weisen bei dem Mikrosatelliten CSSM19 auf eine beginnende bis moderate Drift hin.



#### 4.2.14 Haut14

Es wurden acht Allele bei dem Mikrosatelliten Haut14 gefunden (Abb. 33 und Tab. 46). Von den 36 möglichen Genotypen wurden 18 Genotypen gefunden (Tab. 47).

Abb. 33: Allelfrequenzen Haut14



Tab. 46 Allelfrequenzen Haut14

Allellänge	Frequenz
98	0,009
105	0,232
107	0,179
117	0,241
123	0,036
125	0,188
133	0,045
146	0,071

Tab. 47: Genotypen Haut14

Genotyp	Anzahl
107117	6
117125	6
105105	4
105107	4
105117	4
117117	4
105125	4
107107	3
107125	3
123125	3
105133	3
105146	3

Genotyp	Anzahl
117146	3
125146	2
98123	1
125125	1
107133	1
125133	1
9898	0
98105	0
98107	0
98117	0
105123	0
107123	0

Genotyp	Anzahl
117123	0
123123	0
98125	0
98133	0
117133	0
123133	0
133133	0
98146	0
107146	0
123146	0
133146	0
146146	0

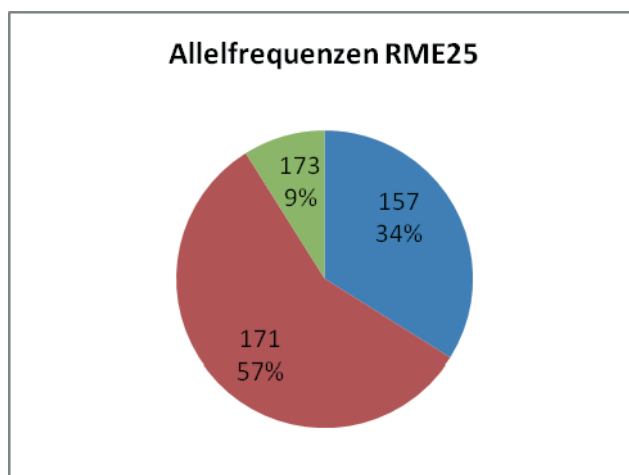
Die Einzelsequenzierung der Haut14-Mikrosatellitenprobe war fehlerhaft und ergab keine auswertbaren Sequenzen.

Vier der acht vorkommenden Allele bei dem Mikrosatellit Haut14 haben zusammen eine Frequenz von 84 %. Jedoch kann man von diesen vier Allelen keines als dominant bewerten. Von der maximal möglichen Genotypanzahl wurde nur die Hälfte gefunden. Diese Ergebnisse können auf eine beginnende Drift hindeuten.

#### 4.2.15 RME25

Es wurden drei Allele bei dem Mikrosatelliten RME25 gefunden (Abb. 34 und Tab. 48). Von den sechs möglichen Genotypen wurden fünf Genotypen gefunden (Tab. 49).

Abb. 34: Allelfrequenzen RME25



Tab. 48: Allelfrequenzen RME25

Allellänge	Frequenz
157	0,339
171	0,571
173	0,089

Tab. 49: Genotypen RME25

Genotyp	Anzahl
157171	25
171171	15
171173	9
157157	6
157173	1
173173	0

Die Mikrosatellitensequenz RME25 liegt als Datenbankeintrag (Acc. No. U15434) nur vom Hausrind vor. Hierbei handelt es sich um reine (GT)-Tandemwiederholungen. Die sequenzierte Hirschprobe zeigt hier mehrfach unterbrochene (GT)-Tandemwiederholungen. Die Sequenzen unterscheiden sich in insgesamt neun Punktmutationen, einer Insertion mit einer Base, einer Insertion von drei Basen und der Anzahl der (GT)-Tandemwiederholungen (Abb. 35).

Abb. 35: Einzelsequenzen RME25

Mikrosatellit RME25, interne Nr. 4 (Datenbank: gi 557080 gb U15434.1 BTU15434; Bos taurus)	
U15434	TTAAAGATCCCAGCCTGTGCGCCACACCTAAGACCTGTGC (GT) 14-- --
<b>RME25_142_59_171</b>	<b>TTAAAGATCCCAGCCTGTGCGCC</b> <u>GCA</u> <u>A</u> CTAAGACCTGTG <u>T</u> (GT) <u>6</u> <u>CT</u> (GT) <u>6</u>
U15434	----- -- -- -- -- --GGTCACTCAGTCGTGTCTGACTC
<b>RME25_142_59_171</b>	<u>A</u> TGT <u>T</u> (GT) <u>6</u> <u>CT</u> (GT) <u>3</u> <u>T</u> T (GT) <u>4</u> <u>TCA</u> GTCACCTCAGTCGTGTCTGACTC
U15434	TTTGTGACC-ATAGACTCTAGCCCACCAGGCTCCTTTACCCACTGAGTTTTC
<b>RME25_142_59_171</b>	TTTGTGACC <u>C</u> ATAGACT <u>G</u> TAGCCC <b>ACCAGGCTCCTTTACCCACT</b>

Probenbezeichnung: Mikrosatellit\_Probennummer\_Hirschnummer\_Allellänge in bp

**blaue Schriftzeichen**= Primerregion; **rote Schriftzeichen**= differierende Basen

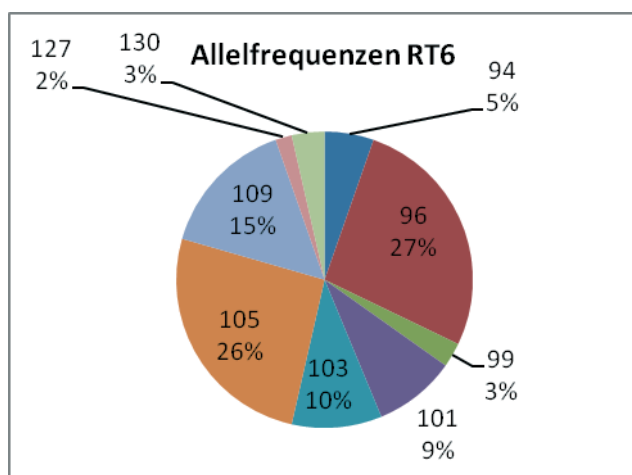
Mit drei Allelen ist der Mikrosatellit RME25 wenig aussagekräftig. Positiv zu bewerten ist bei diesem Mikrosatelliten, dass das Allel mit der höchsten Frequenz nur in 15 der 56 untersuchten Hirsche reinerbig vorliegt. Die Drift, die man aufgrund der Frequenzwerte erkennen kann, ist somit eher als moderat einzustufen.

#### 4.2.16 RT6

Auch der Mikrosatellit RT6 erfüllt nicht die Kriterien der Hypothese des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes ( $p < 0,01$ ).

Es wurden neun Allele bei dem Mikrosatelliten RT6 gefunden (Abb. 36 und Tab. 50). Mit neun Allelen ergeben sich maximal 45 mögliche Genotypen. 22 Genotypen wurden in dieser Untersuchung gefunden (Tab. 51).

Abb. 36: Allelfrequenzen RT6



Tab. 50: Allelfrequenzen RT6

Allellänge	Frequenz
94	0,054
96	0,268
99	0,027
101	0,089
103	0,098
105	0,259
109	0,152
127	0,018
130	0,036

Tab. 51: Genotypen RT6

Genotyp	Anzahl
96105	10
105109	6
9696	5
94101	4
105105	4
96101	3
96103	3
109109	3

Genotyp	Anzahl
94103	2
101105	2
96109	2
105130	2
9699	1
9999	1
101103	1
103103	1

Genotyp	Anzahl
103105	1
103109	1
96127	1
109127	1
103130	1
109130	1

Der Mikrosatellit RT6 wird in der Datenbank (Acc. No. U90739) als reine (GT)-Tandemwiederholung geführt. Die sequenzierte Probe hat eine Punktmutation in der Wiederholungseinheit, sodass dies zu einer unterbrochenen (GT)-Tandemwiederholung führt. Zusätzlich hat die sequenzierte Probe noch eine Deletion und weist eine Punktmutation an Position 11 des Reverseprimers auf (Abb. 37).

Abb. 37: Einzelsequenzen RT6

Mikrosatellit RT6, interne Nr. 21 (Datenbank: gi 1906618 gb U90739.1 RTU9073; Cervus)	
U90739.1	GACATTAAGTGGGAAGTCTGTCTAATGTCGGATTTTGAGACTGTTAC
<b>RT6_238_104_105</b>	<i>CGGATTTTGA</i> <b>A</b> <i>CTGTTAC</i>
U90739.1	CA (GT) 6 GT (GT) 15 GAGCAAGAGTAAGACTGCCCCCTGCCAGCCT
<b>RT6_238_104_105</b>	CA (GT) 6 <u>GG</u> (GT) <u>10</u> GAGCA- <u>G</u> AGTAAGACTGCCCCCTGCCAGCCT
U90739.1	CCAAGAATGAGTAAGAGGAATCACTCTGCCCACAAACATTGCTGGA
<b>RT6_238_104_105</b>	<i>CCAAGAATGAGTAAGAGGAA</i>

Probenbezeichnung: Mikrosatellit\_Probennummer\_Hirschnummer\_Allellänge in bp

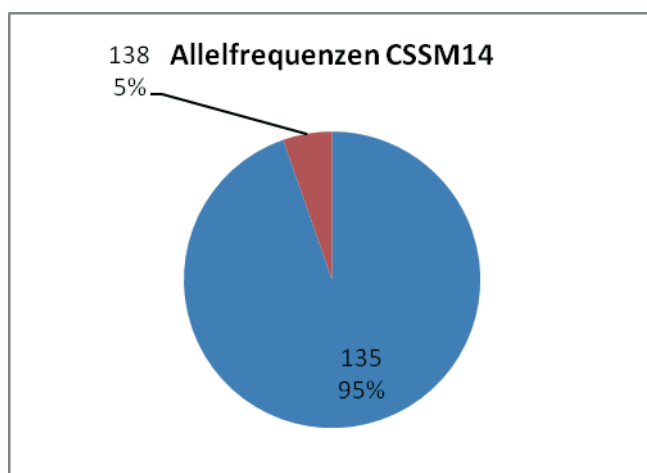
*blaue Schriftzeichen*= Primerregion; rote Schriftzeichen= differierende Basen

Die ermittelten Allele des Mikrosatelliten RT6 zeigen ein inhomogenes Bild. Die Länge der Allele reicht von 94 bis 130 Basenpaaren. Für den genetischen Reichtum positiv zu bewerten ist, dass nur 14 der 56 untersuchten Hirsche homozygot mit diesem Mikrosatelliten sind.

#### 4.2.17 CSSM14

Es wurden zwei Allele bei dem Mikrosatelliten CSSM14 gefunden (Abb. 38 und Tab. 52). Von den drei möglichen Genotypen wurden nur zwei Genotypen gefunden (Tab. 53).

Abb. 38: Allelfrequenzen CSSM14



Tab. 52: Allelfrequenzen CSSM14

Allellänge	Frequenz
135	0,946
138	0,054

Tab. 53: Genotypen CSSM14

Genotyp	Anzahl
135135	50
135138	6
138138	0

Der Mikrosatellit CSSM14 (Acc. No. AF232759) hat reine (GT)-Tandemwiederholungen. Die sequenzierte Probe konnte nur teilweise ausgewertet werden. Sie unterscheidet sich durch eine Punktmutation vom Datenbankeintrag (Abb. 39).

Abb. 39: Einzelsequenzen CSSM14

Mikrosatellit CSSM14, interne Nr. 17 (Datenbank: gi|7621436|gb|AF232759.1|; Cervus)

AF232759 TGACCTCTCAATGGAAGCTTGGCTAACAGAAGAGAAGCCTCAGTGAAAATA

**CSSM14\_108\_52\_Tseq70** ACATTCATTACTTTGTT

AF232759 GAT (GT) 9 ATATGTATGTGGAATATATGAATCCTATTAAGTGCCAGAATT

**CSSM14\_108\_52\_Tseq70** GAT (GT) 9 ACATGTATGTGGAATATATGAATCCTATTAAGTGCCAGAATTC

Probenbezeichnung: Mikrosatellit\_Probennummer\_Hirschnummer\_Allellänge der Teilsequenzen in bp

blaue Schriftzeichen= Primerregion; rote Schriftzeichen= differierende Basen

Mit nur zwei Allelen ist der Mikrosatelliten CSSM14 in der Bewertung zu vernachlässigen.

### 4.3 Populationsgenetische Ergebnisse

Insgesamt wurden 56 Hirsche mit Hilfe von 17 Mikrosatelliten untersucht. Von 38 Hirschen standen die Geweihe, von drei Hirschen die Geweihe und Abwurfstangen, und von 15 Hirschen Abwurfstangen als Probenmaterial zur Verfügung.

Die durchschnittliche Allelanzahl beträgt  $5,58 \pm 0,58$ , die effektive Allelanzahl  $3,47 \pm 0,49$  Allele. Die erwartete Heterozygotie  $H_e$  beträgt  $0,618 \pm 0,050$ , die beobachtete Heterozygotie  $H_o$   $0,590 \pm 0,053$ . Der sich daraus ableitende F-Wert ist  $0,045 \pm 0,034$ .

Um einen besseren Vergleich mit den populationsgenetischen Werten der bayerischen Rothirsche (Kuehn et al., 2003) durchführen zu können (siehe Kapitel 5.2), wurden die Kenngrößen der gemeinsam verwendeten 14 Mikrosatelliten neu berechnet. Danach beträgt die durchschnittliche Allelanzahl  $4,93 \pm 0,54$ , die effektive Allelanzahl  $2,98 \pm 0,37$  Allele. Die erwartete Heterozygotie  $H_e$  beträgt  $0,585 \pm 0,055$ , die beobachtete Heterozygotie  $H_o$   $0,565 \pm 0,061$ . Der sich daraus ableitende F-Wert ist  $0,041 \pm 0,042$ .

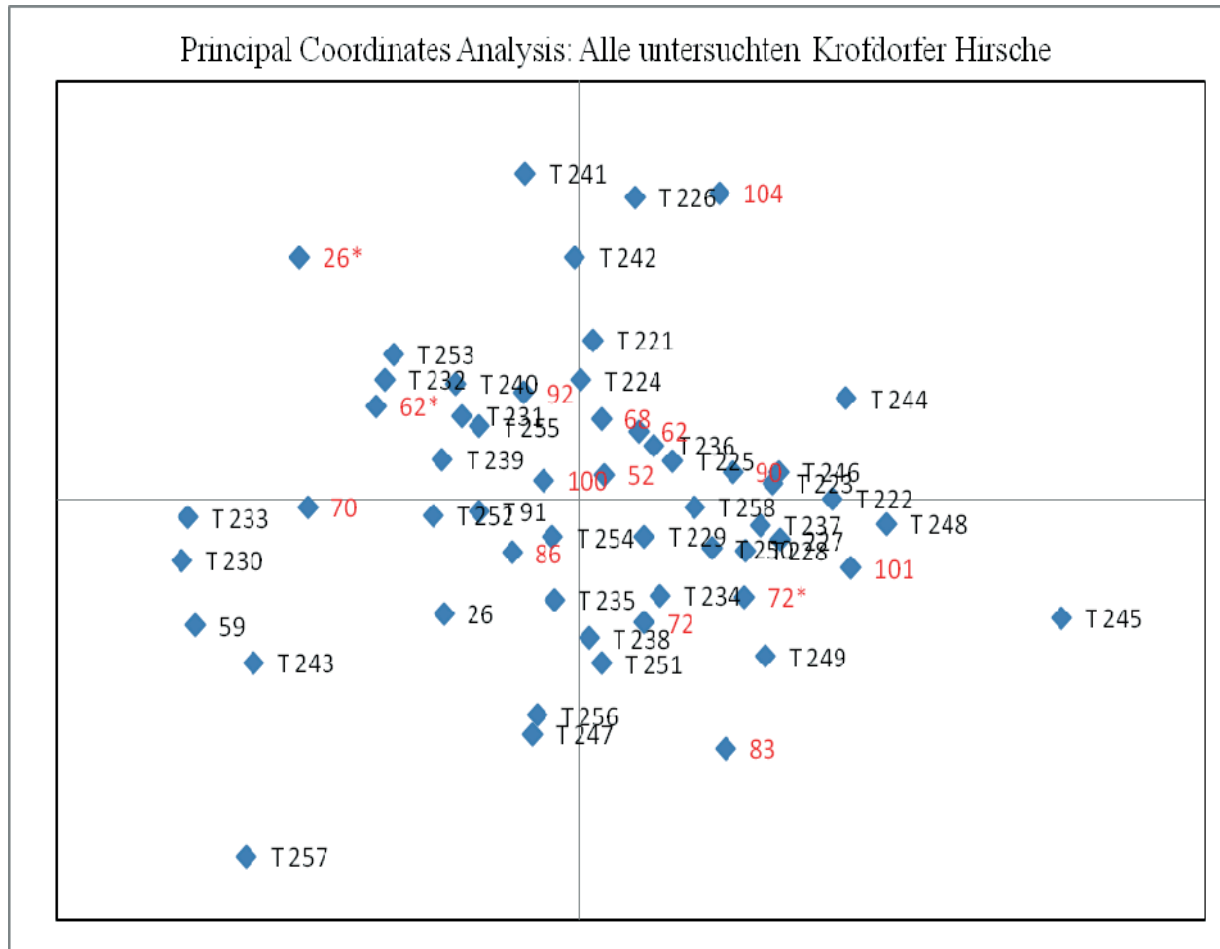
### 4.4 Genetische Distanzen

Das frei erhältliche Programm GenAlEx<sup>®</sup> bietet ein Tool zur optischen Darstellung der genetischen Distanzen. In der *Principal Coordinates Analysis* (PCA) wird die zugrunde liegende komplexe mathematische Berechnung mit mehreren Achsen zweidimensional visualisiert. Die folgende Abbildung 40 zeigt das Ergebnis der PCA aller untersuchten Hirsche, Abbildung 41 das Ergebnis der noch lebenden Hirsche.

Eine andere grafische Darstellungsform der genetischen Distanzen sind Dendrogramme. In Abbildung 42 sind alle untersuchten Hirsche dargestellt, in Abbildung 43 alle noch lebenden Hirsche.

Diese Darstellungen können als Hilfsmittel bei der Abschussplanung dienen. Hirsche, die eine größere genetische Distanz zu anderen Hirschen haben, somit zu einer genetischen Vielfalt beitragen, können identifiziert und geschont werden.

Abb. 40: PCA: Alle untersuchten Hirsche im Krofdorfer Forst



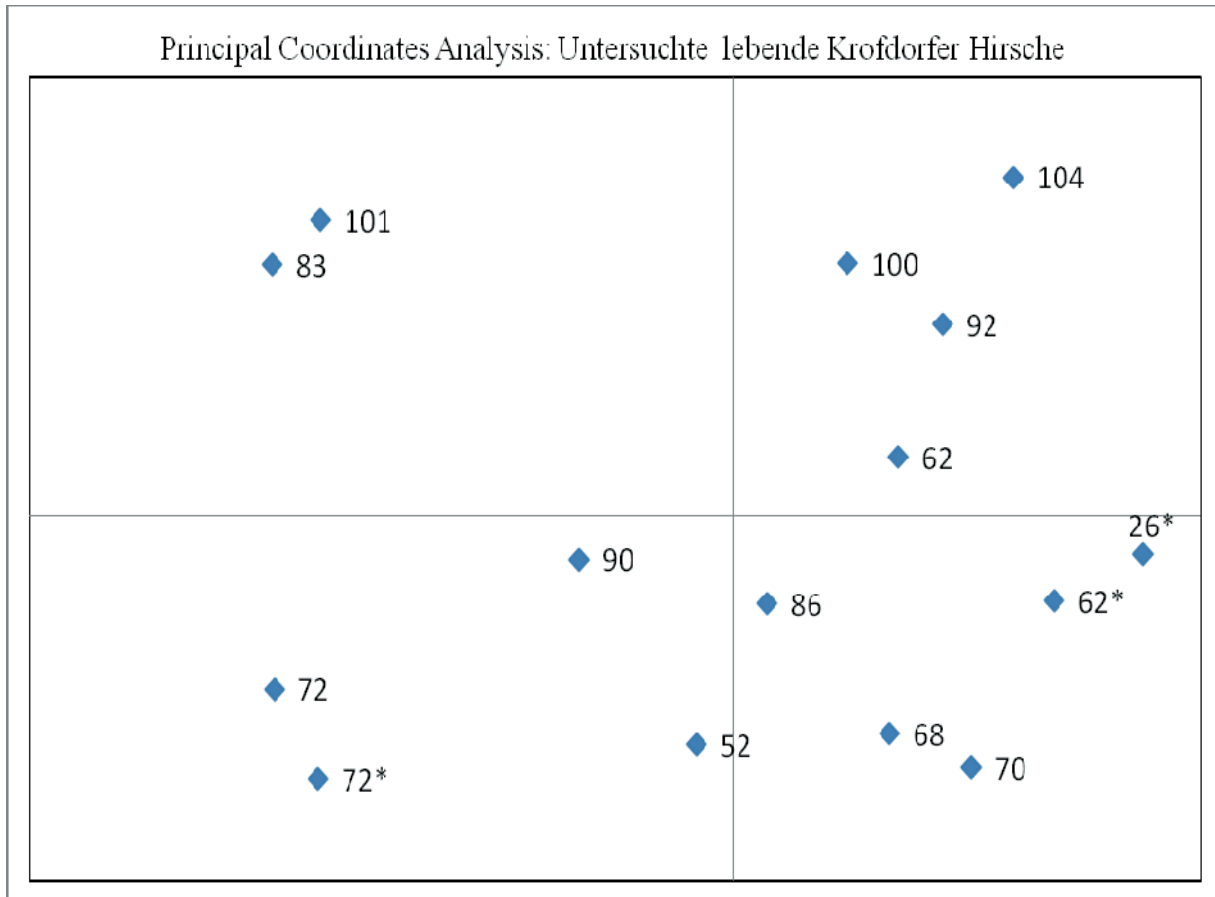
rote Zahl= Hirschnummer lebender Hirsch, schwarze Zahl= Hirschnummer erlegter / toter Hirsch

Erläuterungen zu den Hirschnummern siehe Kapitel 4.5 Zuordnung der Abwurfstangen (Seite 86)

In der PCA stellt der Schnittpunkt der Achsen den genetischen Durchschnitt dar. Die noch lebenden Hirsche (Stand Juni 2010) mit der Hirschnummer 100, 52 und 86 sind genetisch sehr nah an diesem Durchschnittswert. Bei dem Hirsch mit der Hirschnummer 52 handelt es sich um ein älteres Tier. Im Untersuchungsmaterial befanden sich von diesem Hirsch Abwurfstangen beginnend im Jahr 2002. Bei den beiden anderen Hirschen standen die Abwurfstangen erst ab dem Jahr 2008, beziehungsweise 2009 zur Verfügung. Bei dem Hirsch 52 scheint es sich um ein ranghohes Tier zu handeln, das sich oft fortgepflanzt hat. Die Hirsche 86 und 100 scheinen enge Verwandte zu Hirsch 52 zu sein. Durch den Altersunterschied von sechs und sieben Jahren könnte es sich bei diesen beiden Hirschen um Söhne des Hirschen 52 handeln.



