

Tanzania Wildlife Discussion Paper No. 25

Ludwig Siege, Rolf D. Baldus (Eds.)

**Phylogenetische Differenzierung von Subpopulationen der Rappenantilope (Hippotragus Niger) in Ostafrika
with an english foreword/summary**

**Selous, Saadani and Katavi Rukwa Conservation Programmes, Community Wildlife
Management Wildlife Division
Deutsche Gesellschaft fuer Technische Zusammenarbeit
Dar es Salaam 1999**

As the scope of the German supported wildlife programmes has increased and new programmes have started (Saadani and Katavi/Rukwa Conservation Programmes, Government Advisor Community Wildlife Management), the Discussion Paper series has been renamed "Tanzania Wildlife Discussion Papers". The numbering of the editions remain consecutive.

Cover illustration by Bodo Meier

The Discussion Papers may contain authors' views and positions which do not necessarily correspond with the official position of the Wildlife Division and the editors.

Address:

P.O.Box 1519 Dar es Salaam Tanzania
Tel.: ++255-51-866065
++255-0812-786130
Fax: ++255-51-864447/116504
email: scp@africaonline.co.tz

Phylogeographische Differenzierung von Subpopulationen der Rappenantilope
(*Hippotragus niger sp.*) in Ostafrika

Institut für Zoo- und Wildtierforschung Berlin (IZW)

Alfred-Kowalke-Straße 17
D-10252 Berlin
Tel.: 030-5168501, Fax: 030-5126104,
E-mail: Pitra@IZW-Berlin.de

Bearbeiter: Univ. Prof. Dr. Reinhold R. Hofmann
Prof. Dr. Christian Pitra
Dipl. Biol. Dietmar Lieckfeldt

Im Auftrag der Deutschen Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)
GmbH

FOREWORD

The Eastern Tanzanian Sable Antelope is "roosevelti" !

by
Dr. Rolf D. Baldus

Background

The remaining population of *Hippotragus niger roosevelti* in the Kenyan Shimba Hills Nature Reserve consists nowadays of approximately 120 animals. This makes it one of the rarest antelope subspecies in the world. However, there has been much debate whether all sable antelopes in Eastern Tanzania might belong to the same subspecies.

So far they have been officially recognized as *H.n.kirkii*.

But there were other voices on the issue. A. Hecker (verb. comm.), one of the early lecturers at the College of Wildlife Management, Mweka, Tanzania, reported in the mid-sixties that he regarded all the sable from Tanga to the Selous Game Reserve and the Kilombero Valley in the West as *roosevelti*. A. Rodgers (Gnusletter, September 1987) shares this view. Dollinger (Gnusletter, January 1988) and G.R. Fox (1991) define the local populations around Tanga and Saadani as *roosevelti*. R.D. Estes (Gnusletter, May 1987) also regards their existence as possible. In this case *roosevelti* would not be restricted to the nominate population in the Shimba Hills. Consequently they would not be as endangered as previously assumed.

The Project

Wildlife conservation, support to Protected Areas and community-based management of natural resources has been a priority in Tanzanian-German development cooperation since 1987. Monitoring of wildlife populations and trends has been a part of these programmes (Baldus 1993; IUCN/SSC ASG-Report 1997). After some initial (1991) German assistance to the Saadani Game Reserve (north of Bagamoyo, along the Indian Ocean coast) a Technical Cooperation project started in 1997. Prior to this the Tanzanian Government had acquired the formerly private Southern Mkwaja cattle ranch and annexed it to Saadani Game Reserve, thereby doubling its size to over 500 sq. km.

In order to assess the conservation value of the reserve and the surrounding bufferzones, the taxonomic status of the local sable population was regarded as important (Siege and Baldus 1997). The Wildlife Division and Deutsche Gesellschaft fuer Technische Zusammenarbeit (GTZ), the German bilateral development agency, therefore asked the Berlin based "Institute for Zoo Biology and Wildlife Research" (IZW) to conduct a respective study. The scientists responsible for the study were R.R. Hofmann, C. Pitra and D. Lieckfeldt.

Due to the generous support of R. Kock (KWS Veterinary Unit) it was possible for the first time to collect tissue samples of nominate *H.n.roosevelti* for analysis in the Shimba Hills Nature Reserve. For comparison, samples were also included from the sable antelope of the Selous Game Reserve.