Abb. 41: PCA: Untersuchte lebende Hirsche im Krofdorfer Forst

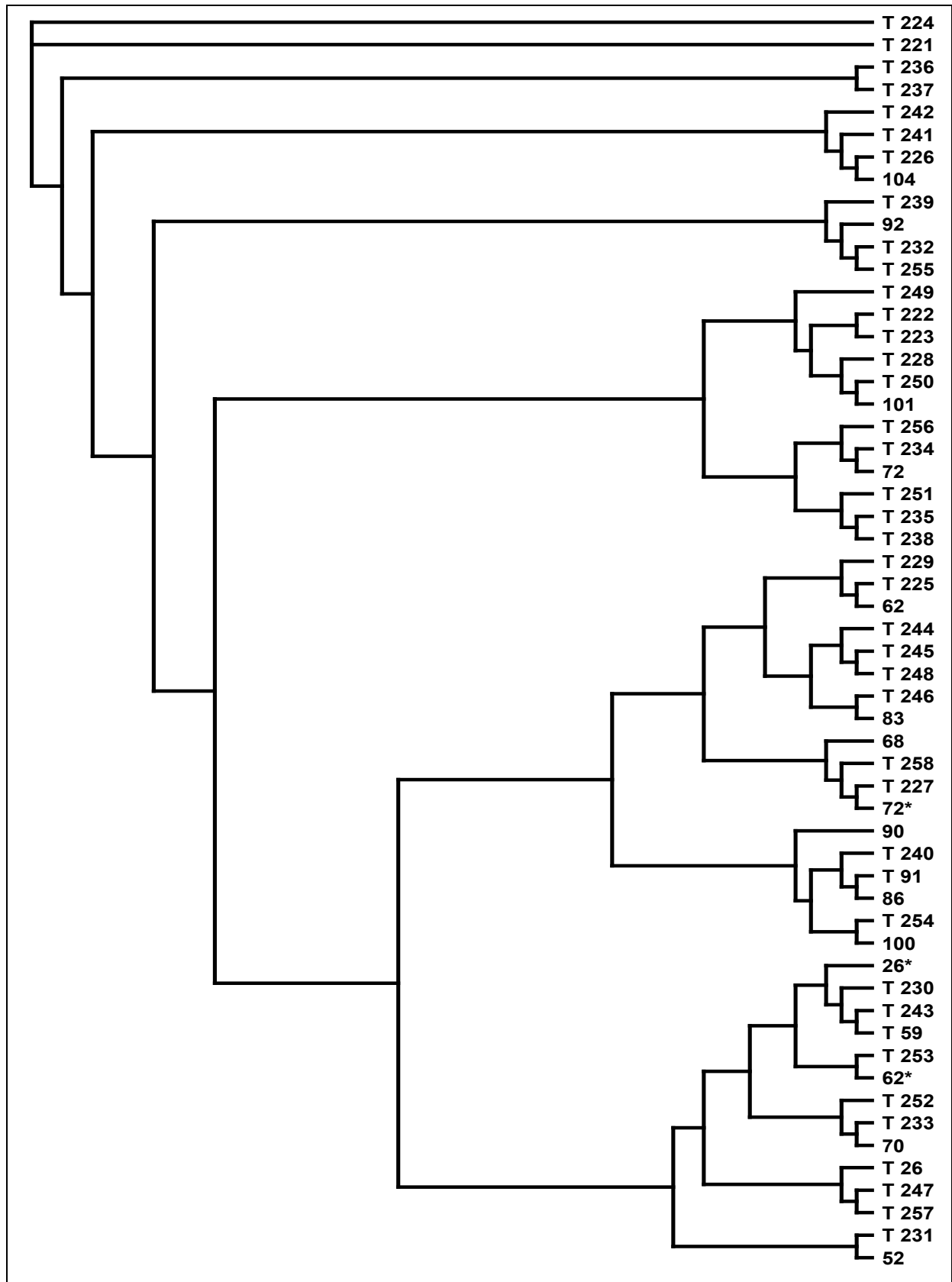


Nummern = Hirschnummern

Erläuterungen zu den Hirschnummern siehe Kapitel 4.5 Zuordnung der Abwurfstangen (Seite 86)

Aus dieser Abbildung kann man ableiten, dass die Hirsche, die weit vom Achsenschnittpunkt entfernt liegen, zur genetischen Vielfalt beitragen. Aus genetischer Sicht bedeutet dies für die Abschussplanung, dass die Hirsche 101, 104 und 26\* eher zur genetischen Vielfalt beitragen als zum Beispiel die Hirsche 90, 52 und 86 und deshalb zu schonen sind.

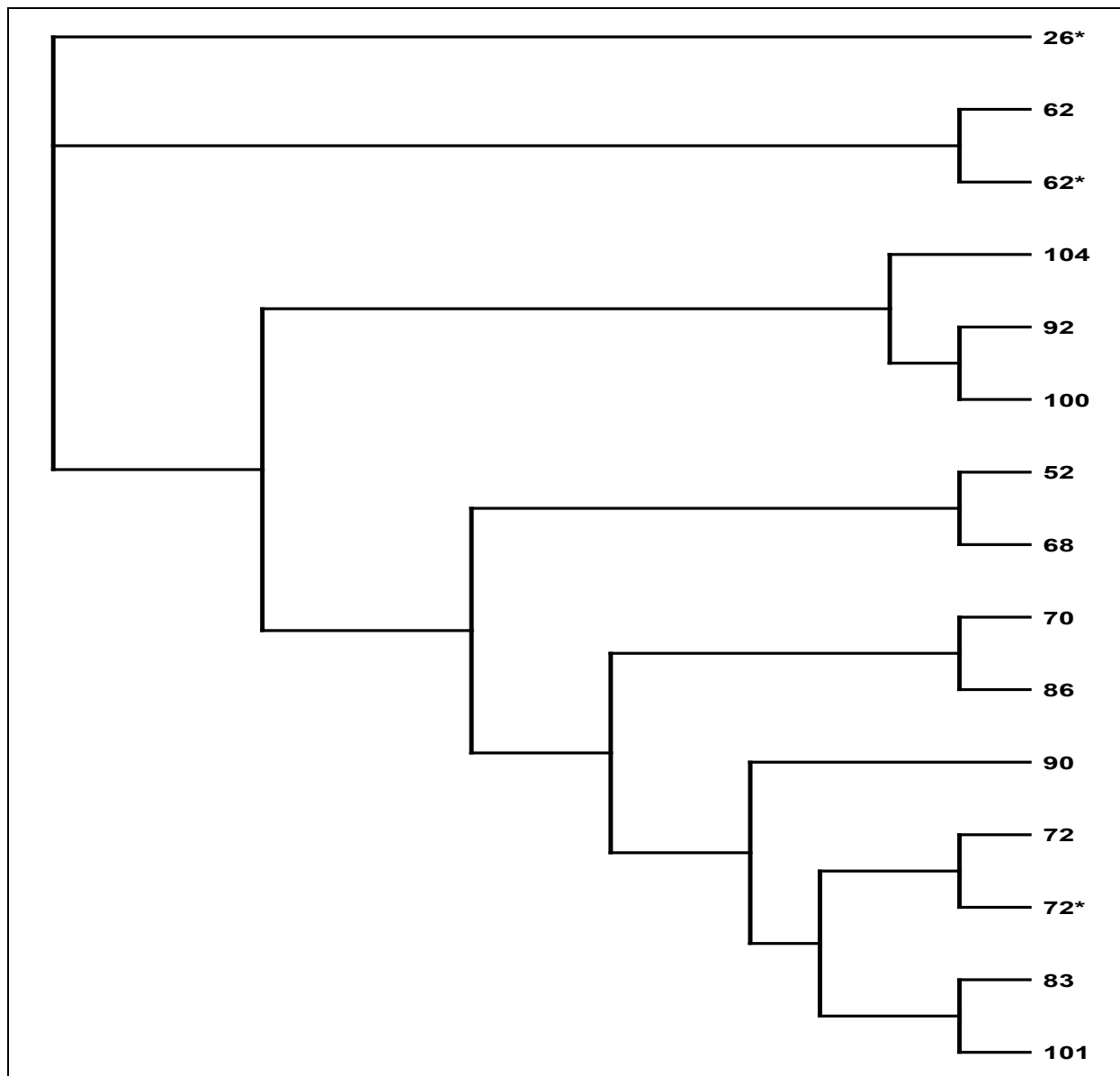
Abb. 42: Dendrogramm: Alle untersuchten Hirsche im Krofdorfer Forst



Nummern = Hirschnummern

Erläuterungen zu den Hirschnummern siehe Kapitel 4.5 Zuordnung der Abwurfstangen (Seite 86)

Abb. 43: Dendrogramm: Untersuchte lebende Hirsche im Krofdorfer Forst



Nummern = Hirschnummern

Erläuterungen zu den Hirschnummern siehe Kapitel 4.5 Zuordnung der Abwurfstangen (Seite 86)

Aus den Dendrogrammen kann man ebenfalls ableiten, dass es viele mit Hirsch 52 genetisch verwandte Tiere gibt.

Auch mit Hilfe der Dendrogramme kann man für die Abschussplanung eine Rangliste erstellen, die angibt, welche Hirsche zur genetischen Vielfalt beitragen und welche eher zu schonen sind.

#### 4.5 Zuordnung der Abwurfstangen

Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, werden die Hirsche im Krofdorfer Forst in einem Hirschbuch mit ihren Merkmalen erfasst und beschrieben. Die gesammelten Abwurfstangen werden von fachkundigen Personen des Hegerings gewogen, bewertet und subjektiv den Hirschen mit ihrer Hirschnummer zugeordnet.

Auf Wunsch des Hegerings wurde die optische Zuordnung mit den Ergebnissen der genetischen Untersuchung verglichen. Die 108 untersuchten Abwurfstangen stammen nach optischer Zuordnung von 15 Hirschen. Bei 104 Abwurfstangen stimmte die optische mit der genetischen Zuordnung überein. Dies entspricht einer Genauigkeit von 96,3%. Die vier genetisch abweichenden Abwurfstangen stammen von drei Hirschen (zwei Stangen sind genetisch identisch). Sie konnten jedoch keinem der anderen untersuchten Hirsche zugeordnet werden, sodass Probenmaterial von drei zusätzlichen Hirschen zur Verfügung stand. Diese Proben wurden mit der falsch zugeordneten Hirschnummer, ergänzt um den Index „\*“ bezeichnet. Darauf basiert die Nomenklatur der Abbildungen 41 bis 43.

## 5 Diskussion

### 5.1 Methoden

In den unter Kapitel 2.3 erwähnten Veröffentlichungen wurde die DNA überwiegend aus Muskelgewebe, Organgewebe oder Blut isoliert. Diese stammten von erlegten oder verendeten Tieren. Bei den tunesischen Hirschen wurde die DNA von lebenden Tieren aus Haar-, Haut- oder Kotproben isoliert. Dies bedarf einer guten Beobachtung mit hohem Zeitaufwand, um die Proben den einzelnen Tieren zuordnen zu können.

In der vorliegenden Untersuchung erfolgte die Isolierung der DNA größtenteils aus Abwurfstangen. Diese können gesammelt werden, ohne dass dazu Hirsche erlegt werden müssen. Es ist somit möglich, lebende Hirsche mit seltenen Allelen, die zur genetischen Vielfalt beitragen, zu identifizieren und zu schonen.

Die verwendeten Mikrosatelliten wurden so gewählt, dass ein Vergleich mit den geographisch naheliegenden Populationen aus Bayern (Kuehn et al., 2003) möglich war. Von den in dieser Untersuchung verwendeten 19 Mikrosatelliten kamen aber, wie bereits im Kapitel 4.1.3 beschrieben, nur 14 Mikrosatelliten zur Anwendung, da mit vier Mikrosatelliten in Vorversuchen keine Banden in der PAGE generiert werden konnten. Dies kann zum Beispiel durch Fehler in der Veröffentlichung, Fehler in der Datenbank oder durch Nullallele bedingt sein. Für künftige Untersuchungen könnte durch eine neue Auswahl an Mikrosatelliten die Aussagekraft dieser Ergebnisse, im Vergleich zu anderen Veröffentlichungen, gegebenenfalls noch weiter gesteigert werden. In der vorliegenden Untersuchung hatten fünf Mikrosatelliten nur zwei oder drei unterschiedliche Allele. Diese könnte man durch Mikrosatelliten mit mehreren Allelen ersetzen. In den zitierten Veröffentlichungen wurden zahlreiche unterschiedliche Mikrosatelliten eingesetzt. So hatte zum Beispiel der Mikrosatellit BM4513 durchschnittlich 15,0 verschiedene Allele und der Mikrosatellit NVHRT73 11,3 verschiedene Allele. Eine Liste der in den beschriebenen Veröffentlichungen verwendeten Mikrosatelliten befindet sich im Anhang (Tab. 81).

## 5.2 Bayerische Populationen

Für den Vergleich mit den Werten aus der bayerischen Veröffentlichung (Kuehn et al., 2003) wurde mit den Daten der 14 übereinstimmenden Mikrosatelliten eine gesonderte Auswertung durchgeführt. Tabelle 54 zeigt die berechneten Daten im Vergleich zu denen der bayerischen Populationen.

Tab. 54: Kennzahlen Krofdorfer Forst und bayerische Populationen

	N	Anz. Sat.	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	AD	ne	F- Wert	Popgröße
<b>Krofdorfer Forst</b>	56	14	0,585	0,565	4,9	3,0	0,034	300
NP Berchtesgaden	46	19	0,654	0,558	6,6	2,9	0,147	215
NP Bayerischer Wald	42	19	0,640	0,610	6,8	2,8	0,047	130
Isarau	34	19	0,527	0,497	4,3	2,1	0,057	250
Fichtelgebirge/Goldkronach	75	19	0,636	0,599	6,2	2,7	0,058	800
Grafenwöhr	73	19	0,610	0,580	5,8	2,6	0,049	1500
Ammergebirge	44	19	0,641	0,551	6,4	2,8	0,140	330
Spessart	16	19	0,648	0,502	5,2	2,8	0,225	540
Hassberge	12	19	0,581	0,503	4,2	2,4	0,134	90
Rhön	10	19	0,645	0,574	4,2	2,8	0,110	400
Thüringer Wald	26	19	0,666	0,586	6,4	3,0	0,120	5000
CZ; Böhmerwald	16	19	0,641	0,500	5,3	2,8	0,220	k.A.
Mittelwerte	38		0,623	0,552	5,5	2,7	0,112	k.A.

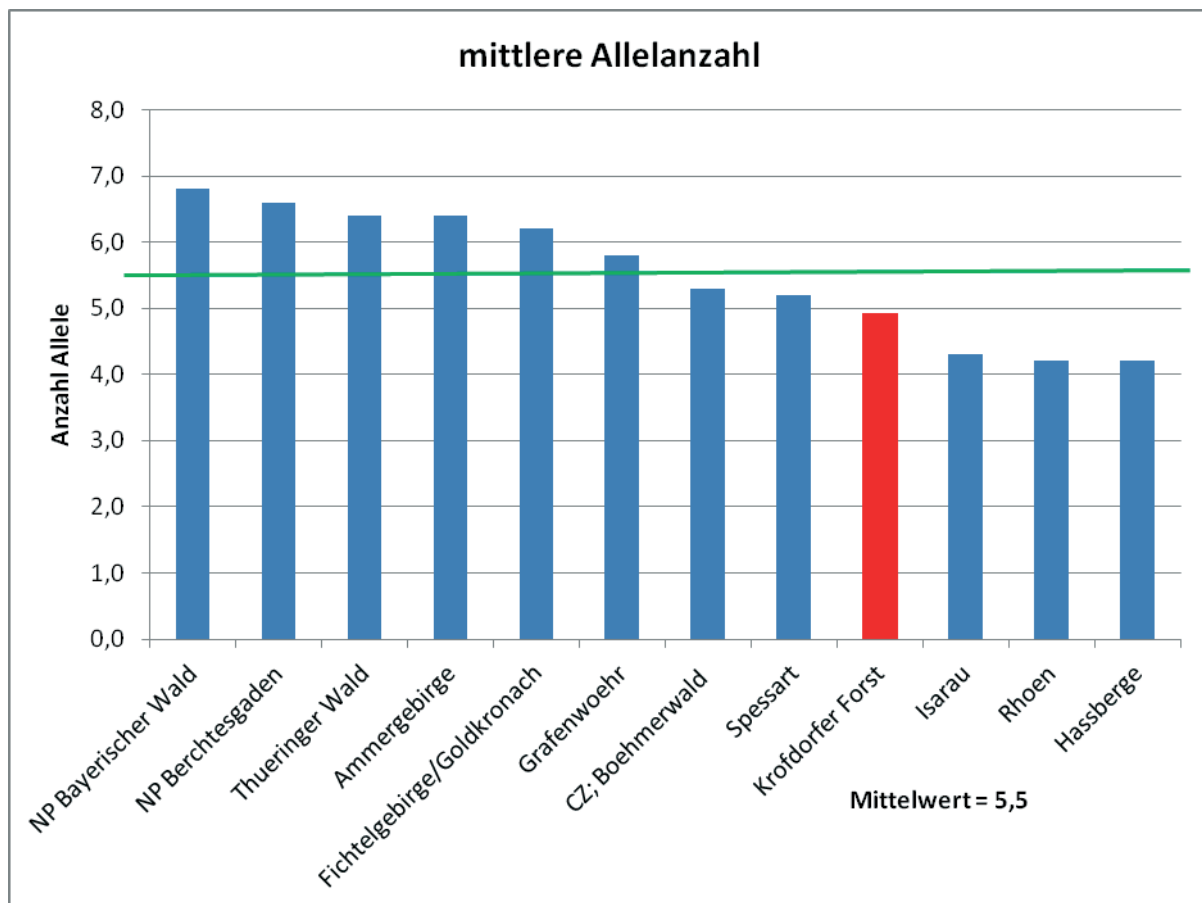
N: Anzahl untersuchter Tiere; Anz. Sat.: Anzahl verwendete Mikrosatelliten; H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie; H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie; AD: allelic diversity (mittlere Allelzahl); ne: effektive Allelzahl; F-Wert: Inzuchtkoeffizient; Popgröße: geschätzte Populationsgröße; k.A.: keine Angabe

Auch bei der Auswertung mit 14 Mikrosatelliten weichen sechs Mikrosatelliten statistisch signifikant von den Bedingungen für das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes ab. Nach Bonferronikorrektur sind dies mit  $p < 0,05$  die Mikrosatelliten BM1818, IOBT918, CSSM16, CSPA115 und Haut14, mit  $p < 0,01$  der Mikrosatellit ETH3.

Der Mikrosatellit CSPS115 weicht auch in sechs der elf bayerischen Populationen signifikant von den Bedingungen für das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes ab. Ein bis zwei solcher signifikanter Abweichungen (bei 19 Mikrosatelliten) gibt es in jeder bayerischen Population, drei in den Populationen Nationalpark Berchtesgaden und Ammergebirge, vier in der Population Spessart.

Die folgenden drei Abbildungen zeigen die Vergleiche der mittleren Allelzahl (Abb. 44), der effektiven Allelzahl (Abb. 45) und der F-Werte (Abb. 46). Bei der Interpretation dieser Abbildungen sind die geringen Probenanzahlen mit 10 und 12 Proben der Populationen Rhön und Hassberge zu berücksichtigen. Ebenso muss man beachten, dass die fünf Mikrosatelliten, die nicht zur Anwendung kamen, in den bayerischen Populationen sehr viele Allele hatten. So haben die 14 übereinstimmenden Mikrosatelliten über alle bayerischen Populationen durchschnittlich 8,5 verschiedene Allele je Mikrosatellit, die fünf nicht übereinstimmenden Mikrosatelliten jedoch 12,4 Allele je Mikrosatellit.

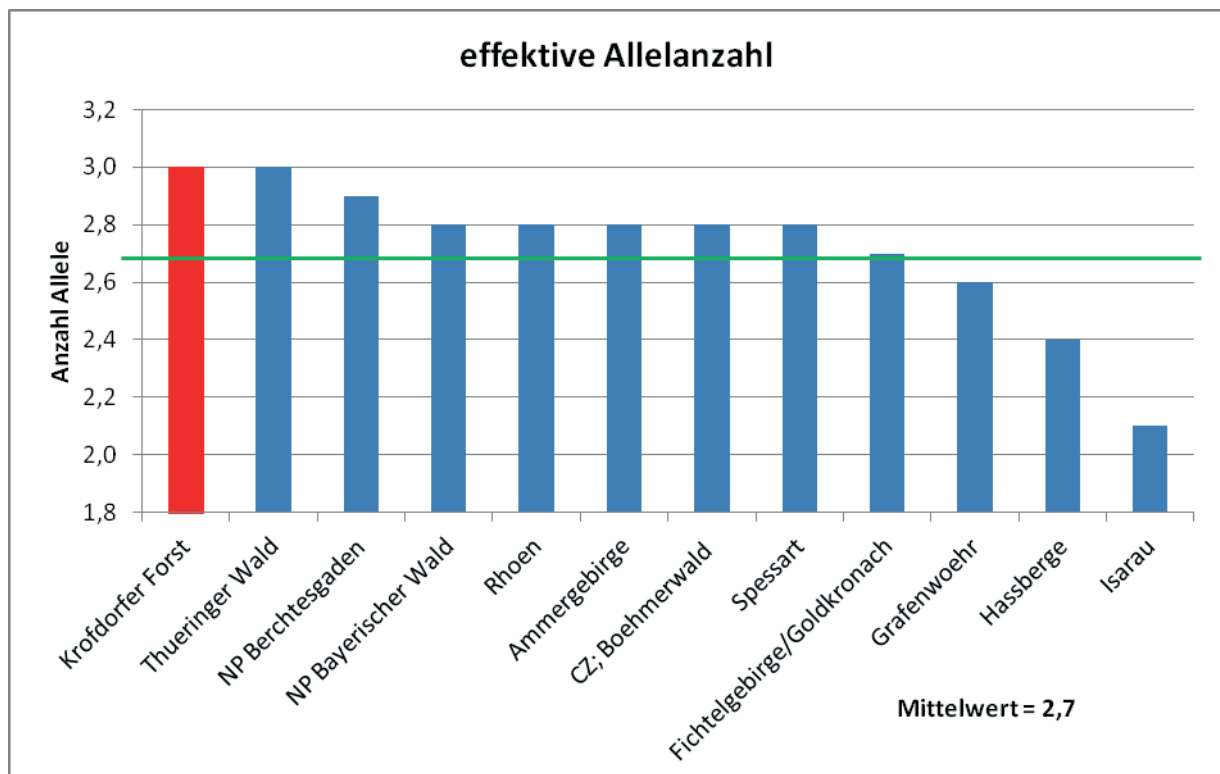
Abb. 44: Mittlere Allelzahl, Krofdorfer Forst und bayerische Populationen



Die unterdurchschnittliche mittlere Allelzahl der Hirsche aus dem Krofdorfer Forst ist, berücksichtigt man die oben beschriebene Unschärfe der Vergleichbarkeit, in der Abbildung zu positiv dargestellt.

Diese Unschärfe der Vergleichbarkeit ist in der folgenden Abbildung der effektiven Allelzahl zu vernachlässigen. Hier wird die Frequenz der gefundenen Allele im Bezug zur Gesamtallelanzahl dargestellt.

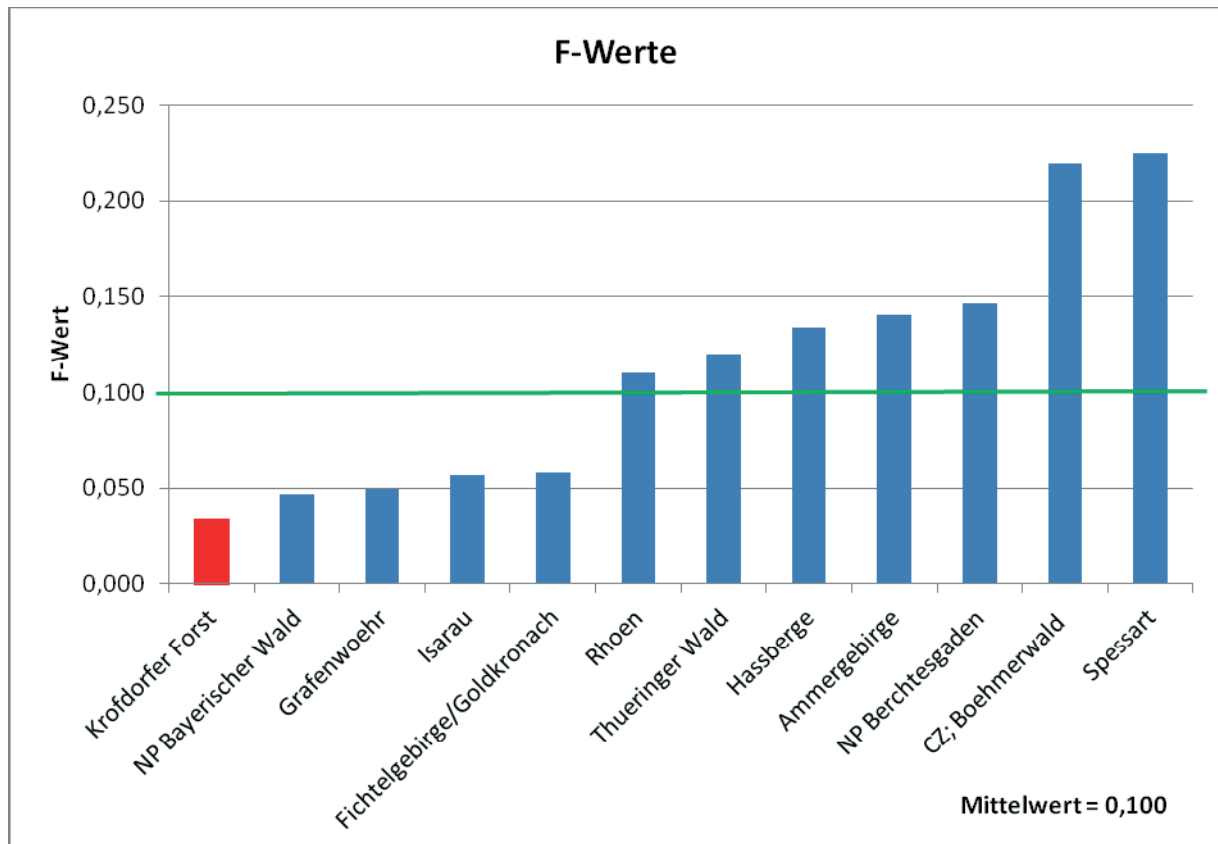
Abb. 45: Effektive Allelzahl, Krofdorfer Forst und bayerische Populationen



Die effektive Allelzahl ist im Vergleich zu den bayerischen Populationen überdurchschnittlich. Dies bedeutet, dass es bei den Hirschen im Krofdorfer Forst weniger Hauptallele (Allele mit großer Frequenz) gibt, somit indirekt eine geringere Drift im Vergleich zu den bayerischen Populationen vorliegt.