Results

The results of the analysis (R.R. Hofmann, C. Pitra and D. Lieckfeldt 1998) are summarized by the authors as follows: "The phylogenetic and AMOVA-analysis of complete nucleotide-sequences of the mitochondrial (mt) cytochrome b gene (1140 bp) and the control region (1083 bp) of individuals from Shimba Hills NR (n=2), Saadani GR (n=1) and Selous GR (n=4) resulted in the conclusion

that the population is highly differentiated approximately along the 38th longitude. The Usambara mountains and large rivers like Pangani and Rufiji obviously act as geographic barriers to genetic differentiation of the sable antelope. Although the molecular data hint at genetic "isolation by distance", the medium genetic distance of 1.2 +/- 0.8% between the analysed local populations is too small to justify a taxonomic difference between the nominated *H.n.roosevelti* in Shimba Hills NR and populations in Eastern Tanzania at sub-species level. Inter-specific *Hippotragus-Oryx* comparison gives a medium mtDNA sequence difference of 18.1 +/- 0.7 %. The preliminary results of mtDNA analysis tend to support the assumption of a formerly continuous distribution of East African *roosevelti* from South-East-Kenya to the Selous in Southern Tanzania, as already indicated by Roosevelt and Heller 1922 and verified by Groves 1983 on the basis of morphometric studies."

Numbers and Protective Status

Saadani and Selous Game Reserves have been the subject of regular aerial counts in recent years (conducted by Tanzania Wildlife Conservation Monitoring/Frankfurt Zoological Society). However, it is difficult to count sable reliably in this way and normally numbers are underestimated. In the Selous ground counts are not possible from a practical point of view, as sable roam both inside and outside the reserve - an area of well over 60,000 sq km. In Saadani a total ground count is just being prepared as a baseline for the new "Saadani Conservation and Development Programme".

According to the latest aerial survey of October 1998 the Selous Game Reserve has about 3,900 sable. Outside the reserve, in particular in the South-East, the count resulted in approximately 6,700 sable. How reliable the latter figure is has to be the subject of further analysis. Around Saadani the population could be in the range of 100 to 200. Siege (verb. comm.) reports that in the mid-eighties he saw more than 100 different sable there on a single day. Up to the early 1990s there have been repeated reports in Tanga of a small herd of sable near Horo Horo on the border between Tanzania and Kenya (Ndunguru and Siege verb. comm.). Therefore, the total size of the Roosevelt population can conservatively be estimated at more than 4,000 individuals, and probably considerably more, instead of the former 120 (Shimba Hills only).

The sable in the Saadani ecosystem live mainly outside the protected area, but also on Mkwaja South, the former ranch which belongs now to Saadani Game Reserve. They have not legally been hunted on licence in recent years. There is, however, considerable commercial and subsistence meat poaching going on in the area, and it is known that sable are also being killed illegally. The decision of the Tanzanian Government to increase the size of the protected area will be of benefit to sable conservation in the long run. Credit for the protection of sable in recent years is due to the management of the Mkwaja Ranch, in particular to the Fox family and to Dr. J. Goebel. Since the second half of 1998 the Tanzanian-German "Saadani Conservation and Development Programme" has stepped up its conservation efforts. It will, however, take another few months for the measures taken to become effective and for the protective status of the sable and other wildlife to be improved.

In the Selous, poaching has been greatly reduced since 1989/90 and it is safe to say that sable inside the protected area do not suffer from poaching pressure for the time being. The protective status in buffer zones, in particular south of the reserve, has also been improved due to community based wildlife schemes. In the Selous Game Reserve sable can be hunted (70-80 animals/year) by foreign safari hunters on the basis of a controlled quota as part of the management of the reserve and in order to finance the conservation efforts in an area of the size of Switzerland.

Further Action

The next step in the research programme will be the identification of the Southern and Western distribution limits of roosevelti. The hypothesis is that sable in Central and Western Tanzania are a different subspecies. A good number of samples have been collected from safari hunting companies which have generously supported the research whenever they were requested. These samples are presently being analysed and concrete results are expected in the near future. DNA-analysis of the first three samples from Kigosi, Ugalla and Kizigo in Western Tanzania produced a clearly different result which indicates that these sable are not the roosevelti of the Eastern population. IZW plans to exchange results with other scientists who are working on sable antelopes.

As roosevelti is demographically highly fragmented, over-utilization of small local populations will lead to a loss of genetic diversity of the subspecies. It is important therefore to identify the limits of distribution further and increase the protective status of isolated sable herds.