Abb.46: F-Werte, Krofdorfer Forst und bayerische Populationen



Durch die überdurchschnittliche effektive Allelzahl liegen die Werte der erwarteten und der beobachteten Heterozygotie eng beieinander. Dies ergibt rechnerisch einen niedrigen F-Wert.

Für die zwei bayerischen Populationen Hassberge und Isarau beschreibt Kuehn zwei Thesen: a) wenige Generationen zurückliegend gab es einen genetischen Flaschenhals sowie seitdem keine nennenswerte Immigration, oder b) die Populationen gründeten sich auf einen länger zurückliegenden genetischen Flaschenhals mit konstanter Populationsstärke ohne nennenswerte Immigration. Die beschriebene Situation ist bei beiden Populationen gleich. Sie haben im Vergleich zu den anderen bayerischen Populationen die geringsten Heterozygotiewerte und die geringste Anzahl an Allelen.

Die Heterozygotiewerte der Hirsche aus dem Krofdorfer Forst und die Allelzahl sind nur geringgradig höher als die Werte dieser beiden Populationen und liegen unter den Durchschnittswerten der bayerischen Populationen.

Die wenigen Allele sind bei den Krofdorfer Hirschen aber gut verteilt, im Vergleich zu den bayerischen Populationen haben sie die beste effektive Allelzahl. Dadurch ergibt sich auch eine hohe beobachtete Heterozygotie, was wiederum zu dem kleinsten berechneten F-Wert führt.

Bedenklich ist, dass sechs von 14 Mikrosatelliten beim Test für die Bedingungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes signifikant abweichen. Bei den bayerischen Populationen sind dies maximal vier von 19 Mikrosatelliten.

Die Autoren der bayerischen Untersuchung kommen zu dem Schluss, dass alle untersuchten bayerischen Populationen eine moderate genetische Drift aufweisen. Sie sind genetisch verwandt, haben sich jedoch differenziert. Die Populationen Hassberge und Isarau weisen die höchsten Differenzierungsgrade auf. Keine der Populationen zeigt Inzuchtkoeffizienten, die auf Inzuchtdepression hinweisen (Kuehn et al., 2003).

Setzt man diese Aussagen im Bezug zu den Werten der Krofdorfer Population, so weist diese Population ebenfalls eine moderate Drift auf. Da in der bayerischen Untersuchung keine detaillierten Allellängen dargestellt wurden, kann man keine Aussage über den Grad der genetischen Verwandtschaft, beziehungsweise den Grad der Differenzierung, zwischen den bayerischen und den Krofdorfer Hirschen treffen. Anhand des berechneten Inzuchtkoeffizienten der Krofdorfer Hirsche gibt es keinen Hinweis auf das Vorliegen einer Inzuchtdepression. Hierbei bleibt aber die geringe Gesamtallelanzahl unberücksichtigt.

### **5.3 Europäische und nordafrikanische Populationen**

Ein direkter Vergleich mit anderen Studien ist nicht möglich, da die in der vorliegenden Untersuchung verwendete Mikrosatellitenkombination in keiner anderen Untersuchung so verwendet wurde.

In anderen Studien wurden verschiedenste Mikrosatelliten verwendet, die keinen Vergleich des durchschnittlichen Allelreichtums zulassen. Von manchen Untersuchungsgebieten wurden nur wenige Proben (<15 Proben) genommen. Angaben zu Populationsgrößen werden selten, meist nur bei Gehegepopulationen gemacht. Eine Bewertung, ob der Stichprobenumfang mit der Populationsgröße korreliert, ist damit nicht möglich. Je größer der Stichprobenumfang gewählt wird, umso wahrscheinlicher ist es, seltene Allele zu finden. Dies führt zu einer höheren Allelzahl. Das hat wiederum Einfluss auf die Heterozygotiewerte, aus denen der F-Wert berechnet wird.

Die ermittelten Werte aus dem Krofdorfer Forst werden im Folgenden mit den Werten der insgesamt 96 unter Kapitel 2.3 beschriebenen Populationen verglichen. Aufgrund der großen Populationszahl werden zwei unterschiedliche Vergleiche dargestellt. Zum einen Vergleiche mit allen 96 Populationen, zum anderen Vergleiche mit 40 Populationen. Bei diesen 40 Populationen handelt es sich um Populationen im weiteren Umkreis des Krofdorfer Forstes. Aufgrund der flächig sehr lückenhaften Anzahl an Untersuchungen in Deutschland werden hier die angrenzenden Populationen in zahlreichen anderen Regionen und Ländern berücksichtigt. Die Kennzahlen aller Populationen zeigt Tabelle 55.

Tab. 55: Kennzahlen von 96 Populationen

Lit. Nr.	Rotwildpopulation	N	Anz. Sat.	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	AD	F-Wert	Pop-größe
	<b>Krofdorfer Forst</b>	56	17	0,618	0,590	5,6	0,045	300
1	D, NP Berchtesgaden	46	19	0,654	0,558	6,6	0,147	215
1	D, NP Bayerischer Wald	42	19	0,640	0,610	6,8	0,047	130
1	D, Isarau	34	19	0,527	0,497	4,3	0,057	250
1	D, Fichtelgebirge/Goldkronach	75	19	0,636	0,599	6,2	0,058	800
1	D, Grafenwöhr	73	19	0,610	0,580	5,8	0,049	1500
1	D, Ammergebirge	44	19	0,641	0,551	6,4	0,140	330
1	D, Spessart	16	19	0,648	0,502	5,2	0,225	540
1	D, Hassberge	12	19	0,581	0,503	4,2	0,134	90
1	D, Rhön	10	19	0,645	0,574	4,2	0,110	400
1	D, Thüringer Wald	26	19	0,666	0,586	6,4	0,120	5000
1	CZ; Böhmerwald	16	19	0,641	0,500	5,3	0,220	k.A.
2	SRB, Bachka	30	9	0,82	0,53	12,8	0,354	k.A.
2	SRB, Banat	13	9	0,81	0,57	7,3	0,296	k.A.
2	SRB, Banat (Gehege)	8	9	0,79	0,61	5,4	0,228	k.A.
2	RO, Temisvar	10	9	0,90	0,58	8,5	0,356	k.A.
2	RO, Arad	12	9	0,90	0,47	9,3	0,478	k.A.
2	RO, Brashow	10	9	0,87	0,50	7,5	0,425	k.A.
2	RO, Covasna	8	9	0,88	0,62	6,7	0,295	k.A.
2	RO, Harghita	11	9	0,88	0,55	7,7	0,375	k.A.
2	RO, Reghin	9	9	0,87	0,52	6,3	0,402	k.A.

Fortsetzung Tab. 55: Kennzahlen von 96 Populationen

Lit. Nr.	Rotwildpopulation	N	Anz. Sat.	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	AD	F-Wert	Pop-größe
3	GB, Euston/Thetford England	10	11	0,76	0,50	4,8	0,342	k.A.
3	GB, Achnacarry Scotland	10	11	0,84	0,40	5,7	0,524	k.A.
3	GB, Dunachton Scotland	10	11	0,78	0,49	5,3	0,372	k.A.
3	GB, Mar Scotland	10	11	0,80	0,39	5,4	0,513	k.A.
3	GB, Glenartney Scotland	10	11	0,78	0,48	5,6	0,385	k.A.
3	GB, Dunlossit/Islay Scotland	10	11	0,81	0,39	5,3	0,519	k.A.
3	GB, Arran Scotland	9	11	0,84	0,48	6,0	0,429	k.A.
4	I, Sardinien	29	12	0,66	0,48	6,4	0,273	2300
4	I, Mesola	28	12	0,62	0,51	7,0	0,177	70
5	CH, Praetigau	28	18	0,676	0,599	6,7	0,114	k.A.
5	CH, Oberengadin	26	18	0,679	0,558	6,6	0,178	k.A.
5	CH, Mittelengadin	29	18	0,675	0,567	6,6	0,160	k.A.
5	CH, Unterengadin	29	18	0,651	0,548	6,5	0,158	k.A.
5	CH, Muestair	27	18	0,678	0,551	7,3	0,187	k.A.
5	A, Paznaun	13	18	0,682	0,589	5,8	0,136	k.A.
5	I, Vinschgau	27	18	0,668	0,506	6,9	0,243	k.A.
5	FL, Liechtenstein	28	18	0,689	0,581	7,0	0,157	k.A.
6	D, Vorpommern	30	10	k.A.	0,55	4,9	k.A.	k.A.
7	D, Hasselbusch, SH	18	9	0,660	0,580	4,9	0,121	50
7	D, Segeberg, SH	27	9	0,750	0,490	6,2	0,347	k.A.
8	E, L. Navas Südsanien	13	7	0,80	0,65	5,8	0,188	k.A.
8	I, Val di Susa, NW Italien	16	7	0,85	0,75	8,0	0,118	k.A.
8	I, Tarvis, NO Italien	9	7	0,81	0,76	7,0	0,062	k.A.
8	I, Campione Sardinien	9	7	0,52	0,36	3,2	0,308	k.A.
8	BG, Haskovo	7	7	0,85	0,74	6,0	0,129	k.A.
9	DK, Oxbol	23	11	0,56	0,48	3,6	0,143	k.A.
9	DK, Ulborg	29	11	0,55	0,42	3,7	0,236	k.A.
9	DK, Feldborg	24	11	0,57	0,50	4,0	0,123	k.A.
9	DK, Klosterheden	32	11	0,43	0,36	3,6	0,163	k.A.
9	DK, Palsgaard	10	11	0,57	0,57	3,5	0,000	k.A.
9	DK, Thy	31	11	0,57	0,54	4,2	0,053	k.A.

Fortsetzung Tab. 55: Kennzahlen von 96 Populationen

Lit. Nr.	Rotwildpopulation	N	Anz. Sat.	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	AD	F-Wert	Pop-größe
9	DK, Hanherred	21	11	0,55	0,42	3,8	0,236	k.A.
9	DK, Lidenborg	20	11	0,46	0,39	3,2	0,152	k.A.
9	DK, Ormstrup	20	11	0,51	0,53	3,5	-0,04	k.A.
9	DK, Meilgaard	23	11	0,48	0,45	3,5	0,062	k.A.
9	DK, Lovenholm	21	11	0,52	0,46	3,6	0,115	k.A.
9	DK, Hostemark (Gehege)	31	11	0,47	0,46	3,2	0,021	250
9	DK, Tofte (Gehege)	33	11	0,37	0,32	2,9	0,135	700
9	DK, Jaegersborg (Gehege)	31	11	0,50	0,35	3,9	0,300	300
10	F, Petite Pierre Nat. Res.	260	14	0,616	0,605	7,4	0,018	k.A.
11	F + I, Corsica und Sardinien	33	8	0,72	0,53	4,6	0,264	k.A.
11	F, Corsica	10	8	0,64	0,54	3,5	0,156	200
11	I, Sardinien	23	8	0,71	0,53	4,4	0,254	2300
11	TN, Tunesien	30	8	0,75	0,47	4,3	0,373	k.A.
11	E, SW Spanien	21	8	0,81	0,63	6,1	0,222	k.A.
11	F, Chambord	14	8	0,77	0,63	5,1	0,182	k.A.
11	I, Mesola	25	8	0,60	0,47	3,1	0,217	k.A.
11	GB, Dunachton, Scotland	9	8	0,79	0,69	6,2	0,127	k.A.
11	RO, Carpathen	17	8	0,84	0,61	7,1	0,274	k.A.
12	GB, County Wicklow, Irland	10	9	0,846	0,687	6,5	0,188	k.A.
12	GB, Killarney, County Kerry, Irl.	46	9	0,550	0,500	3,7	0,091	k.A.
12	GB, County Galway, Irland	13	9	0,702	0,598	4,0	0,148	k.A.
12	GB, County Donegal, Irland	11	9	0,775	0,633	5,8	0,183	k.A.
13	N, Åfjord, N	16	14	0,62	k.A.	4,1	0,014	k.A.
13	N, Hitra, N	37	14	0,56	k.A.	3,7	0,017	k.A.
13	N, Skaun, Meldal, Rennebu, N	27	14	0,58	k.A.	3,5	-0,03	k.A.
13	N, Sunndal, N	32	14	0,58	k.A.	3,6	0,031	k.A.
13	N, Hareid, NW	20	14	0,59	k.A.	3,8	0,052	k.A.
13	N, Eid, NW	17	14	0,63	k.A.	3,9	0,030	k.A.
13	N, Skjåk, Centr.	23	14	0,64	k.A.	4,0	0,007	k.A.
13	N, Fjalar, W	32	14	0,61	k.A.	3,8	-0,04	k.A.
13	N, Tysvær, SW	23	14	0,59	k.A.	3,6	0,012	k.A.

Fortsetzung Tab. 55: Kennzahlen von 96 Populationen

Lit. Nr.	Rotwildpopulation	N	Anz. Sat.	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	AD	F-Wert	Popgröße
13	N, Farsund, etc., S	25	14	0,61	k.A.	3,7	0,071	k.A.
13	N, Drangedal, SE	30	14	0,62	k.A.	3,7	-0,04	k.A.
13	N, Nome, SE	68	14	0,61	k.A.	3,6	0,027	k.A.
13	N, Hjartda, Notodden, SE	25	14	0,60	k.A.	3,6	0,073	k.A.
13	N, Flå, Hol, Gol	29	14	0,61	k.A.	3,6	0,065	k.A.
13	N, Rendal, Elverum, E	15	14	0,65	k.A.	3,8	0,006	k.A.
14	E, Andalusien	30	11	0,775	0,762	8,0	0,017	k.A.
15	TN, Tunesien	19	13	0,780	0,460	5,6	0,410	< 800
16	H, Ungarn, Farm 1	67	9	0,779	0,689	10,3	0,115	k.A.
16	H, Ungarn, Farm 2	52	9	0,779	0,739	10,9	0,051	k.A.
17	GB, Isle of Rum	253	10	k.A.	k.A.	9,5	k.A.	k.A.
18	D, Lüneburger Heide, NS	110	5	0,671	0,598	8,4	0,109	k.A.
18	D, Harz, NS	109	5	0,627	0,567	7,8	0,096	k.A.
18	D, Solling, NS	44	5	0,563	0,482	6,4	0,144	k.A.

1 (Kuehn et al., 2003); 2 (Feulner et al., 2004); 3 (Hmwe et al., 2006a), 4 (Hmwe et al., 2006b);

5 (Kuehn et al., 2004); 6 (Poetsch et al., 2001); 7 (Zachos et al., 2007); 8 (Zachos et al., 2003);

9 (Nielsen et al., 2008); 10 (Frantz et al., 2008); 11 (Hajji et al., 2008); 12 (McDevitt et al., 2009);

13 (Haanes et al., 2010); 14 (Sanchez-Fernandez et al., 2008); 15 (Hajji et al., 2007);

16 (Zsolnai et al., 2009); 17 (Nussey et al., 2006); 18 (Kinser et al., 2008)

Lit. Nr.: Literaturstellennummer; N: Anzahl untersuchter Tiere; Anz. Sat.: Anzahl verwendete Mikrosatelliten;

H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie; H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie; AD: allelic diversity (mittlere Allelanzahl);

F-Wert: Inzuchtkoeffizient; Popgröße: geschätzte Populationsgröße; k.A.: keine Angabe

Die Population aus dem Krofdorfer Forst hat eine nahe beim Durchschnittswert liegende mittlere Allelanzahl. Die beiden folgenden Abbildungen zeigen diese mittlere Allelanzahl, auch allelic diversity oder allelic richness, der untersuchten und beschriebenen Populationen. Bei der Interpretation dieser Darstellungen muss berücksichtigt werden, dass in den Untersuchungen unterschiedlichste Mikrosatelliten verschiedenster Anzahl verwendet wurden, ein direkter Vergleich somit wenig Aussagekraft hat. Mit der mittleren Allelanzahl alleine kann man keine Aussage über die genetische Gesundheit und Diversität treffen. So hat die Population aus Hasselbusch im Vergleich zur Krofdorfer Population eine ähnliche mittlere Allelanzahl, hier sind jedoch Auswirkungen einer Inzuchtdepression beschrieben worden. Mehrere Kennzahlen sind nötig, um eine Bewertung durchzuführen.

Abb. 47: mittlere Allelzahl von 96 Populationen

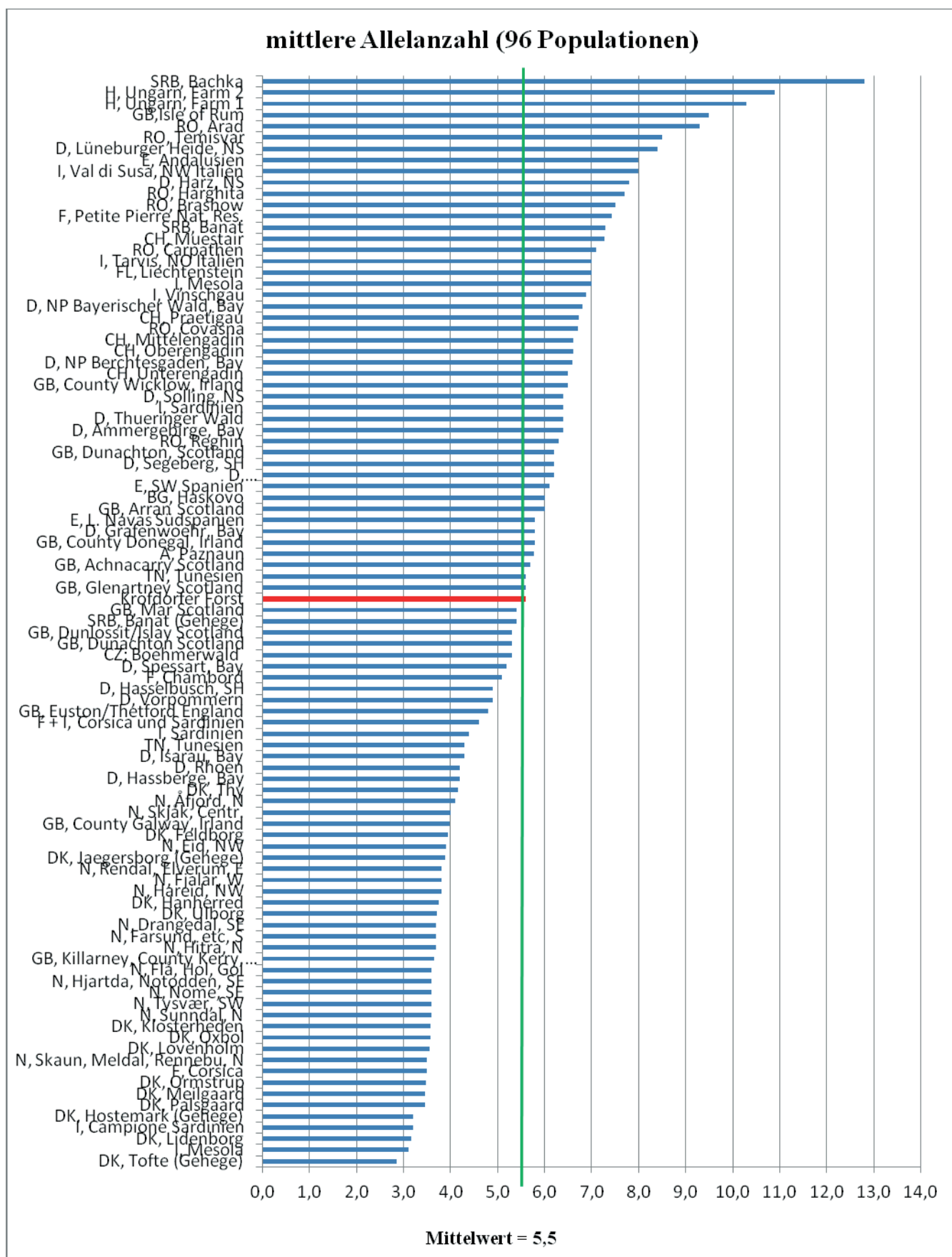
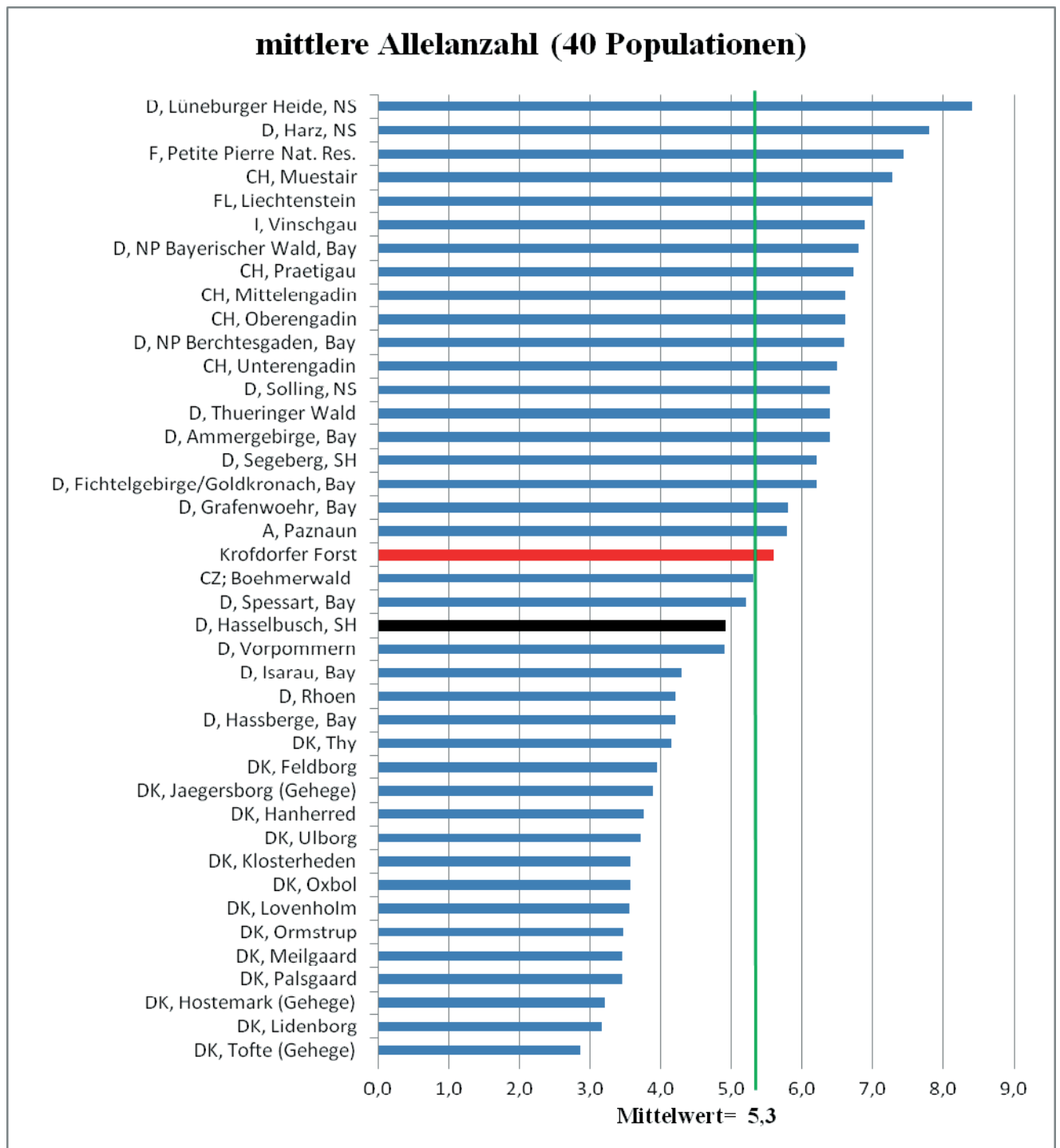


Abb. 48: mittlere Allelzahl von 40 Populationen



Bei der schwarz markierten Populationen aus Hasselbusch ist Brachygnathie aufgrund einer vermuteten Inzuchtdepression beschrieben worden (Zachos et al., 2007).



Der Stichprobenumfang korreliert selten mit der Populationsgröße. So gibt es untersuchte Populationen mit über 1000 Tieren, von denen aber nur wenige Proben genommen wurden (z.B. Thüringer Wald: 5000 Tiere, 26 Proben), andererseits gibt es untersuchte Populationen mit wenigen Tieren, aber einer hohen Anzahl an Proben (z.B. Bayerischer Wald: 130 Tiere, 42 Proben). Je größer die Anzahl der untersuchten Proben ist, umso wahrscheinlicher ist es, seltene Allele zu finden. Somit steigt die Allelzahl des Mikrosatelliten. Dies führt dazu, dass die beobachtete Heterozygotie näher bei der erwarteten Heterozygotie liegt. Da sich aus diesen beiden Werten der Inzuchtkoeffizient, auch F-Wert, berechnet, hat dieser Wert als Populationswert wenig Aussagekraft. Besser vergleichbar sind die F-Werte der einzelnen Mikrosatelliten, aber auch hier kommt es durch die unterschiedlichen Probenanzahlen zu einer Unschärfe.

Der berechnete F-Wert der Krofdorfer Population ist überdurchschnittlich. Bei einem Vergleich mit den 40 Populationen ist er auf dem fünften Rang, bei 96 Populationen auf dem 17. Rang. Dies dürfte auf der großen Probenanzahl von 56 untersuchten Hirschen bei einer geschätzten Populationsgröße von 300 Tieren zurückzuführen sein. Bei der Beurteilung der genetischen Diversität darf der F-Wert nicht isoliert betrachtet werden. Hierzu müssen alle berechneten populationsgenetischen Parameter herangezogen und gewichtet werden.

Die nun folgenden Abbildungen zeigen die F-Werte der untersuchten und beschriebenen Populationen.

Abb. 49: F-Werte von 96 Populationen

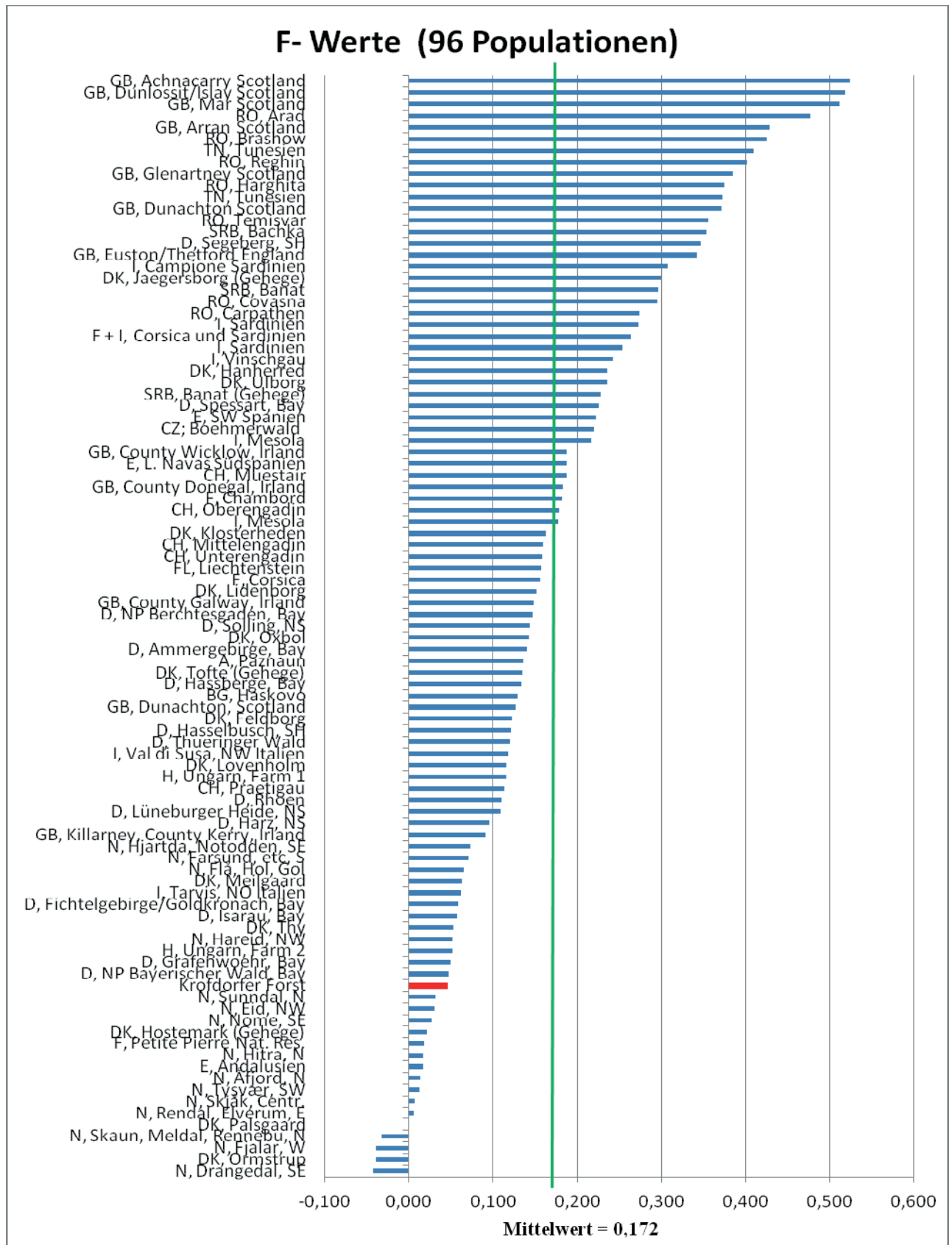
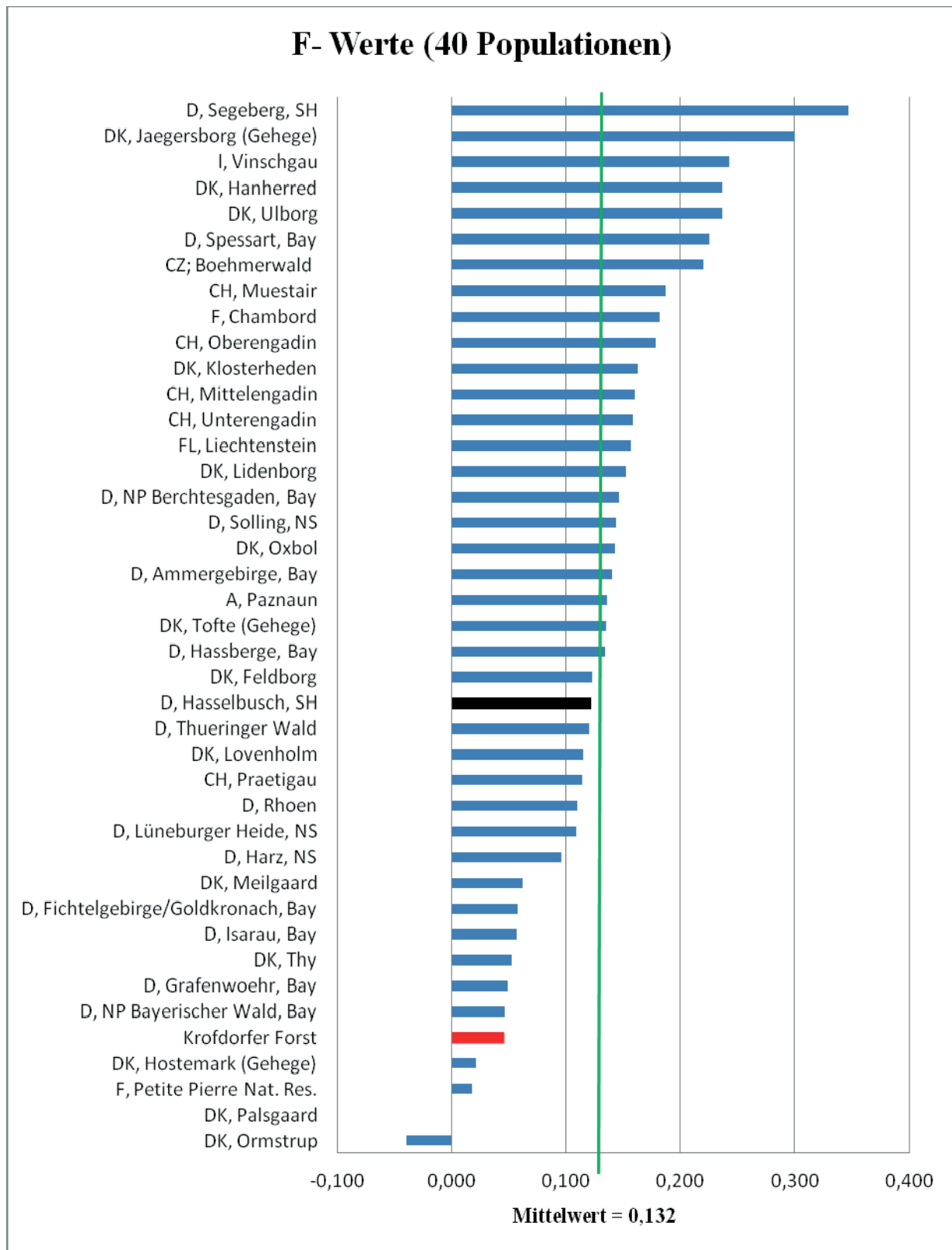


Abb. 50: F-Werte von 40 Populationen



Bei der schwarz markierten Population aus Hasselbusch ist Brachygnathie aufgrund einer vermuteten Inzuchtdepression beschrieben worden (Zachos et al., 2007).

## 5.4 Mikrosatelliten

Vergleicht man die Populationskenngrößen, so hat ein solcher Vergleich aufgrund der unterschiedlichen Mikrosatelliten und der unterschiedlichen Probenanzahl eine geringe Aussagekraft. Eine vergleichende Aussage mit Bezug zur genetischen Diversität kann man eher treffen, wenn man nicht die Populationskenngrößen, sondern die Kennzahlen der verwendeten Mikrosatelliten vergleicht. Leider werden hier in den Veröffentlichungen Ergebnisse unterschiedlich detailliert dargestellt, Auswertungen nach einzelnen Mikrosatelliten werden selten erwähnt. Oft werden hier alle Populationen einer Veröffentlichung zusammengefasst. Private Allele, die nur in einer von allen Populationen der Veröffentlichung gefunden wurden, erhöhen die Allelzahl. Sie täuschen beim Vergleich mit einer einzelnen Population eine zu hohe Allelzahl vor. Im Folgenden werden nun die verwendeten 17 Mikrosatelliten einzeln vergleichend dargestellt.

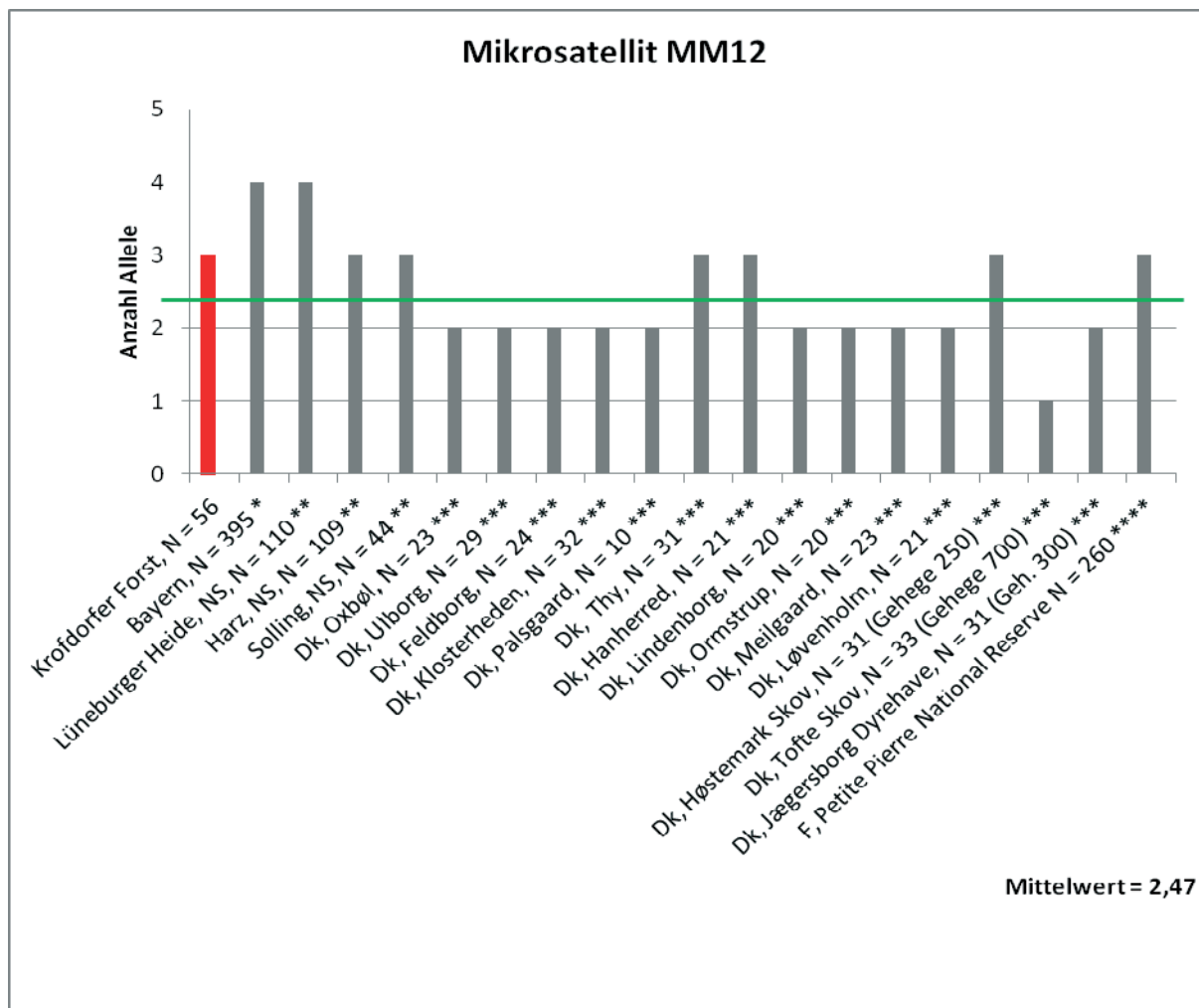
Tab. 56: Mikrosatelliten, Allelzahl im Vergleich

Mikrosatellit	Krofdorfer Forst N = 56	D, Bayern *	F, Petite Pierre Nat. Res. ** N = 272	GB, Isle of Rum *** N = 143	Mittelwert
INRA35	6	11	8	10	9,7
CSPS115	6	8	8		8,0
CSSM22	3	4	3		3,5
ETH225	7	14	7		10,5
CSSM19	8	15	10		13,0
BM1818	6	9	7		8,0
IOBT918	4	4	2		3,0
CSSM14	2	3	3		3,0

N: Anzahl Proben; \* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Frantz et al., 2008); \*\*\* (Nussey et al., 2006)

In Tabelle 56 sieht man, dass im Krofdorfer Forst bei sieben von acht Mikrosatelliten im Vergleich zu drei anderen Untersuchungen weniger Allele gefunden wurden. Auch wenn man die unterschiedliche Probenanzahl und die Populationsgrößen mit berücksichtigt, die bei den anderen Untersuchungen zu einer größeren Allelzahl führen sollten, ist der Unterschied zwischen den Untersuchungen so groß, dass die Krofdorfer Population eine unterdurchschnittliche Allelzahl aufweist.

Abb. 51: Mikrosatellit MM12: Allelzahl im Vergleich

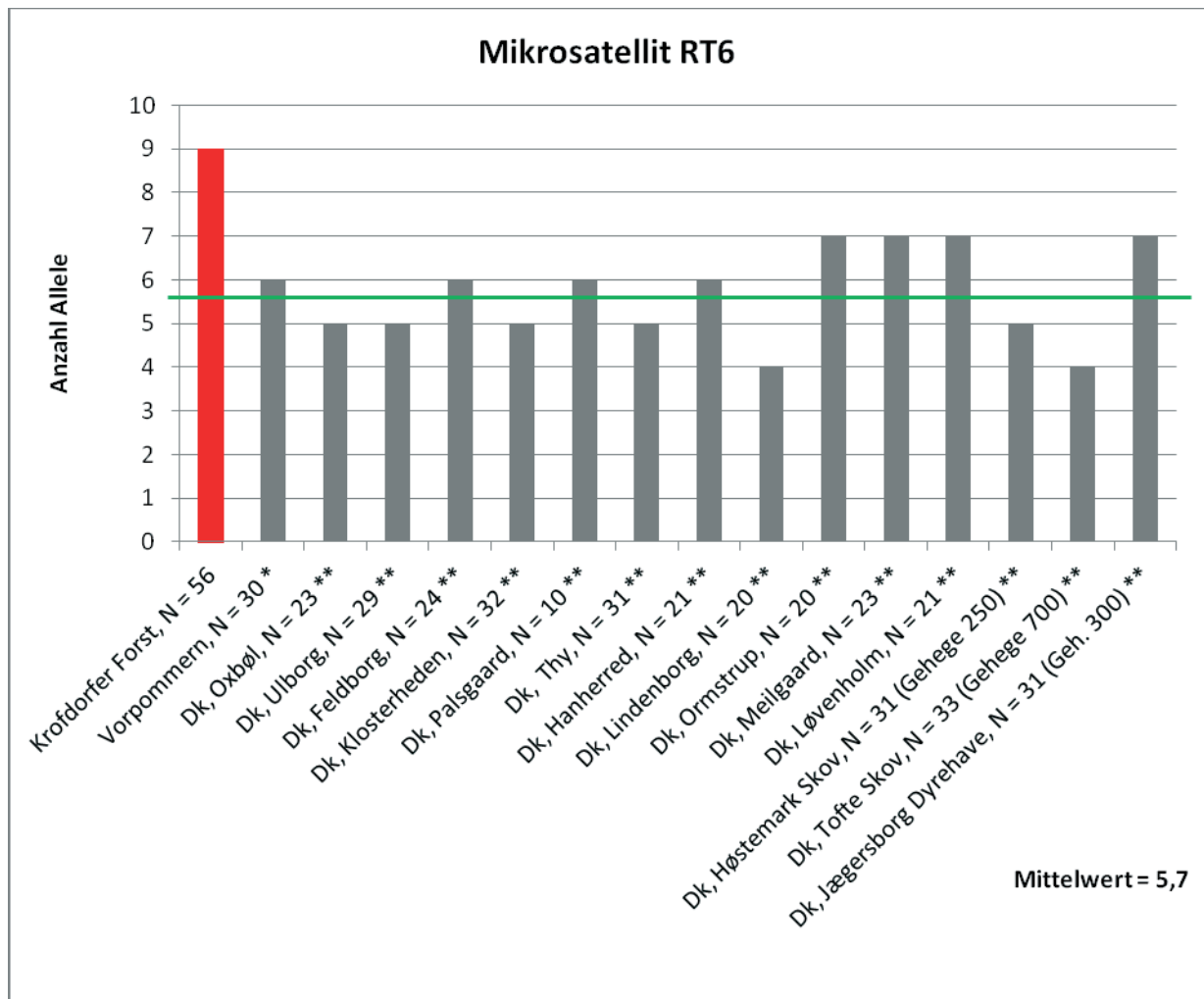


N: Anzahl der untersuchten Tiere

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Kinser et al., 2008); \*\*\* (Nielsen et al., 2008); \*\*\*\* (Frantz et al., 2008)

Bei dem Mikrosatellit MM12 ist aufgrund der insgesamt geringen Allelzahl über alle Untersuchungen die Aussagekraft gering. Die Krofdorfer Population liegt hier im Durchschnitt.

Abb. 52: Mikrosatellit RT6: Allelanzahl im Vergleich

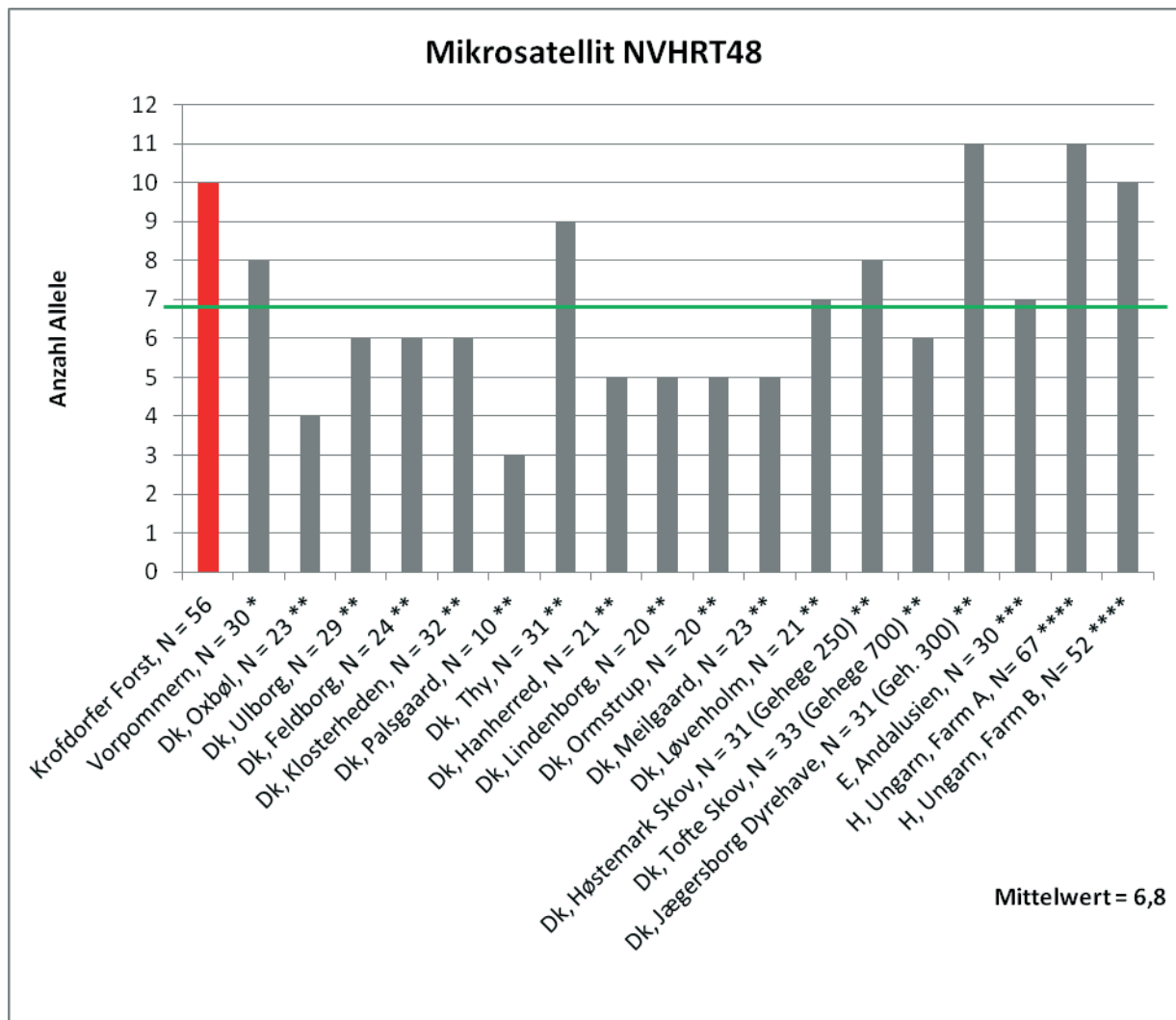


N: Anzahl der untersuchten Tiere

\* (Poetsch et al., 2001); \*\* (Nielsen et al., 2008)

Der Mikrosatellit RT6 ist der Einzige der untersuchten Mikrosatelliten, bei dem im Vergleich zu allen anderen Untersuchungen im Krofdorfer Forst mehr Allele gefunden wurden. Bei diesem Mikrosatelliten kam es durch Mutationen zu verschiedensten Allelen über einen großen Längenbereich (94 – 130 bp) (vergleiche Tabelle 50, Allelfrequenzen RT6).