1. Problemstellung

Das Sadani Game Reserve (GR) (200 km²) befindet sich in der Küstenregion von Nord-Ost-Tansania (Abb. 1). Es wird westlich durch das Kiono Forest Reserve und nördlich durch die Mkwaja Ranch begrenzt. Während der ersten systematischen Zählung des Wildbestandes in diesem Gebiet wurden im Oktober (Trockenzeit) 1991 und im Mai (Regenzeit) 1992 durch Erkundungsflüge 85 Rappenantilopen in einem umliegenden Gebiet von 1537 km² registriert (Baldus 1993; Baldus et al. 1997). Innerhalb der Reservatsgrenzen wurden keine Rappenantilopen beobachtet. Die Transektor-Intervalle betragen 5 km außerhalb und 2,5 km innerhalb des Sadani GR. Spätere episodische Feldbeobachtungen und Berichte Einheimischer bestätigten die Anwesenheit der Art im Reservatsgebiet (pers. Mtlg. Dr. Siege). Das gesicherte Vorkommen von Rappenantilopen in einem verhältnismäßig kleinen und isolierten Gebiet, weit entfernt von den bekannten Vorkommen in Tansania (Abb. 1), löste eine internationale Fachdiskussion über den taxonomischen und damit Artenschutzstatus dieser lokalen Gruppe aus.

Abb. 1 Nationalparks und Wildschutzgebiete in Tansania. Benannt sind Regionen mit Beständen von Rappenantilopen (*Hippotragus niger sp.*): 7. Ruaha, 9. Katavi, 13. Burigi, 14. Biharamulo, 18. Sadani, 19. Moyowosi, 20. Kigosi, 22. Muhesi, 23. Kisigo, 26. Selous, 32. Kilombero Game Controlled Area. Shimba Hills NR/Kenia ist durch einen Pfeil markiert.

Aufgrund der geographischen Nähe zu dem nördlich, an der Grenze von Tansania zu Kenia gelegenen Shimba Hills National Reserve (NR) und des küstennahen Vorkommens wurde die Vermutung geäußert, daß es sich bei den Tieren in Sadani um Vertreter der äußerst seltenen Unterart *H. n. roosevelti* handeln könnte. Bis zu dieser Zeit wurde eine Herde von etwa 120 Tieren im Shimba Hills NR/Kenia als letzte Überlebende der Unterart und damit der vermutlich seltensten und gefährdetsten Antilopenspezies der Welt angesehen. Richard D. Estes (in *Gnusletter* Mai,

1987), hält zwar das Vorkommen weiterer kleiner und isolierter *roosevelti*-Populationen in Ost-Tansania für möglich, weist aber nachdrücklich auf den hohen Gefährdungsgrad der Subspezies hin. Allan Rogers, ein Kenner der Fauna und Flora Ost-Tansanias plädiert sogar für eine südliche Ausdehnung des Verbreitungsgebietes von *roosevelti* bis in das Selous GR und nimmt an, daß eine vormals kontinuierliche Verbindung heute noch südlich von Pangani existieren könnte (in *Gnusletter* September, 1987). Das Ukaguru-Gebirge könnte eine effektive Barriere zwischen der west-tansanischen Population (wahrscheinlich *kirkii*) und der östlichen *roosevelti*-Population sein. Groves 1983 kommt aufgrund der Analyse von Museums-exemplaren zu ähnlichen Verbreitungsgrenzen (Abb. 13). In diesem Falle wäre *roosevelti* nicht so stark gefährdet wie ursprünglich angenommen. Andere Autoritäten widersprechen dieser Einschätzung. Jonathan Kingdon (in *East African Mammals* 1982, vol. III, part D, p. 555) stellt fest, daß „the types from which the subspecies *roosevelti* and *kirkii* were described are not representative of recognizable populations with definite ranges“. Rod East schlägt vor, die Subspezies-einteilungen bei Antilopen generell zu ignorieren, weil „the validity and precise distribution of described subspecies are uncertain for many species“. Kürzlich teilten Terry Robinson und Conrad Matthee (in *Gnusletter* 1997/16, 2, p.8) die Zusammenfassung der Ergebnisse von bisher unveröffentlichten DNA-Untersuchungen an 13 Rappenantilopen von 4 akzeptierten Unterarten mit. Die Autoren kommen zu dem Schluß, daß genetisch zwei Gruppen (vermutlich *roosevelti* and *kirkii*) existieren, da nur 4 Tiere aus Tansania (ohne genaueren Herkunftsort !) deutliche DNA-Sequenzunterschiede gegenüber den übrigen Tieren aufwiesen. Die genetischen Beziehungen zwischen den küstennahen, demographisch isolierten Populationen des Shimba Hills NR, Sadani GR und Selous GR bleiben weiterhin unklar, weil keine Mitglieder dieser Herden in die Analyse einbezogen waren.