Abb. 53: Mikrosatellit NVHRT48: Allelanzahl im Vergleich

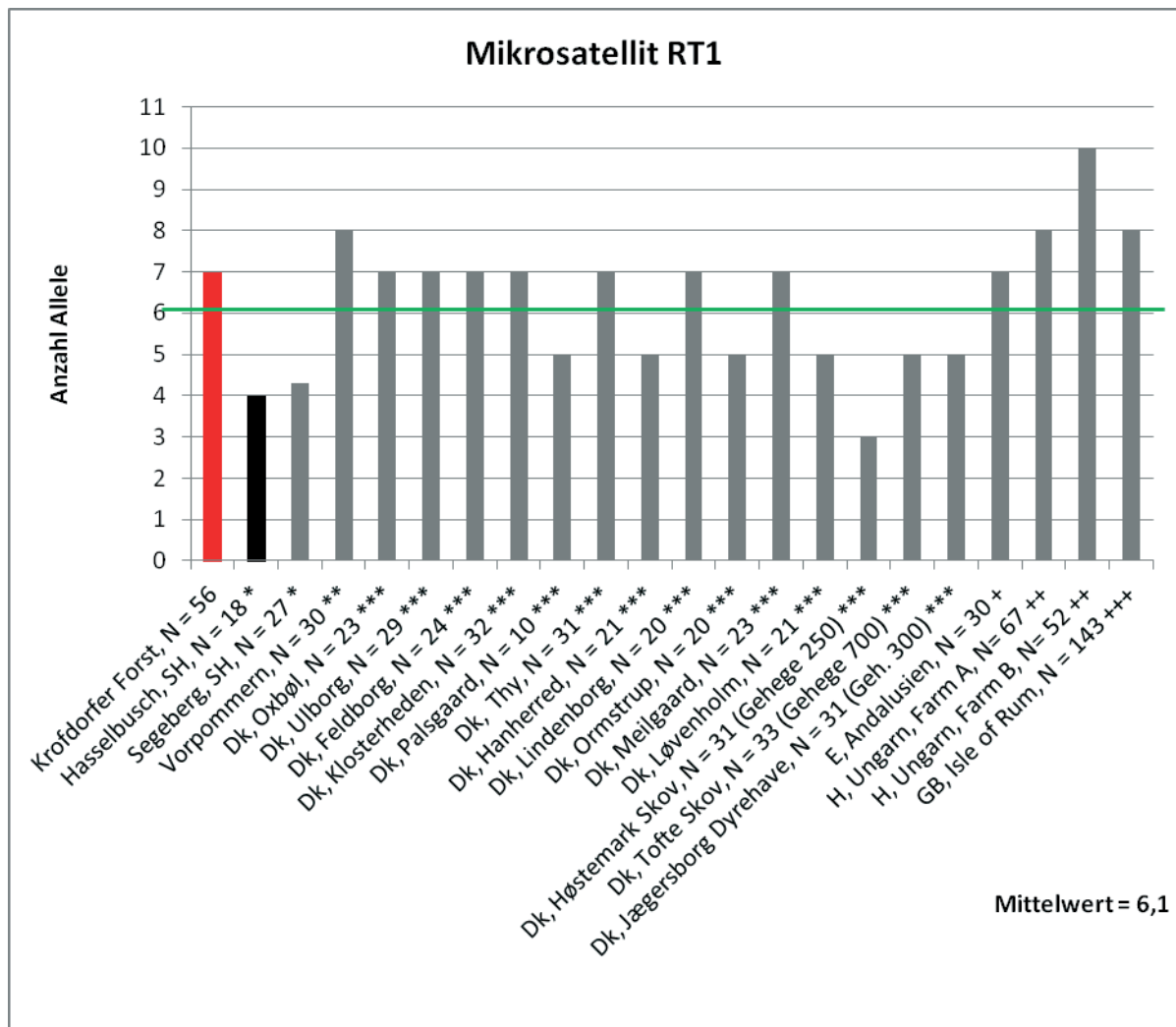


N: Anzahl der untersuchten Tiere

\* (Poetsch et al., 2001); \*\* (Nielsen et al., 2008); \*\*\* (Sanchez-Fernandez et al., 2008); \*\*\*\* (Zsolnai et al., 2009)

Die Allelanzahl des Mikrosatelliten NVHRT48 im Krofdorfer Forst ist überdurchschnittlich. Ähnlich zu dem Mikrosatelliten RT6 wurden hier Allele über einen großen Längenbereich (83 – 135 bp) gefunden. Diese sind zudem günstig verteilt (vergleiche Kapitel 4.2.6). Würde man eine Bewertung der genetischen Diversität nur anhand dieser beiden Genorte durchführen, so hätten die Krofdorfer Hirsche eine hohe genetische Diversität ohne Anzeichen einer Inzuchtdepression.

Abb. 54: Mikrosatellit RT1: Allelzahl im Vergleich



N: Anzahl der untersuchten Tiere

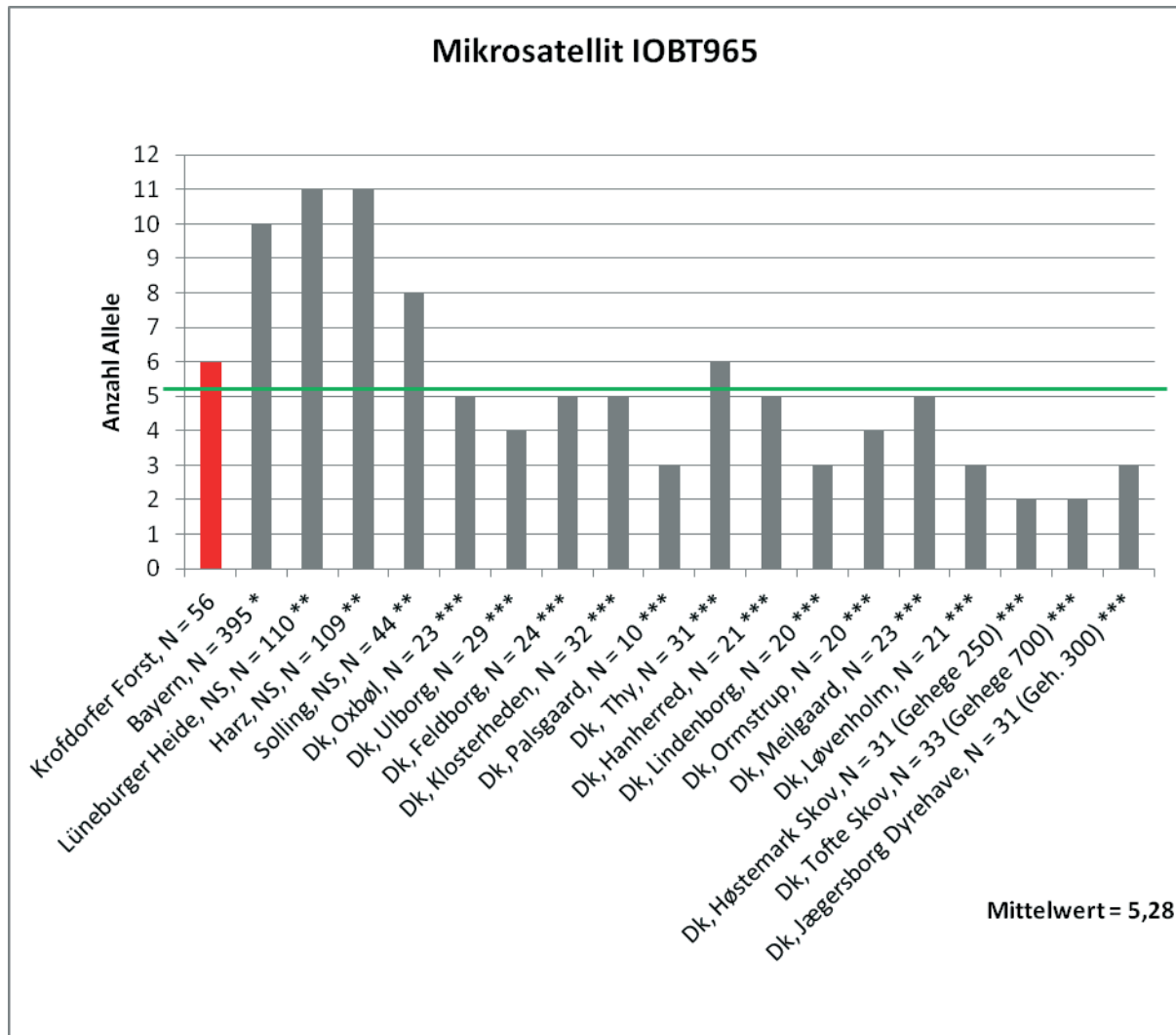
\* (Zachos et al., 2007); \*\* (Poetsch et al., 2001); \*\*\* (Nielsen et al., 2008); + (Sanchez-Fernandez et al., 2008); ++ (Zsolnai et al., 2009); +++ (Nussey et al., 2006)

Bei der schwarz markierten Population aus Hasselbusch ist Brachygnathie aufgrund einer vermuteten Inzuchtdepression beschrieben worden (Zachos et al., 2007).

Bei dem Mikrosatelliten RT1 liegt die Anzahl der Allele bei den Krofdorfer Hirschen leicht über dem Durchschnitt. In dieser Abbildung kann man Auswirkungen von Inzucht erkennen. In der Population Hasselbusch, in der Inzuchteffekte beschrieben wurden, der benachbarten Population Segeberg und in einer kleinen Gehegepopulation in Dänemark sind die wenigsten Allele gefunden worden. In allen anderen untersuchten Populationen sind unabhängig von der Probenanzahl auffallend mehr Allele gefunden worden.



Abb. 55: Mikrosatellit IOBT965: Allelzahl im Vergleich

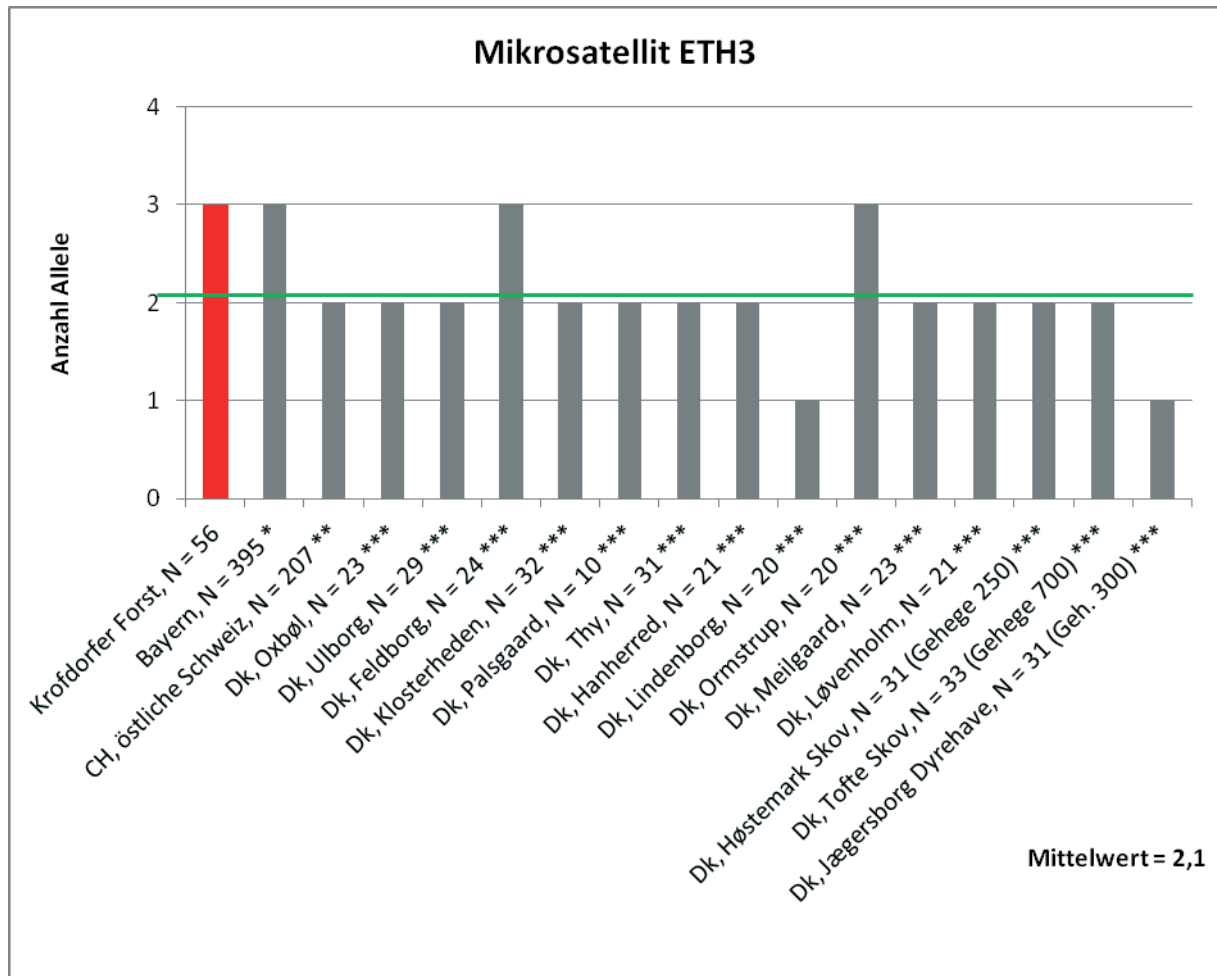


N: Anzahl der untersuchten Tiere

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Kinser et al., 2008); \*\*\* (Nielsen et al., 2008)

Auch bei dem Mikrosatelliten IOBT965 liegt die Anzahl der Allele im Krofdorfer Forst leicht über dem Durchschnitt. Auffallend in dieser Abbildung ist, dass die Zahl der gefundenen Allele mit steigender Probenanzahl zunimmt.

Abb. 56: Mikrosatellit ETH3: Allelanzahl im Vergleich

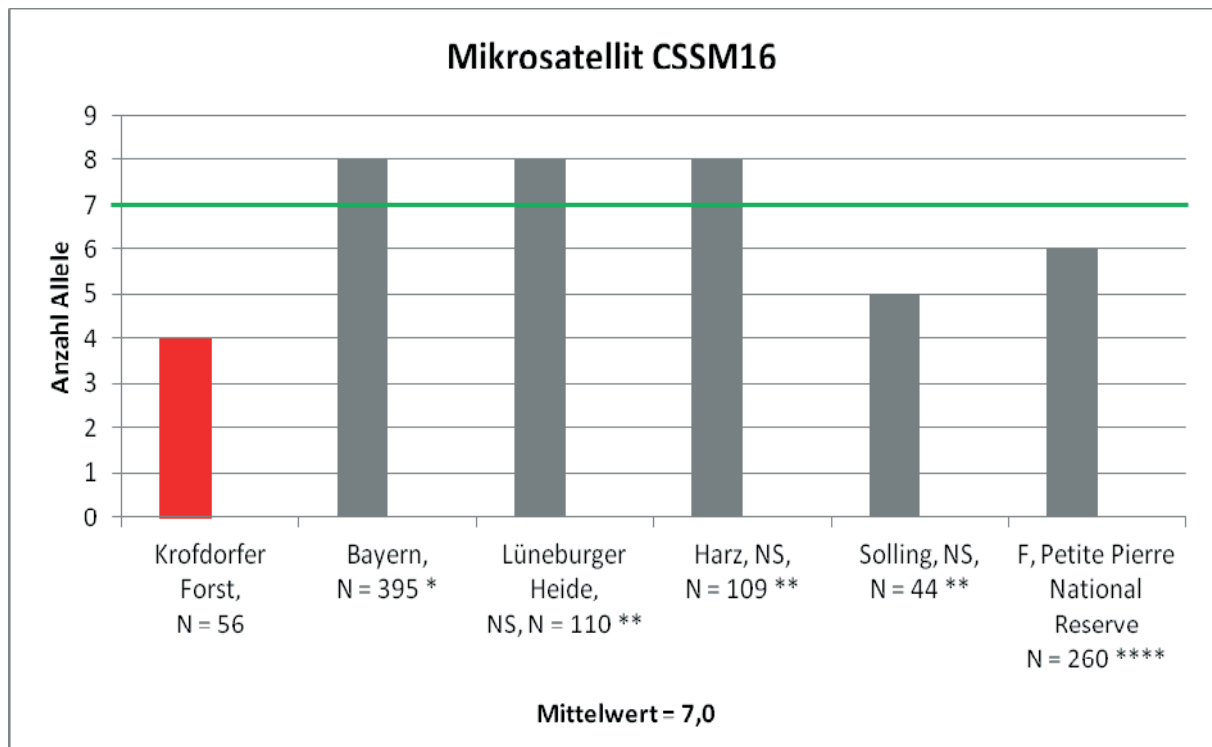


N: Anzahl der untersuchten Tiere

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Kuehn et al., 2004); \*\*\* (Nielsen et al., 2008)

Mit durchschnittlich 2,1 Allelen hat der Mikrosatellit ETH3 nur eine geringe Aussagekraft bezüglich der genetischen Diversität. Durch die Frequenzverteilung der Allele im Krofdorfer Forst, das Allel mit 96 bp kommt in einer Frequenz von 0,77 vor (vergleiche Tabelle 40), ist dieser Mikrosatellit zur Bewertung bezüglich der Diversität nicht geeignet.

Abb. 57: Mikrosatellit CSSM16: Allelanzahl im Vergleich

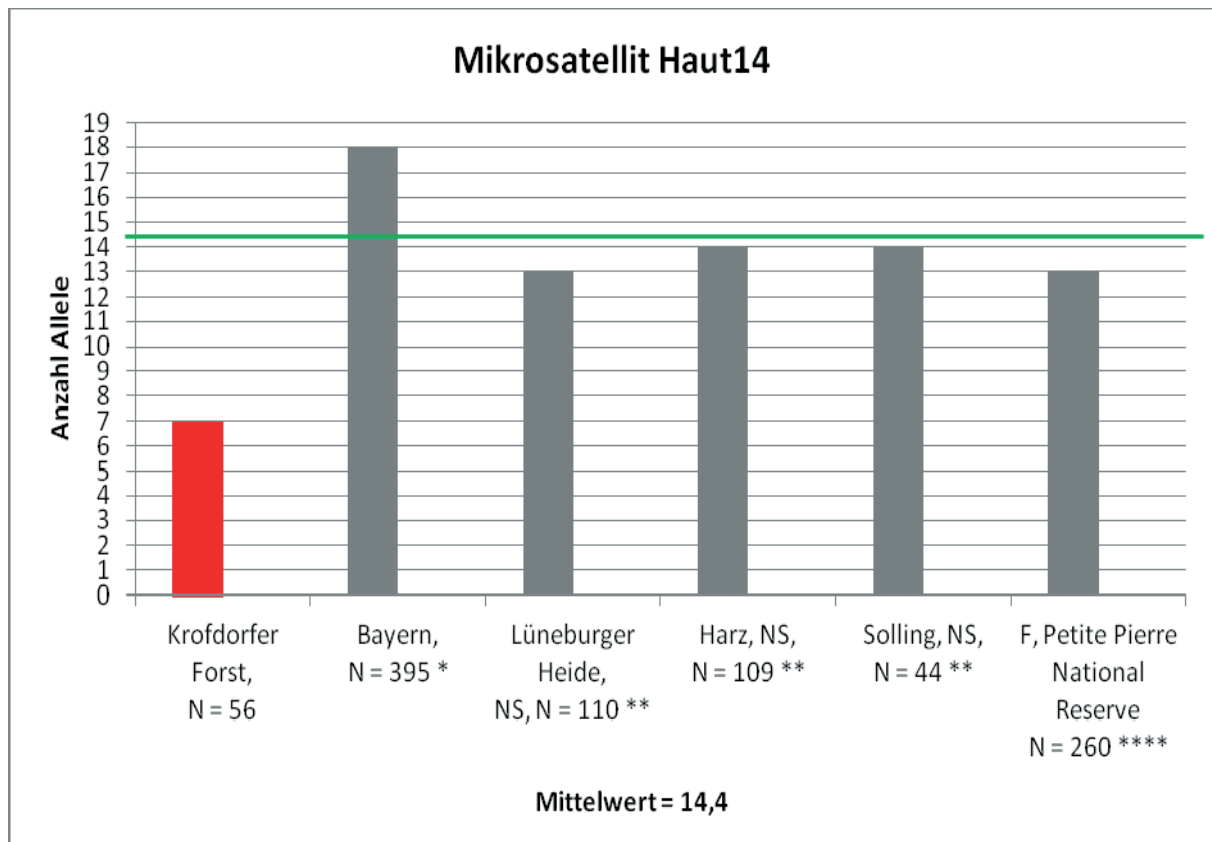


N: Anzahl der untersuchten Tiere

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Kinser et al., 2008); \*\*\* (Frantz et al., 2008)

Die Allelanzahl am Genort des Mikrosatelliten CSSM16 ist am Kleinsten im Vergleich mit fünf Populationen / Untersuchungen. In der Population aus dem Solling, die einen ähnlichen Probenumfang hatte und jahrelang durch ein Umfanggatter von den beiden anderen niedersächsischen Populationen getrennt war, wurde ein Allel mehr gefunden. Im Bezug auf die Bewertung der genetischen Diversität ist dies kritisch zu beurteilen. Positiv zu bewerten ist, dass nur zehn der 56 untersuchten Proben im Krofdorfer Forst an diesem Genort homozygot vorlagen (vergleiche Kapitel 4.2.8).

Abb. 58: Mikrosatellit Haut14: Allelanzahl im Vergleich

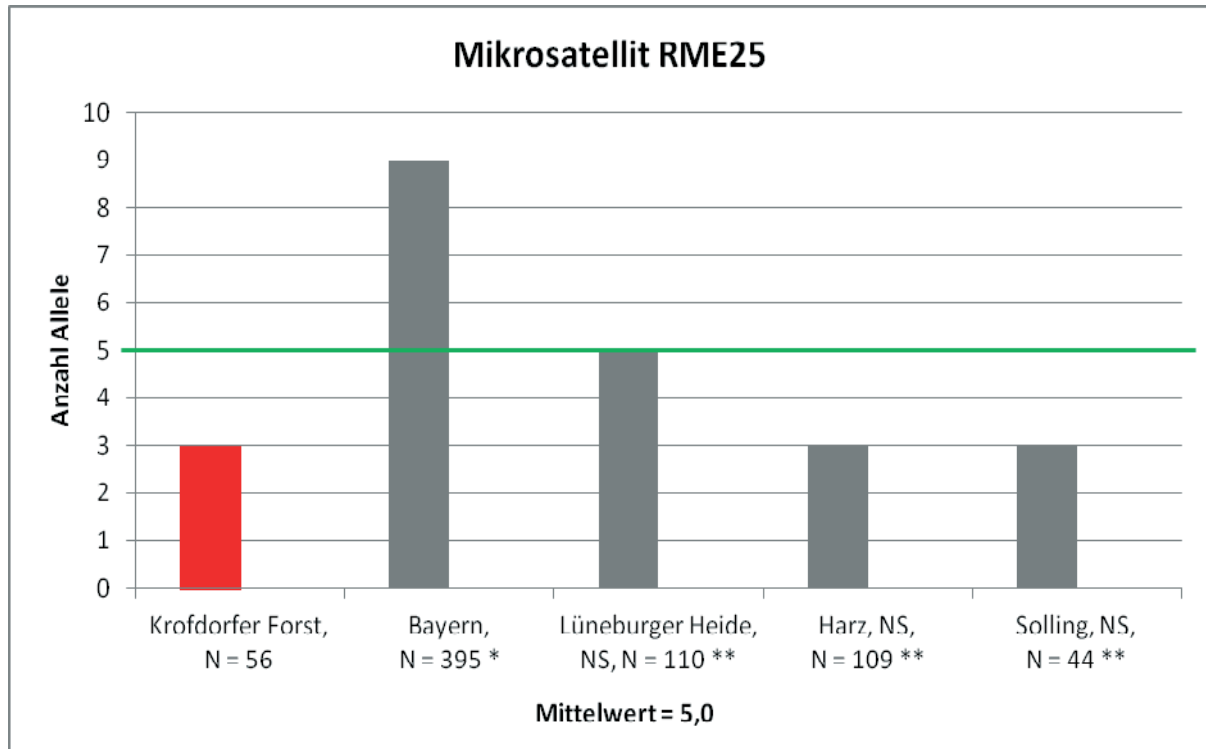


N: Anzahl der untersuchten Tiere

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Kinser et al., 2008); \*\*\* (Frantz et al., 2008)

Beim Mikrosatelliten Haut14 ist der beim Mikrosatelliten CSSM16 beschriebene Unterschied noch markanter. Die Anzahl der Allele der Hirsche aus dem Krofdorfer Forst beträgt weniger als die Hälfte der Anzahl der Allele der anderen Populationen / Untersuchungen. Auch hier ist positiv, dass nur 12 der 56 untersuchten Krofdorfer Hirsche an diesem Genort homozygot sind.

Abb. 59: Mikrosatellit RME25: Allelanzahl im Vergleich



N: Anzahl der untersuchten Tiere; \* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Kinser et al., 2008)

Auch bei dem Mikrosatelliten RME25 ist die Anzahl der Allele im Krofdorfer Forst unterdurchschnittlich. Sie ist aber gleich groß wie die Allelanzahl in den Populationen Harz und Solling.

Vergleicht man die Allelanzahl der einzelnen Mikrosatelliten der Krofdorfer Hirsche mit den Allelanzahlen der anderen Untersuchungen, so ergibt sich ein differenziertes Bild: Im Vergleich zu den Populationen aus Bayern, Frankreich und Niedersachsen findet man bei den Hirschproben aus dem Krofdorfer Forst weniger Allele. Im Vergleich zu allen Untersuchungen liegt die Anzahl der Allele der Krofdorfer Hirsche meist um den Durchschnittswert. Die dänischen Hirschproben haben eher weniger Allele, dies führen die Autoren aber auf extreme Umweltbedingungen und Managementeinflüsse zurück. Bei dem Mikrosatellit RT1 haben die Krofdorfer Hirsche mit sieben gefundenen Allelen deutlich mehr Allele, als die Hirsche aus Hasselbusch mit 4 gefundenen Allelen. Hasselbusch ist die Population, bei der Brachygnathie als Anzeichen der Inzuchtdepression beschrieben wurde.

Eine Übersicht über die Allelanzahlen zeigt Tabelle 57. Der Mittelwert der Allelanzahl aller Untersuchungen mit 93 Populationen ist mit 6,8 Allelen größer als der Mittelwert aus dem Krofdorfer Forst mit 5,5 Allelen. Die Allelanzahl im Krofdorfer Forst beträgt somit 81,6 % des Mittelwertes der Allelanzahl der anderen Untersuchungen. Diese Verarmung an Allelen ist in Bezug auf die Diversität und eine Inzuchtdepression kritisch zu bewerten.

Tab.57: Übersicht Allelanzahl der Mikrosatelliten

Mikrosatellit	Anzahl Populationen / Untersuchungen	Mittelwert Anzahl Allele	Anzahl Allele Krofdorfer Forst
BM1818	2	8,0	6
CSPS115	2	8,0	6
CSSM14	2	3,0	2
CSSM16	5	7,0	4
CSSM19	3	14,7	8
CSSM22	2	3,5	3
ETH225	2	10,5	7
ETH3	16	2,1	3
Haut14	5	14,4	7
INRA35	3	9,7	6
IOBT918	2	3,0	4
IOBT965	18	5,3	6
MM12	19	2,7	3
NVHRT48	18	6,8	10
RME25	4	5,0	3
RT1	21	6,1	7
RT6	15	5,7	9
<b>Mittelwert</b>		<b>6,8</b>	<b>5,5</b>

Poetsch et al. (2001) veröffentlichten in ihrer Untersuchung auch die Frequenzen der einzelnen Allele der beiden Mikrosatelliten RT1 und NVHRT48. Eine Gegenüberstellung zu den Frequenzen im Krofdorfer Forst zeigen die Tabellen 58 und 59. Bei dem Mikrosatelliten RT1 hatten die Autoren bei 30 Hirschen fünf Allele gefunden. Im Krofdorfer Forst sind dies sieben Allele bei 56 untersuchten Tieren. Auch bei dem Mikrosatelliten NVHRT48 ist die gefundene Allelzahl im Krofdorfer Forst mit zehn Allelen gegenüber acht in Vorpommern gefundenen Allelen größer. Die Allele sind stark differenziert, nur zwei und drei Allele haben die selbe Länge. Bei dem Mikrosatelliten RT1 dominiert jeweils ein Allel, im Krofdorfer Forst das Allel mit 215 bp Länge und einer Frequenz von 0,589, bei den Hirschen aus Vorpommern das Allel mit 217 bp Länge und einer Frequenz von 0,300. Bei dem Mikrosatelliten NVHRT48 dominiert bei den Hirschen aus Vorpommern ebenfalls ein Allel (104 bp, Frequenz = 0,350), während bei den Hirschen aus dem Krofdorfer Forst kein dominantes Allel erkennbar ist.

Tab. 58: Allelfrequenzvergleich RT1

Allellänge	Frequenz RT1	
	Krofdorfer Forst	Vorpommern*
203	0,152	
209	0,009	
213	0,080	0,200
215	0,589	0,100
217		0,300
219	0,080	0,183
221	0,045	
223		0,217
227	0,045	

\*(Poetsch et al., 2001)

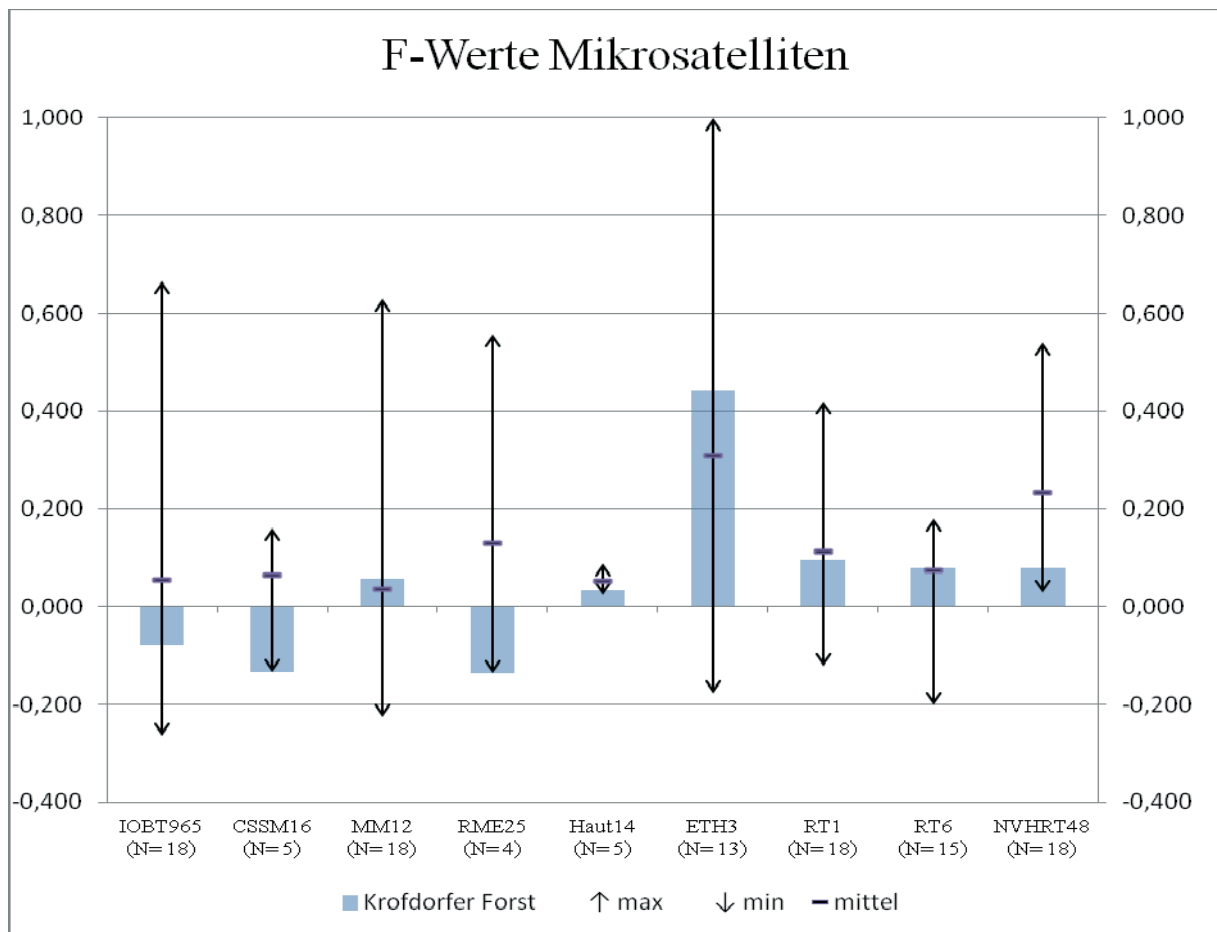
Tab. 59: Allelfrequenzvergleich NVHRT48

Allellänge	Frequenz NVHRT48	
	Krofdorfer Forst	Vorpommern*
83	0,089	
90	0,161	
92	0,125	
94		0,050
96		0,100
98	0,089	0,050
100	0,071	0,183
102		0,083
104		0,350
108		0,083
110		0,050
115	0,107	
119	0,071	
122	0,089	
129	0,063	
135	0,134	

\*(Poetsch et al., 2001)

Die Abbildung 60 zeigt die F-Werte der einzelnen Mikrosatelliten im Vergleich zu den F-Werten der unter Kapitel 2.3 beschriebenen Untersuchungen. Angezeigt werden nur Mikrosatelliten, bei denen Werte aus mindestens vier Populationen / Untersuchungen beschrieben wurden. Tabellen mit Heterozygotiewerten zu allen Mikrosatelliten als Basis zu dieser Abbildung befinden sich im Anhang (Tabelle 64 – Tabelle 80).

Abb. 60: F-Werte Mikrosatelliten



N: Anzahl Populationen / Untersuchungen

Betrachtet man die F-Werte der Mikrosatelliten, so liegen die Werte des Krofdorfer Forstes um den Mittelwert aller Untersuchungen oder deutlich besser. Dies deckt sich mit der hohen effektiven Allelanzahl. Durch eine günstige Frequenzverteilung der einzelnen Allele ist die beobachtete Heterozygotie nahe der erwarteten Heterozygotie, was rechnerisch zu kleinen und somit günstigen F-Werten führt.

Ein weiterer Beleg für eine günstige Allelverteilung zeigt die Genotypenanzahl. Im Vergleich mit den drei Populationen aus Niedersachsen (Kinser et al., 2008) wurden bei den Krofdorfer



Hirschen zwar weniger Allele gefunden, der Anteil der gefundenen an den maximal möglichen Genotypvarianten ist aber hier am Größten (Tab. 60).

Tab. 60: Anzahl Genotypen in verschiedenen Rotwildpopulationen im Vergleich

Mikrosatellit:	N	Anzahl Allele	Anzahl Genotypen		
			max.	ist	%

#### Haut14

Harz	109	14	105	45	43
Lüneburger Heide	110	14	105	51	49
Solling	44	13	91	31	34
<i>Krofdorfer Forst</i>	56	8	36	18	50

#### IOBT965

Harz	109	11	66	26	39
Lüneburger Heide	110	11	66	28	42
Solling	44	8	36	11	31
<i>Krofdorfer Forst</i>	56	6	21	10	48

#### CSSM16

Harz	109	8	36	23	64
Lüneburger Heide	110	8	36	25	69
Solling	44	5	15	11	73
<i>Krofdorfer Forst</i>	56	4	10	10	100

#### MM12

Harz	109	3	6	5	83
Lüneburger Heide	110	4	10	7	70
Solling	44	3	6	3	50
<i>Krofdorfer Forst</i>	56	3	6	5	83

#### RME25

Harz	109	3	6	6	100
Lüneburger Heide	110	5	15	8	53
Solling	44	3	6	4	67
<i>Krofdorfer Forst</i>	56	3	6	5	83

N: Anzahl untersuchter Tiere

## 5.5 Schlussfolgerung

Fasst man die eigenen Ergebnisse und die Vergleiche mit publizierten Daten zusammen, so kann man feststellen, dass die Hirsche im Krofdorfer Forst unterdurchschnittlich viele Allele haben, diese aber teils in günstiger Frequenz verteilt sind.

Mit sechs von 14 Mikrosatelliten, beziehungsweise fünf von 17 Mikrosatelliten entsprechen überdurchschnittlich viele Mikrosatelliten signifikant nicht den Bedingungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes. In keiner anderen Untersuchung ist diese Signifikanz so groß.

Mit sieben verschiedenen Allelen beim Mikrosatelliten RT1 haben die Krofdorfer Hirsche deutlich mehr Allele als die Hirsche in Hasselbusch mit vier Allelen, bei denen Brachygnathie und fehlende Augenanlagen, als Anzeichen einer Inzuchtdepression gewertet, beschrieben wurden.

Andererseits sind die Heterozygotiewerte und die durchschnittliche Allelzahl nur geringfügig besser als die Werte aus den isolierten Populationen Isarau und Hassberge aus Bayern. Die Werte dieser beiden Populationen werden von den Autoren als genetisch stabil mit moderater Drift und ohne Gefahr einer Inzuchtdepression interpretiert.

Aufgrund des hohen Stichprobenumfangs in Relation zur Populationsgröße fällt die geringe Allelzahl der Krofdorfer Hirsche stark ins Gewicht. Eine laufende Untersuchung von älteren Abwurfstangen und Geweihen aus dem Krofdorfer Forst zeigt, dass es über die letzten circa 50 Jahre zu einem Verlust in der Gesamtzahl der Allele kam (persönliche Mitteilung Dr. Willems, Justus-Liebig-Universität Gießen).

Der relativ große Stichprobenumfang in dieser Arbeit könnte auch ursächlich für die günstige Frequenzverteilung der Allele und die effektive Allelzahl sein. Ebenso könnte vereinzelte Immigration einer benachbarten, nicht stark differenzierten Population ursächlich für die gute effektive Allelzahl sein.

Um zu klären, wie stark und wie lange die Krofdorfer Population schon isoliert und differenziert ist, sind weitere Untersuchungen nötig. Dazu müssten die direkt benachbarten Populationen, besser noch alle hessischen, die nördlichen rheinlandpfälzischen und die südlichen nordrheinwestfälischen Populationen, untersucht werden. Mit diesen Populationen ist theoretisch durch Migration ein Genaustausch möglich.

Somit kann man feststellen, dass es sich bei der Hirschpopulation im Krofdorfer Forst um eine isolierte Population handelt. Ungefähr  $\frac{2}{3}$  der Mikrosatelliten weisen eine, teils moderate, Drift auf, bei  $\frac{1}{3}$  der Mikrosatelliten sind die Allelfrequenzen nahezu gleichmäßig verteilt. Die geringe Allelzahl ist sehr bedenklich, eine direkte Gefahr einer in wenigen Generationen drohenden Inzuchtdepression kann aus den Ergebnissen aber nicht abgeleitet werden. Weitere Untersuchungen, insbesondere der direkte Vergleich mit direkten Nachbarpopulationen sind nötig, um den genetischen Zustand der Hirsche aus dem Krofdorfer Forst abschließend beschreiben zu können.

## 6 Zusammenfassung

Das Rotwild (*Cervus elaphus L.*) als größtes freilebendes Wildtier in Deutschland darf sich in Hessen, gesetzlich verordnet, nur in ausgewiesenen Rotwildgebieten aufhalten. Wie sich diese Verinselung auf die Genetik auswirkt, wurde bei der Rotwildhegegemeinschaft Krofdorfer Forst untersucht. In diesem circa 16.000 ha großen Rotwildgebiet, nördlich von Gießen gelegen, leben schätzungsweise 300 Hirsche.

Aus 108 Abwurfstangen und 41 Geweihen von insgesamt 56 Hirschen wurden Bohrproben gewonnen. Für die DNA-Isolierung aus den Knochenspänen wurde eine Methode etabliert. Mit 17 Mikrosatelliten in fünf Multiplex-Ansätzen wurden mit den DNA-Proben PCR-Amplifikate gewonnen. Diese so gefundenen Allele wurden mit Polyacrylamid-gelelektrophorese ihrer Länge nach getrennt und ausgewertet. Stichprobenweise wurden die gefundenen Allellängen mit Pyrosequenzierungen und Einzelsequenzierungen nach Sanger überprüft.

Die phänotypische Zuordnung der Abwurfstangen durch Mitarbeiter der Hegegemeinschaft wurde anschließend genetisch überprüft. Vier von 108 Stangen waren falsch zugeordnet worden. Dies entspricht einer Genauigkeit von 96,3 %.

Mit GenAlEX<sup>®</sup>, einem frei erhältlichen genetischen Auswertetool für Microsoft Excel, wurden Kennzahlen der Mikrosatelliten und der Population berechnet. Genetische Distanzen konnten damit dargestellt werden. Hirsche, die zu einem Erhalt oder einer Verbesserung der genetischen Diversität beitragen, konnten identifiziert werden.

Die berechneten Kennzahlen wurden mit den Kennzahlen von insgesamt 93 Populationen aus Europa und drei Populationen aus Nordafrika verglichen. Ein direkter Vergleich der Populationskennzahlen ist kaum möglich, da bei den Untersuchungen verschiedenste Mikrosatelliten an unterschiedlichsten Stichprobenumfängen getestet wurden. Deshalb wurden auch Vergleiche mit einzelnen Mikrosatellitenergebnissen durchgeführt.

Fünf von 17 Mikrosatelliten entsprechen signifikant nicht den Bedingungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes. In keiner anderen Untersuchung ist diese signifikante Abweichung so groß.

Im Vergleich zu bayerischen Populationen (hohe Übereinstimmung der verwendeten Mikrosatelliten) sind die Kennzahlen aus dem Krofdorfer Forst unterdurchschnittlich, aber auf ähnlichem Niveau. Die bayerischen Populationen werden als genetisch stabil, mit moderater Drift, ohne Anzeichen einer Inzuchtdepression beschrieben. Diese Annahme der

Autoren der bayerischen Untersuchung trifft auch für die Hirsche im Krofdorfer Forst annähernd zu.

Die Allelanzahl ist allerdings bei den Rothirschen im Krofdorfer Forst unterdurchschnittlich. Sie beträgt 81,6% der mittleren Allelanzahl der anderen Untersuchungen. Diese wenigen Allele sind in günstigen Frequenzen verteilt.

Bei den Rothirschen der Rotwildhegegemeinschaft Krofdorfer Forst handelt es sich somit um eine kleine, stark isolierte Population mit unterdurchschnittlicher Allelanzahl. Eine direkte Gefahr einer Inzuchtdepression kann aus den Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Die Population erscheint genetisch stabil mit einer moderaten Drift. Die unterdurchschnittliche Allelanzahl sollte jedoch als drohende Gefahr für eine Inzuchtdepression gewertet werden. Um eine Aussage über das Maß der Isolation und den Grad der Differenzierung zu benachbarten Populationen treffen zu können, sind weitere Untersuchungen nötig.

## 7 Summary

The red deer (*Cervus elaphus L.*) is the biggest wild animal in Germany. The provisions of the hunting law of the federal state Hessen describe, that red deer only has to live in designated areas. The way the genetic structure changed due to “isolation by law” was analyzed by the Rotwildhegegemeinschaft Krofdorfer Forst. There are approximately 300 red deer in this area with about 16.000 hectares situated in the north of Gießen in the middle of Hessen.

Drill samples from parts of 108 antlers and 41 sets of antlers shed by 56 stags were collected. A method for DNA-Isolation from the bone samples was established. PCR-amplifications were performed using 17 microsatellite loci in five multiplex polymerase chain reactions. Using polyacrylic gel electrophoreses the genotypes were analyzed. Random cross checks were made on a few samples using sanger sequencing and pyrosequencing.

A phenotypic correlation of the antlers of the stags produced by members of the Hegegemeinschaft was compared to this genetic structure. Only four of the 108 antlers were mismatched, indicating an accuracy of 96,3 %.

Genetic data was generated from the used microsatellites and the analyzed population using GenAIX<sup>®</sup> (a free evaluation software). Genetic distances could be visualized. Stags that were saving or increasing the genetic diversity could be identified.

The results from Krofdorfer Forst were compared with the results from 93 European deer populations and three deer populations from North Africa. A direct comparison was difficult due to the diversity and differences between the microsatellites used. Therefore comparisons would only be completed between those microsatellites that matched.

Five out of 17 microsatellites showed a significant deviation from Hardy-Weinberg-equilibrium. No other study indicates such a significant divergence.

When compared with the Bavarian deer populations (14 microsatellites used in both studies), the results from the Krofdorf population was below average, but in the same range. The analysts of the Bavarian study concluded, that the Bavarian deer populations were genetically stable, with a moderate drift but no indication of inbreeding. These conclusions were similar for the Krofdorf deer population.

The number of alleles was below average, in the Krofdorf deer population being 81,6 % of the average of the other studies. These smaller alleles however were distributed in better frequencies.

The Rotwildhegegemeinschaft Krofdorfer Forst is a small isolated deer population with a below average number of alleles. The results to date do not shown signs of inbreeding depression, the deer population appears to be in a stabile genetic state with a moderate drift, but does not eliminate the potential risk of inbreeding.

The below average number of alleles should be estimated as a high risk of inbreeding depression.

In order to relate the rate of isolation or the rate of diversity to neighboring deer populations more studies are necessary.

## Literaturverzeichnis

AVBayJG (2008) Verordnung zur Ausführung des Bayerischen Jagdgesetzes in der Fassung vom 03.07.2008, URL: <http://www.gesetze-bayern.de> (Stand 01.12.2012).

Beninde, J. (1937) *Zur Naturgeschichte des Rothirsches*, Leipzig: Verlag Paul Schöps.

BayJG (2007) Bayerisches Jagdgesetz in der Fassung vom 20.12.2007; URL: <http://www.gesetze-bayern.de> (Stand 01.12.2012).

BJagdG (2011) Bundesjagdgesetz in der Fassung vom 06.12.2011; URL: <http://www.juris.de> (Stand 01.12.2012).

Boßler, I. (1994) *Mengen- und Spurenelementgehalte in Rehgeweihen verschiedener Herkunft*, Gießen: Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität.

Brandt, H. und Möllers, B. (1999) Inzuchtdepression bei Merkmalen der Fruchtbarkeit und der Gewichtsentwicklung beim Göttinger Miniaturschwein, Arch. Tierz., Dummerstorf 42, 6, 601-610.

Bubenik, A. B. (1966) *Das Geweih – Entwicklung, Aufbau und Ausformung der Geweihe und Gehörne und ihre Bedeutung für das Wild und für die Jagd*, Hamburg und Berlin: Verlag Paul Parey.

Bützler, W. (2001) *Rotwild, Biologie, Verhalten, Umwelt, Hege*, 5. Aufl., München Wien Zürich: BLV Verlagsgesellschaft mbH.

Clements, M. N., Clutton-Brock, T. H., Albon, S. D., Pemberton, J. M. und Kruuk, L. E. B. (2010) Getting the timing right: antler growth phenology and sexual selection in a wild red deer population, Oecologia 164, 357- 368.



- Dzieciolowski, R. (1969) The quantity, quality and seasonal variation of food resources available to red deer in various environmental conditions of forest Management, Warschau: For Res. Inst.
- Feulner, P. G. D., Bielfeldt, W., Zachos, F. E., Bradvarovic, J., Eckert, I. und Hartl, G. B. (2004) Mitochondrial DNA and microsatellite analyses of the genetic status of the presumed subspecies *Cervus elaphus montanus* (Carpathian red deer), *Heredity* 93, 299- 306.
- Frantz, A. C., Hamann, J. L. und Klein, F. (2008) Fine-scale genetic structure of red deer (*Cervus elaphus*) in a French temperate forest, *Eur J Wildl Res* 54, 44- 52.
- Haanes, H., Røed, K. H., Flagstad, Ø. und Rosef, O. (2010) Genetic structure in an expanding cervid population after population reduction, *Conserv Genet* 11, 11- 20.
- Hajji, G. M., Zachos, F. E., Charfi-Cheikrouha, F. und Hartl, G. B. (2007) Conservation genetics of the imperiled Barbary red deer in Tunisia, *Animal Conservation* 10, 229- 235.
- Hajji, G. M., Cheikrouha, F. C., Lorenzini, R., Vigne, J. D., Hartl, G. B. und Zachos, F. E. (2008) Phylogeography and founder effect of the endangered Corsican red deer (*Cervus elaphus corsicanus*), *Biodivers Conserv* 17, 659- 673.
- Hancock, J. M. (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms, in: Goldstein, D. B. und Schlötterer, C. (ed.), *Microsatellites - Evolution and application*, Oxford: Oxford University Press, 1- 6.
- Harding, R. M., Boyce, A. J. und Clegg, J. B. (1992) The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules, *Genetics* 132, 847- 859.
- Hartl, G. B., Vodnansky, M., Suchentrunk, F., Steinbeck, T., Willing, R., Tataruch, F. und Oberwalder, U. (1991) Fortpflanzungsstörungen in einer Feldhasenzucht - Folge einer Inzuchtdepression? *Verhandlungsberichte, Erkrankungen., Zootiere* 33, 17- 26.
- Hessen-Forst (2007): Informationsbroschüre Wildpark „Tiergarten Weilburg“.

Herzog, S. (1988) Polymorphism and genetic control of erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase in the genus *Cervus*, Anim. Genet. 19, 291- 294.

Herzog, S. (1990) Genetic analysis of erythrocyte superoxide dismutase polymorphism in the genus *Cervus*, Anim. Genet. 21, 391- 400.

Herzog, S., Mushövel, C., Hattemer, H. H. und Herzog, A. (1991) Transferrin polymorphism and genetic differentiation in *Cervus elaphus* L. (European red deer) populations, Heredity 67, 231- 239.

Herzog, S. (2006) *Rothirsch und Rotwildgebiete in Deutschland- Geschichte und politische Bedeutung*, Tagungsband, 3. Rotwildsymposium „Freiheit für den Rothirsch“ der Deutschen Wildtier Stiftung, Berlin, 43- 62.

HJagdG (2011) Hessisches Jagdgesetz in der Fassung vom 10.06.2011; URL: <http://www.rv.hessenrecht.hessen.de> (Stand 01.12.2012).

Hmwe, S. S., Zachos, F. E., Sale, J. B., Rose, H. R. und Hartl, G. B. (2006a) Genetic variability and differentiation in red deer (*Cervus elaphus*) from Scotland and England, Journal of Zoology 270, 479- 487.

Hmwe, S. S., Zachos, F. E., Eckert, I., Lorenzini, R., Fico, R. und Hartl, G. B. (2006b) Conservation genetics of the endangered red deer from Sardinia and Mesola with further remarks on the phylogeography of *Cervus elaphus corsicanus*, Biological Journal of the Linnean Society 88, 691– 701.

Hofmann, R. R. (1981) Über die Notzeit des Schalenwildes in der Kulturlandschaft – wissenschaftliche Erkenntnisse, gesetzliche Bestimmungen und Hegepraxis, Wildbiol. Inform. für d. Jäger. Bd. IV, 95- 107, Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.

Kinser, A. und Herzog, S. (2008) *Genetisches Monitoring von Rotwild in Niedersachsen - Ergebnisse einer Langzeitstudie*, Endbericht, Hamburg: Deutsche Wildtier Stiftung.

Kraus, P. (1985) Weiser für die Rotwildddichte?, Die Pirsch 12, 792– 795.

- Kuehn, R., Schroeder, W., Pirchner, F. und Rottmann, O. (2003) Genetic diversity, gene flow and drift in Bavarian red deer populations (*Cervus elaphus*), *Conservation Genetics* 4, 157-166.
- Kuehn, R., Haller, H., Schroeder, W., und O. Rottmann (2004) Genetic Roots of the Red Deer (*Cervus elaphus*) Population in Eastern Switzerland, *Journal of Heredity* 95 (2), 136- 143.
- Levinson, G. und Gutman, G. A. (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution, *Molecular Biology and Evolution* 4, 203- 221.
- Litt, M. und Luty, J. A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene, *American Journal of Human Genetics* 44, 397- 401.
- McDevitt, A. D., Edwards, C. J., O'Toole, P., O'Sullivan, P., O'Reilly, C. und Carden, R. F. (2009) Genetic structure of, and hybridisation between, red (*Cervus elaphus*) and sika (*Cervus nippon*) deer in Ireland, *Mammalian biology* 74, 263- 273.
- Mushövel, C. (1986) *Serumtransferrine von Rotwild (Cervus elaphus L.) und Rehwild (Capreolus capreolus L.)*, Gießen: Dissertationsschrift, Justus-Liebig-Universität.
- Nielsen, E. K., Olesen, C. R., Pertoldi, C., Gravlund, P., Barker, J. S. F., Mucci, N., Randi, E. und Loeschcke, V. (2008) Genetic structure of the Danish red deer (*Cervus elaphus*), *Biological Journal of the Linnean Society* 95, 688- 701.
- Nussey, D. H., Pemberton, J., Donald, A. und Kruuk, L. E. B. (2006) Genetic consequences of human management in an introduced island population of red deer (*Cervus elaphus*), *Heredity* 97, 56- 65.
- Nussey, D. H., Kruuk, L. E. B., Morris, A. und Clutton-Brock, T. H. (2007) Environmental conditions in early life influence ageing rates in a wild population of red deer, *Current Biology* 17, 1000- 1001.

Ohta, T. (1982) Population genetics of multigene families, *Advances in Biophysics* 15, 173-179.

Peakall, R. und Smouse, P. E. (2006) *GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research*, *Molecular Ecology Notes*. 6, 288- 295.

Petrak, M. (1982) *Etho-ökologische Untersuchungen an einer Rothirschpopulation (Cervus elaphus Linné, 1758) der Eifel unter besonderer Berücksichtigung des stoffwechselbedingten Verhaltens*, Gießen: Schriftenreihe des Arbeitskreises Wildbiologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen e.V., Heft 10.

Poetsch, M., Seefeldt, S., Maschke, M. und Lignitz, E. (2001) Analysis of microsatellite polymorphism in red deer, roe deer, and fallow deer - possible employment in forensic applications, *Forensic Science International* 116, 1- 8.

Reichholf, J. H. (2006) *Rothirsch und Mensch – eine Bestandsaufnahme*, Tagungsband, 3. Rotwildsymposium „Freiheit für den Rothirsch“ der Deutschen Wildtier Stiftung, Berlin, 29-42.

Renecker, L. A., Blake, J. E. (1993) Congenital defects in reindeer: a production issue, Circular 87, URL: <http://reindeer.salrm.uaf.edu> (Stand 01.12.2012).

Rice, W. R. (1989) Analyzing tables of statistical tests, *Evolution* 43, 22- 225.

Rösener, W. (2004) *Die Geschichte der Jagd*, Düsseldorf und Zürich: Artemis & Winkler Verlag.

Sanchez-Fernandez, B., Soriguer, R. und Rico, C. (2008) Cross-species tests of 45 microsatellite loci isolated from different species of ungulates in the Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) to generate a multiplex panel, *Molecular Ecology Resources* 8, 1378-1381.

Schlötterer, C. und Tautz, D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA, *Nucleic Acids Res.* 20, 211- 215.

Schlötterer, C. (2004) Opinion: The evolution of molecular markers - just a matter of fashion?, *Nature Rev. Genet.* 5, 63- 69.

Skog, A., Zachos, F. E., Rueness, E. K., Feulner, P. G. D., Mysterud, A., Langvatn, R., Lorenzini, R., Hmwe, S. S., Lehoczy, I., Hartl, G. B., Stenseth, N. C. und Jakobsen, K. S. (2009) Phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) in Europe, *Journal of Biogeography* 36, 66- 77.

Slate, J., Van Stijn, T. C., Anderson, R. M., McEwan, K. M., Maqbool, N. J., Mathias, H. C., Bixley, M. J., Stevens, D. R., Molenaar, A. J., Beever, J. E., Galloway, S. M. und Tate, M. L. (2002) A Deer (Subfamily *Cervinae*) Genetic Linkage Map and the Evolution of Ruminant Genomes, *Genetics* 160, 1587- 1597.

Ströhlein, H., Herzog, S. und Herzog, A. (1991) Veränderungen der Isoenzymgenetik bei Rotwildpopulationen (*Cervus elaphus* L.) aus Niedersachsen und Sachsen- Anhalt im Zusammenhang mit der Aufhebung der innerdeutschen Grenze, *Z. Jagdwiss.* 41, 65- 68.

Ueckermann, E. (1960) *Wildstandsbewirtschaftung und Wildschadenverhütung beim Rotwild*, Hamburg, Berlin: Parey Verlag.

Von Raesfeld, F. und Reulecke, K. (1988) *Das Rotwild, Naturgeschichte, Hege, Jagdausübung*, 9. Aufl., Hamburg und Berlin: Verlag Paul Parey.

Walling, C. A., Nussey, D. H., Morris, A., Clutton-Brock, T. H., Kruuk, L. E. B. und Pemberton, J. M. (2011) Inbreeding depression in red deer calves, *BMC Evolutionary Biology* 11, 318.

Wokac, R. M. (2003) Bedeutung der Inzucht bei Tauernschecken-Ziegen, *Arch. Tierz., Dummerstorf* 46, 5, 455-469.

Zachos, F. E., Hartl, G. B., Apollonio, M. und Reutershahn, T. (2003) On the phylogeographic origin of the Corsican red deer (*Cervus elaphus corsicanus*): evidence from microsatellites and mitochondrial DNA, *Mammalian Biology* 68, 284- 298.

Zachos, F. E., Althoff, C., v. Steynitz, Y., Eckert, I. und Hartl, G. B. (2007) Genetic analysis of an isolated red deer (*Cervus elaphus*) population showing signs of inbreeding depression, Eur J Wildl Res 53, 61- 67.

Zsolnai, A., Lehoczky, I., Gyurmán, A., Nagy, J., Sugár, L., Anton, I., Horn, P. und Magyary, I. (2009) Development of eight-plex microsatellite PCR for parentage control in deer, Archiv Tierzucht 52, 2, 143-149.

# Anhang

Tab.61: Probenahmeprotokolle

Probenahme am 02.06.2010 im Forsthaus Waldhaus					
Proben-nummer	Hirsch-nummer	Fundjahr	rechte Stange / linke Stange	Masse in g	Bemerkung
101	100	2009	rechts	2960	
102	100	2006 ?	rechts	1955	
103	52	2003	rechts	1990	
104	52	2004	rechts	2360	
105	52	2005	rechts	2500	
106	52	2007	rechts	3070	
107	52	2010	links	2810	
108	52	2008	rechts	k.A.	
109	52	2009	links	2860	
110	52	2008	links	k.A.	
111	52	2007	links	3000	
112	52	2005	links	2580	
113	52	2004	links	2360	
114	52	2003	links	1840	
115	52	2002	links	1430	
116	62	2003	rechts	1280	
117	62	2004	rechts	2000	
118	62	2005	rechts	2280	
119	62	06 / 07 ?	rechts	2320	
120	62	09 / 07 ?	rechts	2440	
121	62	2010	rechts	2580	
122	62	2010	links	2250	
123	62	2009	links	2330	
124	62	2007	links	2050	
125	62	07 / 06 ?	links	2740	
126	62	2005	links	2010	
127	62	2003	links	1260	
128	83	2007	rechts	2460	
129	83	2009	rechts	2600	
130	83	2010	rechts	2750	
131	83	2008	rechts	k.A.	auf Kunstkopf montiert
132	83	2008	links	k.A.	auf Kunstkopf montiert

Fortsetzung Tab.61: Probenahmeprotokolle

Proben-nummer	Hirsch-nummer	Fundjahr	rechte Stange / linke Stange	Masse in g	Bemerkung
133	83	2010	links	2650	
134	83	2009	links	2540	
135	83	2007	links	2500	
136	83	2006	links	2080	
137	59	2004	rechts	2040	
138	59	2005	rechts	k.A.	
139	59	2006	rechts	2490	
140	59	2007	rechts	k.A.	
141	59	2008	rechts	k.A.	
142	59	2009	rechts	k.A.	
143	59	2009	links	k.A.	
144	59	2007	links	k.A.	
145	59	2006	links	2450	
146	59	2005	links	k.A.	
147	59	2004	links	2050	
148	26	2008	rechts	2810	Hirschnummer auch 114
149	26	2009	rechts	3380	Hirschnummer auch 114
150	26	2009	links	3350	Hirschnummer auch 114
151	26	2008	links	2500	Hirschnummer auch 114
152	26	08 ?	links	1620	Hirschnummer auch 114
153	70	2006	rechts	1700	
154	70	2008	rechts	2500	
155	70	2009	rechts	2790	
156	70	2010	rechts	2630	
157	70	2010	links	2520	
158	70	2009	links	2770	
159	70	2008	links	2330	
160	70	07 ?	links	2190	
161	70	2006	links	1850	

Probenahme am 03.06.2010 im Forsthaus Waldhaus					
162	59	2009	Schädel	k.A.	2009 erlegt
163	26	2009	Schädel	k.A.	2009 erlegt (Nr. 114)
164	72	2006	rechts	1800	
165	72	2008	rechts	2150	
166	72	2009	rechts	2080	
167	72	2009	links	2200	



Fortsetzung Tab.61: Probenahmeprotokolle

Proben- nummer	Hirsch- nummer	Fundjahr	rechte Stange / linke Stange	Masse in g	Bemerkung
168	72	2008	links	2060	
169	72	2007	links	2030	
170	90	2008	rechts	2200	
171	90	2010	rechts	2960	
172	90	2010	links	2560	
173	90	2009	links	2430	
174	90	2008	links	2030	
175	90	2007	links	1800	
176	100	06 / 09 ?	rechts	1955	= Probennummer 102
177	100	2010	rechts	3110	
178	100	2010	links	3000	
179	100	2009	links	2900	
180	100	2008	links	2000	
181	86	2009	rechts	k.A.	
182	86	2010	rechts	2530	
183	86	2010	links	2220	
184	86	2009	links	k.A.	
185	101	2007	rechts	1510	Hirschnummer auch 94
186	101	2009	rechts	2100	Hirschnummer auch 94
187	101	2008	rechts	1990	Hirschnummer auch 94
188	101	2008	links	1980	Hirschnummer auch 94
189	104	2008	rechts	2670	
190	104	2010	rechts	3190	
191	104	2010	links	3160	
192	104	2008	links	2380	
193	68	2008	rechts	2010	
194	68	2009	rechts	2560	
195	68	2010	rechts	2280	
196	68	2010	links	2360	
197	68	2008	links	1960	
198	68 ?	09 /08 ?	links	2300	
199	91	2008	rechts	1810	
201	91	2009	rechts	1990	
202	91	2010	rechts	1980	
203	91	2009	links	1860	
204	91	2008	links	1780	

Fortsetzung Tab.61: Probenahmeprotokolle

Proben-nummer	Hirsch-nummer	Fundjahr	rechte Stange / linke Stange	Masse in g	Bemerkung
205	91	2005	rechts	990	
206	91	2006	rechts	1350	
207	92	2008	rechts	1700	
208	92	2009	rechts	2260	
209	92	2010	rechts	2140	
210	92	2010	links	1910	
211	92	2009	links	2030	
212	92	2008	links	1690	

Probenahme im Forstamt Wetttenberg am 08.06.2010 (alles Schädel)					
Probennr.	int. Hirschnr.	Datum	Alter in Jahren	Klasse	Bemerkungen
221	T 221	2009	2	III	
222	T 222	2009	2	III	
223	T 223	2007	1	III	
224	T 224	2007	4	III	
225	T 225	2009	2	III	Unfall
226	T 226	2009	1	III	
227	T 227	2008	2	k. A.	
228	T 228	2009	2	III	
229	T 229	2007	k. A.	k. A.	
230	T 230	2009	1	k. A.	
231	T 231	2007	2	III	verludert gefunden
232	T 232	2008	k. A.	III	
233	T 233	2007	k. A.	III	

Fortsetzung Tab.61: Probenahmeprotokolle

Probennr.	int. Hirschnr.	Datum	Alter in Jahren	Klasse	Bemerkungen
234	T 234	2007	1	II	
235	T 235	2008	1	III	
236	T 236	2009	3	k. A.	
237	T 237	2008	1	III	
238	T 238	2008	k. A.	k. A.	
239	T 239	2008	1	III	
240	T 240	2007	4 - 5	III	
241	T 241	2008	7 - 8	II	
242	T 242	k. A.	k. A.	k. A.	
243	T 243	2009	11	I	
244	T 244	k. A.	k. A.	k. A.	
245	T 245	2008	2	III	
246	T 246	2009	2	III	
247	T 247	2009	2	III	
248	T 248	2007	k. A.	III	
249	T 249	2008	k. A.	III	
250	T 250	2009	2	III	
251	T 251	2007	2	III	
252	T 252	2008	1	III	
253	T 253	k. A.	5	II	Verkehr
254	T 254	2008	3	II	
255	T 255	2007	1	III	
256	T 256	2008	2	III	
257	T 257	2007	6	II	verludert gefunden
258	T 258	2009	k. A.	III	
259	T 91	k. A.	10	III	Hirsch 91

k. A. = keine Angabe

## Anhang 1: Arbeitsanweisung DNA-Isolierung

Sofern keine Temperaturangaben gemacht werden, erfolgt die Probenaufarbeitung bei Raumtemperatur. Materialien aus dem Invisorb® Spin Forensic Kit sind kursiv dargestellt:

Zur Vorbereitung einer Probe werden 480 mg bis 500 mg Bohrspäne in ein 2 ml-Eppendorfcup eingewogen, eine Stahlkugel zugefügt und die Probe 2 min bei 25 Hz in der Kugelmühle gemahlen. Die Kugel wird mit Hilfe einer Magnetangel aus dem Cup entfernt.

Zu der gemahlenen Probe werden *1 ml Bone Lysis Enhancer* zupipettiert, die Probe kurz geschnippt und eine Stunde zur Inkubation stehen gelassen.

Nach kurzem Zentrifugieren werden 300 µL der Probelösung in ein *Receiver Tube* überführt, die restliche Probe verworfen.

Es werden 300 µl *Lysis Buffer M* und 30 µl *Proteinase K* zupipettiert und das Tube eine Stunde lang bei 56 °C im Thermocycler unter Schütteln inkubiert.

Im Anschluss werden 600 µl *Binding Buffer B6* zupipettiert und die Probe vorsichtig durch viermaliges Aufziehen in der Pipette gemischt. Die gemischte Probe wird mit der Pipette auf ein *RTA Spin Filter* überführt und 1 min in der Zentrifuge mit 12.000 rpm zentrifugiert.

Das Filtrat wird verworfen, 300 µl *Wash Buffer I* auf den Spin Filter zugefügt und 30 s bei 12.000 rpm zentrifugiert.

Der *Spin Filter* wird in ein neues *RTA Receiver Tube* eingesetzt, 600 µl *Wash Buffer II* zupipettiert und für 30 s bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das alte Tube wird verworfen.

Nach dem zweiten Waschschrift wird das Filtrat verworfen und die Probe 2 min bei 12.000 rpm trocken zentrifugiert.

Der *Spin Filter* wird in ein mit der Probennummer beschriftetes *1,5 ml Receiver Tube* eingesetzt, 70 µl des auf 56 °C vorgewärmten *Elution Buffer D* zupipettiert und 1 min inkubiert.

Danach wird 1 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Der Filtereinsatz wird verworfen und die so gewonnene DNA-Probe bei -20°C gelagert.

Tab. 62: DNA-Konzentrationen

Proben- nummer	c <sub>DNA</sub> in ng/μL	Proben- nummer	c <sub>DNA</sub> in ng/μL	Proben- nummer	c <sub>DNA</sub> in ng/μL	Proben- nummer	c <sub>DNA</sub> in ng/μL
101	90,3	141	105,9	181	112,2	221	14,4
102	97,5	142	96,8	182	36,3	222	38,0
103	92,7	143	35,8	183	117,1	223	27,0
104	88,4	144	90,8	184	44,8	224	4,8
105	109,4	145	56,4	185	39,1	225	1,6
106	66,7	146	68,0	186	26,5	226	28,9
107	87,6	147	99,5	187	44,2	227	8,8
108	87,8	148	47,3	188	86,3	228	4,2
109	85,2	149	74,3	189	99,1	229	25,5
110	30,5	150	58,8	190	96,1	230	19,1
111	80,6	151	10,2	191	79,8	231	87,3
112	53,5	152	62,5	192	57,4	232	286,6
113	96,6	153	86,4	193	65,0	233	14,9
114	80,7	154	80,4	194	57,8	234	247,7
115	92,8	155	32,5	195	83,0	235	23,4
116	96,0	156	83,4	196	13,7	236	105,4
117	27,5	157	78,0	197	26,0	237	100,7
118	124,8	158	72,4	198	9,9	238	48,3
119	127,1	159	72,5	199	18,6	239	172,2
120	111,8	160	81,9	201	22,7	240	31,9
121	101,2	161	61,2	202	37,8	241	6,6
122	120,8	162	65,0	203	17,8	242	5,4
123	61,3	163	79,2	204	12,9	243	10,5
124	101,1	164	40,5	205	10,3	244	43,5
125	122,0	165	46,2	206	19,5	245	226,5
126	51,2	166	42,9	207	26,6	246	43,9
127	124,9	167	92,7	208	8,5	247	14,0
128	84,0	168	42,9	209	19,1	248	18,1
129	76,8	169	75,0	210	19,7	249	24,2
130	101,0	170	57,7	211	16,1	250	5,1
131	73,2	171	43,1	212	14,5	251	6,2
132	16,4	172	7,0			252	3,7
133	58,9	173	47,4			253	2,6
134	1,7	174	59,8			254	53,0
135	13,2	175	59,3			255	12,6
136	70,6	176	70,3			256	63,6
137	66,8	177	37,6			257	11,2
138	89,4	178	61,9			258	14,6
139	10,5	179	88,2			259	38,7
140	96,5	180	78,1				

Tab 63: Sequenzen der getesteten Primer

int. Nr.	Name	Sequenz Forward 5'-3'	Sequenz Reverse 5'-3'
1	IOBT965	IRD800-GGGGTTGTGGGTAAGCGGAGTT	GATCTAGCGCCAGACAGACGTGTCAT
2	CSSM16	IRD800-AGAGCCACTTGTTACACCCCAAAG	GATGCAGTCTCCACTTGATTCAAA
3	MM12	IRD800-CAAGACAGGTGTTTCAATCT	ATCGACTCTGGGGATGATGT
4	RME25	IRD800-AGTGGGTAAAGGAGCCTGGT	TTAAAGATCCCAGCCTGTGC
5	Haut14	IRD800-CCAGGGAAGATGAAGTGACC	TGACCTTCACTCATGTTATTAA
6	Cer14	IRD800-TCTCTGCGTCTCCTGCATTGAC	AATGGCACCCACTCCAGTATTCTTC
7	INRA35	IRD800-TTGTGCTTTATGACACTATCCG	TTTGCAGCCTCCACATTG
8	CSPS115	IRD800-AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG	AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG
9	CSSM22	IRD800-TCTCTCTAATGGAGTTGGTTTTTG	CTTTCTCTTCAATCAATCCTCATC
10	ETH225	IRD800-ACATGACAGCCAGCTGCTACT	GATCACCTTGCCACTATTTCTT
11	ETH3	IRD800-GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG	ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG
12	CSSM19	IRD800-TTGTGAGCAACTTCTTGATCTTT	TGTTTTAAGCCACCCAATTATTTG
13	CSRM60	IRD800-AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGCA	GGACCAGATCGTGAAAGGCATAG
14	BM1818	IRD800-AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	AGCTGGGAATATAACCAAAGG
15	IOBT918	IRD800-ACTTATGAAAAATTACTGAGAGCG	TTACTACTCCTGTGCGCTCTGA
16	CSSM66	IRD800-AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG	ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTTGA
17	CSSM14	IRD800-AAATGACCTCTCAATGGAAGCTTG	GAATTCTGGCACTTAATAGGATTCA
18	Haut24	IRD800-CTCTCTGCCTTTTTCCCTGT	AATACACTTTAGGAGAAAAATA
19	ILSTS06	IRD800-TGTCTGTATTTCTGCTGTGG	ACACGGAAGCGATCTAAACG
20	RT1	IRD800-TGCCTTCTTTCATCCAACAA	CATCTTCCCATCCTCTTTAC
21	RT6	IRD800-TTCCTCTTACTCATTCTTGG	CGGATTTTGACACTGTTAC
22	NVHRT48	IRD800-CGTGAATCTTAACCAGGTCT	GGTCAGCTTCATTTAGAAAC

## Anhang 2: Arbeitsanweisung zum Gießen eines PAGE-Gels

### **Gießen eines 6%-igen Polyacrylamidgels**

#### Vorbereiten der Platten:

- Die hintere Platte (Platte ohne Aussparung) auf eine glatte Unterlage legen
- An den linken und rechten Rand der Platte Abstandshalter (Spacer, 0,25 mm) anlegen
- Frontplatte bündig auf die hintere Platte legen, so dass die Abstandshalter nicht überstehen
- links und rechts die Klammern anlegen und mit dem unteren Rand bündig ausrichten
- Klammern handfest anziehen
- Platten mit der oberen Kante auf eine Schaumstoffunterlage leicht erhöht lagern

#### Ansetzen des Polyacrylamidgels:

- 250 ml- Becherglas auf die Waage stellen und tarieren
- 8,4 g Harnstoff; 2,4 ml Long Ranger und 2,4 ml 10 x TBE-Puffer in das Becherglas einwiegen und mit aq. bidest. auf 22,5 g auffüllen
- Harnstoff durch leichtes Schwenken des Becherglases in Lösung bringen
- Kurz vor dem Gießen 135 µl 10%-iges APS und 13,5 µl TEMED zugeben und leicht schwenken

#### Gießen des Gels:

- Gellösung langsam am erhöhten oberen Rand zwischen die Platten füllen
- Eingeschlossene Luftblasen durch Klopfen auf die entsprechende Stelle auflösen
- Das Befüllen beenden, sobald das Gel bündig den unteren Plattenrand erreicht hat
- Schaumstoffunterlage entfernen und Platten flach hinlegen
- Eingeschlossene Luftblasen mit einem Drahhaken vorsichtig herausziehen
- Haifischkamm mit der flachen Seite blasenfrei in die Plattenaussparung einsetzen
- wenn nötig am Kamm gelfreie Stellen mit Gel auffüllen
- Platzhalter in die Aussparung der Klammern einsetzen und Schrauben handfest anziehen
- Einmaltücher mit aq. dest. befeuchten und damit die Kanten der Platten bedecken

- die Polymerisation des Gels dauert ca. 1,5 bis 2 h (Reste im Becherglas dienen als Indikator)
- nach der Polymerisation die feuchten Tücher und den Platzhalter entfernen
- den Kamm vorsichtig entfernen, sodass die Gelkante nicht beschädigt wird
- Gel- und Harnstoffreste vorsichtig mit einem feuchten Tuch entfernen
- den Haifischkamm reinigen und vorsichtig schräg zwischen die Platten schieben. Dabei evtl. auf die Zähne des Kammes drücken, damit diese nicht abknicken
- die Zähne des Haifischkammes sollen ca. 0,5 cm in das Gel ragen
- Oberflächen der Platten, wenn nötig, säubern

#### Einhängen der Platten

- oberen Puffertank in der Klammeraussparung montieren, Schrauben handfest anziehen
- den mit 1 x TBE-Puffer befüllten (Markierung beachten) unteren Puffertank an das Licorgerät anschließen
- Platten mit den Klammern in die Vorrichtung einhängen
- den oberen Puffertank mit 1 x TBE-Puffer befüllen und an das Licorgerät anschließen

#### Anhang 3: Durchführung eines PAGE-Analysenlaufs

Mit der zum Licorgerät gehörigen Software (LI-COR e-seq Release 2.0, LI-COR Inc, Lincoln, USA) wird ein neuer Analysenlauf (Run) angelegt. Zum Abgleich des Lasers und zur Überprüfung der Elektrophoresebedingungen muss zuerst ein Pre-Run angestoßen werden. Dieser dauert 15 Minuten. Meldet die Software „Waiting to load Samples“ ist der Pre-Run beendet. Man öffnet nun die Fronttür des Gerätes und unterbricht die elektrische Zuleitung zum oberen Puffertank. Man kann nun die Proben und die Längenstandardlösung in die Haifischkammtaschen pipettieren. Das Volumen beträgt 0,25 µl/Tasche bei einem 63er Haifischkamm. Ist die Probenaufgabe beendet, schließt man den oberen Puffertank wieder an, schließt die Fronttür und startet den Run. Ein Run dauert ungefähr zwei Stunden, kann aber nach Abbildung des längsten Längenstandards vorzeitig beendet werden.

#### Anhang 4: Probenvorbereitung für die Pyrosequenzierung



- Aus Anzahl der Reaktion die benötigten Lösungsmengen berechnen:
  - Beads: 7,5 %-ige Streptavidin-Beads in Bindungspuffer-Lösung
  - SeqPrimer: 0,375 %-ige Sequenzierungsprimer (100  $\mu$ M) in Annealing-Puffer-Lösung
- Die Tröge des Prep Tools mit den entsprechenden Lösungen bis zur Markierung befüllen
- In eine PCR-Platte 10  $\mu$ l Wasser je benötigte Reaktionskammer vorlegen
- 30  $\mu$ l des PCR-Ansatzes zupipettieren
- 40  $\mu$ l Beads zugeben
- 5 min schütteln
- 40  $\mu$ l Sequenzierungs-Primer je Kammer in eine PSQ 96-Platte vorlegen
- das Prep Tool 20 sec mit Wasser spülen
- die Beads aus der PCR-Platte mit dem Prep Tool fangen
- Prep Tool 5 sec mit 70%-igem Ethanol waschen
- Prep Tool 5 sec mit 0,2 molarer Natronlauge spülen
- Prep Tool 5 sec mit Waschpuffer waschen
- die Beads in die PSQ 96- Platte entlassen
- Prep Tool 20 sec mit Wasser spülen, danach trocken saugen lassen
- PSQ 96-Platte für 2 min im Trockenschrank bei 80°C inkubieren
- PSQ 96-Platte auf Raumtemperatur abkühlen lassen

Tab.64: Kennzahlen IOBT965

<b>IOBT965</b>	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	NA	F-Wert
Krofdorfer Forst	56	0,546	0,589	6	-0,079
D, Bayern *	395	0,639	k.A.	10	k.A.
DK, Oxbol **	23	0,65	0,61	5	0,062
DK, Ulborg **	29	0,60	0,48	4	0,200
DK, Feldborg **	24	0,62	0,58	5	0,065
DK, Klosterheden **	32	0,28	0,16	5	0,429
DK, Palsgaard **	10	0,62	0,70	3	-0,129
DK, Thy **	31	0,79	0,97	6	-0,228
DK, Hanherred **	21	0,68	0,86	5	-0,265
DK, Lidenborg **	20	0,59	0,63	3	-0,068
DK, Ormstrup **	20	0,71	0,85	4	-0,197
DK, Meilgaard **	23	0,62	0,59	5	0,048
DK, Lovenholm **	21	0,65	0,71	3	-0,092
DK, Hostemark (Gehege) **	31	0,09	0,10	2	-0,111
DK, Tofte (Gehege) **	33	0,09	0,03	2	0,667
DK, Jaegersborg (Gehege) **	31	0,39	0,32	3	0,179
D, Lüneburger Heide, NS ***	110	0,751	0,564	11	0,249
D, Harz, NS ***	109	0,74	0,661	11	0,107
D, Solling, NS ***	44	0,68	0,57	13	0,162

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Nielsen et al., 2008); \*\*\* (Kinser et al., 2008); k.A.: keine Angabe

Tab.65: Kennzahlen RME25

<b>RME25</b>	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	NA	F-Wert
Krofdorfer Forst	56	0,550	0,625	3	-0,136
D, Bayern *	395	0,603	k.A.	9	k.A.
D, Lüneburger Heide, NS **	110	0,518	0,555	5	-0,071
D, Harz, NS **	109	0,355	0,294	3	0,172
D, Solling, NS *	44	0,258	0,114	3	0,558

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Kinser et al., 2008) ; k.A.: keine Angabe

Tab.66: Kennzahlen CSSM16

<b>CSSM16</b>	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	NA	F-Wert
Krofdorfer Forst	56	0,724	0,821	4	-0,134
D, Bayern *	395	0,782	k.A.	8	k.A.
F, Petite Pierre Nat. Res. **	284	0,687	0,673	6	0,020
D, Lüneburger Heide, NS ***	110	0,822	0,700	8	0,148
D, Harz, NS ***	109	0,782	0,679	8	0,132
D, Solling, NS ***	44	0,704	0,590	5	0,162

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Frantz et al., 2008); \*\*\* (Kinser et al., 2008) ; k.A.: keine Angabe

Tab.67: Kennzahlen MM12

<b>MM12</b>	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	NA	F-Wert
Krofdorfer Forst	56	0,334	0,315	3	0,057
D, Bayern *	395	0,536	k.A.	4	k.A.
DK, Oxbol **	23	0,20	0,22	2	-0,100
DK, Ulborg **	29	0,24	0,28	2	-0,167
DK, Feldborg **	24	0,31	0,38	2	-0,226
DK, Klosterheden **	32	0,06	0,06	2	0,000
DK, Palsgaard **	10	0,27	0,10	2	0,630
DK, Thy **	31	0,26	0,29	3	-0,115
DK, Hanherred **	21	0,22	0,14	3	0,364
DK, Lidenborg **	20	0,10	0,10	2	0,000
DK, Ormstrup **	20	0,22	0,25	2	-0,136
DK, Meilgaard **	23	0,09	0,09	2	0,000
DK, Lovenholm **	21	0,29	0,24	2	0,172
DK, Hostemark (Gehege) **	31	0,49	0,55	3	-0,122
DK, Tofte (Gehege) **	33	k.A.	k.A.	1	k.A.
DK, Jaegersborg (Gehege) **	31	0,42	0,32	2	0,238
F, Petite Pierre Nat. Res. ***	286	0,564	0,563	6	0,002
D, Lüneburger Heide, NS ****	110	0,358	0,318	4	0,112
D, Harz, NS ****	109	0,406	0,367	3	0,096
D, Solling, NS ****	44	0,274	0,318	3	-0,161

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Nielsen et al., 2008); \*\*\* (Frantz et al., 2008); \*\*\*\* (Kinser et al., 2008) ; k.A.: keine Angabe

Tab.68: Kennzahlen Haut14

<b>Haut14</b>	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	NA	F-Wert
Krofdorfer Forst	56	0,813	0,786	8	0,033
D, Bayern *	395	0,860	k.A.	18	k.A.
F, Petite Pierre Nat. Res. **	284	0,735	0,694	13	0,056
D, Lüneburger Heide, NS ***	110	0,904	0,855	14	0,054
D, Harz, NS ***	109	0,854	0,833	14	0,025
D, Solling, NS ***	44	0,898	0,818	13	0,089

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Frantz et al., 2008); \*\*\* (Kinser et al., 2008) ; k.A.: keine Angabe

Tab.69: Kennzahlen INRA35

<b>INRA35</b>	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	NA	F-Wert
Krofdorfer Forst	56	0,728	0,696	6	0,044
D, Bayern *	395	0,856	k.A.	11	k.A.
F, Petite Pierre Nat. Res. **	284	0,751	0,743	8	0,011

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Frantz et al., 2008) ; k.A.: keine Angabe

Tab.70: Kennzahlen CSPA115

<b>CSPA115</b>	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	NA	F-Wert
Krofdorfer Forst	56	0,753	0,607	6	0,194
D, Bayern *	395	0,808	k.A.	8	k.A.
F, Petite Pierre Nat. Res. **	241	0,750	0,726	8	0,032

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Frantz 2008) ; k.A.: keine Angabe

Tab.71: Kennzahlen CSSM22

<b>CSSM22</b>	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	NA	F-Wert
Krofdorfer Forst	56	0,466	0,393	3	0,157
D, Bayern *	395	0,332	k.A.	4	k.A.
F, Petite Pierre Nat. Res. **	283	0,227	0,247	3	-0,088

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Frantz et al., 2008) ; k.A.: keine Angabe

Tab.72: Kennzahlen ETH225

<b>ETH225</b>	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	NA	F-Wert
Krofdorfer Forst	56	0,631	0,661	7	-0,048
D, Bayern *	395	0,877	k.A.	14	k.A.
F, Petite Pierre Nat. Res. **	283	0,808	0,788	7	0,025

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Frantz et al., 2008) ; k.A.: keine Angabe

Tab.73: Kennzahlen ETH3

<b>ETH3</b>	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	NA	F-Wert
Krofdorfer Forst	56	0,383	0,214	3	0,441
D, Bayern *	395	0,209	k.A.	3	k.A.
DK, Oxbol **	23	0,41	0,30	2	0,268
DK, Ulborg **	29	0,26	0,20	2	0,231
DK, Feldborg **	24	0,23	0,08	3	0,652
DK, Klosterheden **	32	0,09	0,10	2	-0,111
DK, Palsgaard **	10	0,34	0,40	2	-0,176
DK, Thy **	31	0,25	0,23	2	0,080
DK, Hanherred **	21	0,29	0,11	2	0,621
DK, Lidenborg **	20	k.A.	k.A.	1	k.A.
DK, Ormstrup **	20	0,15	0,15	3	0,000
DK, Meilgaard **	23	0,16	0,00	2	1,000
DK, Lovenholm **	21	0,14	0,05	2	0,643
DK, Hostemark (Gehege) **	31	0,16	0,10	2	0,375
DK, Tofte (Gehege) **	33	0,06	0,06	2	0,000
DK, Jaegersborg (Gehege) **	31	k.A.	k.A.	1	k.A.

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Nielsen et al., 2008) ; k.A.: keine Angabe

Tab.74: Kennzahlen RT1

<b>RT1</b>	<b>N</b>	<b>H<sub>e</sub></b>	<b>H<sub>o</sub></b>	<b>NA</b>	<b>F-Wert</b>
Krofdorfer Forst	56	0,613	0,554	7	0,096
D, Vorpommern *	30	k.A.	0,81	7	k.A.
DK, Oxbol **	23	0,79	0,74	7	0,063
DK, Ulborg **	29	0,81	0,55	7	0,321
DK, Feldborg **	24	0,82	0,67	7	0,183
DK, Klosterheden **	32	0,83	0,68	7	0,181
DK, Palsgaard **	10	0,73	0,70	5	0,041
DK, Thy **	31	0,80	0,65	7	0,188
DK, Hanherred **	21	0,74	0,43	5	0,419
DK, Lidenborg **	20	0,75	0,70	7	0,067
DK, Ormstrup **	20	0,69	0,75	5	-0,087
DK, Meilgaard **	23	0,80	0,70	7	0,125
DK, Lovenholm **	21	0,72	0,52	5	0,278
DK, Hostemark (Gehege) **	31	0,52	0,54	3	-0,038
DK, Tofte (Gehege) **	33	0,69	0,69	5	0,000
DK, Jaegersborg (Gehege) **	31	0,39	0,24	5	0,385
E, Andalusien ***	30	0,812	0,867	7	-0,068
H, Ungarn, Farm 1 ****	67	0,654	0,642	8	0,018
H, Ungarn, Farm 2 ****	52	0,566	0,635	10	-0,122

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Poetsch et al., 2001); \*\* (Nielsen et al., 2008); \*\*\* (Sanchez-Fernandez et al., 2008); \*\*\*\* (Zsolnai et al., 2009); k.A.: keine Angabe

Tab.75: Kennzahlen CSSM14

<b>CSSM14</b>	<b>N</b>	<b>H<sub>e</sub></b>	<b>H<sub>o</sub></b>	<b>NA</b>	<b>F-Wert</b>
Krofdorfer Forst	56	0,101	0,107	2	-0,059
D, Bayern *	395	0,413	k.A.	3	k.A.
F, Petite Pierre Nat. Res. **	262	0,307	0,294	3	0,042

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Frantz et al., 2008); k.A.: keine Angabe

Tab.76: Kennzahlen RT6

<b>RT6</b>	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	NA	F-Wert
Krofdorfer Forst	56	0,815	0,750	9	0,080
D, Vorpommern *	30	k.A.	0,78	7	k.A.
DK, Oxbol **	23	0,72	0,70	5	0,028
DK, Ulborg **	29	0,72	0,59	5	0,181
DK, Feldborg **	24	0,78	0,75	6	0,038
DK, Klosterheden **	32	0,75	0,66	5	0,120
DK, Palsgaard **	10	0,73	0,60	6	0,178
DK, Thy **	31	0,70	0,84	5	-0,200
DK, Hanherred **	21	0,76	0,63	6	0,171
DK, Lidenborg **	20	0,72	0,79	4	-0,097
DK, Ormstrup **	20	0,82	0,70	7	0,146
DK, Meilgaard **	23	0,69	0,65	7	0,058
DK, Lovenholm **	21	0,81	0,67	7	0,173
DK, Hostemark (Gehege) **	31	0,62	0,55	5	0,113
DK, Tofte (Gehege) **	33	0,65	0,63	4	0,031
DK, Jaegersborg (Gehege) **	31	0,79	0,72	7	0,089

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Poetsch et al., 2001); \*\* (Nielsen et al., 2008) ; k.A.: keine Angabe

Tab 77: Kennzahlen CSSM19

<b>CSSM19</b>	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	NA	F-Wert
Krofdorfer Forst	56	0,817	0,875	8	-0,071
D, Bayern *	395	0,869	k.A.	15	k.A.
F, Petite Pierre Nat. Res. **	257	0,807	0,840	10	-0,041

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Frantz et al., 2008) ; k.A.: keine Angabe

Tab.78: Kennzahlen BM1818

<b>BM1818</b>	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	NA	F-Wert
Krofdorfer Forst	56	0,742	0,625	6	0,158
D, Bayern *	395	0,849	k.A.	9	k.A.
F, Petite Pierre Nat. Res. **	281	0,740	0,733	7	0,009

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Frantz et al., 2008) ; k.A.: keine Angabe

Tab.79: Kennzahlen NVHRT48

<b>NVHRT48</b>	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	NA	F-Wert
Krofdorfer Forst	56	0,891	0,821	10	0,079
D, Vorpommern *	30	k.A.	0,48	4	k.A.
DK, Oxbol **	23	0,71	0,48	4	0,324
DK, Ulborg **	29	0,72	0,33	6	0,542
DK, Feldborg **	24	0,78	0,52	6	0,333
DK, Klosterheden **	32	0,80	0,58	6	0,275
DK, Palsgaard **	10	0,63	0,60	3	0,048
DK, Thy **	31	0,80	0,61	9	0,238
DK, Hanherred **	21	0,72	0,47	5	0,347
DK, Lidenborg **	20	0,70	0,39	5	0,443
DK, Ormstrup **	20	0,70	0,45	5	0,357
DK, Meilgaard **	23	0,70	0,52	5	0,257
DK, Lovenholm **	21	0,80	0,62	7	0,225
DK, Hostemark (Gehege) **	31	0,79	0,68	8	0,139
DK, Tofte (Gehege) **	33	0,67	0,58	6	0,134
DK, Jaegersborg (Gehege) **	31	0,80	0,68	11	0,150
E, Andalusien ***	30	0,617	0,600	7	0,028
H, Ungarn, Farm 1 ****	67	0,767	0,642	11	0,163
H, Ungarn, Farm 2 ****	52	0,802	0,692	10	0,137

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Poetsch et al., 2001); \*\* (Nielsen et al., 2008); \*\*\* (Sanchez-Fernandez et al., 2008); \*\*\*\* (Zsolnai et al., 2009) ; k.A.: keine Angabe

Tab.80: Kennzahlen IOBT918

<b>IOBT918</b>	N	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	NA	F-Wert
Krofdorfer Forst	56	0,597	0,589	4	0,013
D, Bayern *	395	0,318	k.A.	4	k.A.
F, Petite Pierre Nat. Res. **	285	0,112	0,112	2	0,000

N: Anzahl Proben, H<sub>e</sub>: erwartete Heterozygotie, H<sub>o</sub>: beobachtete Heterozygotie, NA: Anzahl Allele.

\* (Kuehn et al., 2003); \*\* (Frantz et al., 2008) ; k.A.: keine Angabe



Tab.81: Verwendete Mikrosatelliten aller beschriebenen Veröffentlichungen

Mikrosatellit	Mittelwert Anzahl Allele <sup>*)</sup>	Veröffentlichung Nr.									
BL42	5,0	11	12	15							
BM1818	8,0	1	5	10							
BM203	6,0	11	12	14	15						
BM302	5,0	14									
BM4107	3,4	9	13								
BM4208	8,0	2	3	4	7	13	16				
BM4513	15,0	2	3	4	7	8	12				
BM5004	3,8	9	13								
BM757	4,0	11	12	15							
BM888	14,0	2	3	4	7	8	10	13			
BMC1009	5,0	11	13	15							
Cer14	12,5	1	5	10							
CP26	10,5	16									
CSPS115	8,0	1	5	10							
CSRM60	12,0	1	5								
CSSM03	k.A.	13									
CSSM14	3,0	1	5	10							
CSSM16	7,0	1	5	10	18						
CSSM19	14,7	1	5	10							
CSSM22	3,5	1	5	10							
CSSM43	14,0	2	14								
CSSM66	10,0	1	5	10	16						
DIK82	8,5	16									
ETH225	10,5	1	5	10							
ETH3	2,1	1	5	9							
Haut14	14,4	1	5	10	18						
HAUT24	8,0	1	5								
IDVGA55	3,0	11	12	15							
IDVGA59	11,5	16	16								
ILSTS06	15,0	1	5								
INRA11	8,4	2	3	4	7	8	15	17			
INRA121	6,0	11	15								
INRA35	9,7	1	5	10	17						
IOBT918	3,0	1	5	10							
IOBT965	5,3	1	5	9	18						
JP15	14,0	17									
JP27	6,0	17									
JP38	10,0	17									

Fortsetzung Tab.81: Verwendete Mikrosatelliten aller beschriebenen Veröffentlichungen

Mikrosatellit	Mittelwert Anzahl Allele <sup>*)</sup>	Veröffentlichung Nr.									
MAF109	7,5	1	4	8	17						
MAF35	9,0	2	3	4	8						
MB25	5,0	14									
McM58	k.A.	13									
MM12	2,5	1	5	9	10	18					
NVHRT16	3,1	3	4	6	7	9					
NVHRT21	7,5	3	4	6	7	14	16				
NVHRT48	6,8	6	9	13	14	16					
NVHRT73	11,3	6	13	14	16						
OarCP26	8,4	2	3	7	8	13	15				
OarFCB193	12,0	12	13	14							
OarFCB304	6,9	2	3	7	8	9	13	14	15	17	
OarHH51	3,9	9									
OarVH110	4,0	11	15								
RME25	5,0	1	18								
RT1	6,1	3	4	6	7	9	12	14	16	17	
RT13	8,0	6	12	14							
RT23	2,0	6									
RT27	2,0	6									
RT5	k.A.	13									
RT6	5,7	6	9								
RT7	5,0	3	4	6	12						
SRCRSP10	k.A.	13									
TGLA322	14,0	17									
TGLA53	5,0	11	15								
TGLA94	7,5	14	17								

<sup>\*)</sup> nicht immer wurden die Anzahl Allele beschrieben; k.A.: keine Angaben vorhanden

1 (Kuehn et al., 2003); 2 (Feulner et al., 2004); 3 (Hmwe et al., 2006a); 4 (Hmwe et al., 2006b);  
 5 (Kuehn et al., 2004); 6 (Poetsch et al., 2001); 7 (Zachos et al., 2007); 8 (Zachos et al., 2003);  
 9 (Nielsen et al., 2008); 10 (Frantz et al., 2008); 11 (Hajji et al., 2008); 12 (McDevitt et al., 2009);  
 13 (Haanes et al., 2010); 14 (Sanchez-Fernandez et al., 2008); 15 (Hajji et al., 2007);  
 16 (Zsolnai et al., 2009); 17 (Nussey et al., 2006); 18 (Kinser et al., 2008).

# Danksagung

Diese Arbeit ergab sich aus zwei parallelen Projektideen der Rotwildhegegemeinschaft Krofdorfer Forst mit der Klinik für Wiederkäuer und Schweine und dem An-Institut Arbeitskreis Wildbiologie.

Ich danke den Herren Prof. Dr. E. Petzinger und Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. H. Willems für die fachlichen Hilfen, die Diskussionen und vielen guten Ideen, die mich enorm vorwärts brachten. Ich bewundere ihn für seine Geduld und Ruhe, die er mit mir aufgebracht hat.

Die Rotwildhegegemeinschaft Krofdorfer Forst machte mit ihrer Anfrage für eine genetische Untersuchung diese Dissertation möglich. Stellvertretend sollen hier Forstamtleiter Hr. Voll, Hr. Schwarz und Hr. Osan genannt sein. Sie unterstützten mich nicht nur tatkräftig bei der Probennahme, die Hegegemeinschaft unterstützte die Untersuchung auch finanziell. Danke an die privaten Spender.

Ein besonderes Dankeschön gilt der Labormannschaft der Klinik für Schweine, Fr. B. Hopf und Fr. U. Stoll. Durch ihre Hilfe habe ich mich im Labor sehr schnell eingelebt und hatte im Notfall immer eine helfende Hand zur Verfügung.

Danke auch an die Doktoranden, die zur gleichen Zeit mit mir im Labor gekämpft haben, besonders Natalie Bertsch für die Einweisung und Zusammenarbeit an der PAGE.

Ich habe mich im Labor immer als Teil der Mannschaft gefühlt. Es war eine sehr angenehme und motivierende Zusammenarbeit mit Euch.

Es gab viele Diskussionspartner und Ideengeber, Dr. K. Vollmer, Dr. W. Hecht, Prof. C. Giese und viele mehr, die mir weiterhalfen, herzlichen Dank.

Bedanken möchte ich mich auch bei den „Wachrüttlern“ und „Aufbauern“ und denen, die meine Launen ertragen mussten. Ihr hattet es nicht leicht, danke für Eure Geduld und Euren Zuspruch.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
**STAUFENBERGRING 15**  
**D-35396 GIESSEN**

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
[redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

ISBN: 978-3-8359-6118-0



Photo cover: © Ana Gram - Fotolia.com