Von Richard Kock liegt die Beobachtung eines alten Bullen etwa 150 km entfernt von Shimba Hills im Tsavo East NR vor, so daß größere Migrationsstrecken für die Rappenantilope möglich scheinen. Die kürzeste Distanz zwischen dem Shimba Hills N R/Kenia und dem Sadani GR/Tansania beträgt ca. 180 km. Allerdings könnten das Usambara-Gebirge und der Pangani-Fluß starke physikalische Langzeit-Barrieren bilden. Wenn tatsächlich ein demographischer und genetischer Austausch zwischen beiden Lokalitäten stattgefunden hat, dann könnten die Tiere im südlichen Einstandsgebiet Sadani GR und Umgebung eine Reservepopulation der Nominatpopulation im Shimba Hills NR darstellen, mit folgenden Konsequenzen für den praktischen Artenschutz:

1. Die akute Gefahrensituation für die Subspezies *H. n. roosevelti* wäre gemildert.
2. Der legale Schutzstatus der Population im Sadani GR wäre unmittelbar zu erhöhen. Jagdliche Nutzung der Tiere sollte vollständig untersagt und anti-poaching Kontrollen verschärft werden.
3. Nach Feststellung der genetischen Variabilität in den isolierten Einzelpopulationen, sollte ein gezieltes Austauschprogramm genetisch wertvoller Individuen organisiert werden, mit dem Ziel, die Verteilung der Foundergene zu verbessern und die Inzuchtraten zu senken.
4. Mit Hilfe von Populations-Gefährdungs-Analysen sollten die ortsspezifischen Risiko-faktoren identifiziert und Maßnahmen zu ihrer Überwindung getroffen werden.

Als essentielle Voraussetzung für ein entsprechend umfassendes Schutzaktionspaket sollte in dem vorliegenden Projekt geklärt werden, welche genetischen Beziehungen zwischen den Individuen der Lokalpopulationen Shimba Hills NR, Sadani GR und Selous GR bestehen.

Im Einzelnen wurden folgende Aufgaben gelöst:

- Gewinnung von Bioproben (Blut bzw. Gewebe) von 1-5 gesicherten Vertretern der jeweiligen Lokalpopulationen.
- Isolierung und Reinigung der DNA aus den Bioproben mit Hilfe von Standardmethoden. Vermehrung bekannter hochpolymorpher DNA-Abschnitte mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).
- Automatisierte Sequenzbestimmung hochpolymorpher DNA-Abschnitte mit dem Ziel, diagnostische DNA-Sequenz-Unterschiede zwischen Lokalpopulationen zu identifizieren.

- Bestimmung der phylogenetischen und -geographischen Beziehungen zwischen den Lokalpopulationen.
- Entwicklung einer einfachen Labormethode zum schnellen Nachweis subspezies-spezifischer DNA-Sequenz-Unterschiede, z. B. durch PCR-gestützte Analyse von DNA-Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen.

2. Taxonomie

Die klassische Systematik der Rappenantilope ist widersprüchlich und verwirrend. Die Erstbeschreibung der Spezies als *Aigocerus niger* geht auf Harris (1838) zurück. Später führte Sundevall (1948) den Artnamen *Hippotragus niger* ein, während im deutschen Schrifttum häufig *Ozanna niger* (Reichenbach 1845; Brehm 1880) verwandt wurde. Frühere Autoren haben aufgrund von wenigen phänotypischen Unterschieden (insbesondere Körpergröße, Fellfärbung und Farbmarkierungen des Kopfes), deren Varianz nicht systematisch untersucht wurde, verschiedene lokale Rassen bzw. Unterarten definiert. Entsprechende biogeographische Untersuchungen über Verbreitungsgrenzen der lokalen Varianten der Rappenantilope liegen aber nicht vor. Obwohl sich diese Unsicherheit bis in die spärliche, jüngere Literatur erhalten hat, besteht weitgehende Übereinstimmung in der Annahme folgender Formen, Erstbeschreibungen und Fundorte des Artenkomplexes:

- Hippotragus niger niger*; Harris, *Proc. Zool. Soc.* 1838, p.2; Cashan Gebirge, Süd-Afrika, Transvaal.
- Hippotragus niger kirkii*; Gray, *Cat. Ruminants Brit. Mus.* 1872, p. 35, Sambia, Zaire.
- Hippotragus niger roosevelti*; Heller, *Smithson. Misc. Collect.* 1910, vol. liv. pt.6, p.1, Shimba Hills, Kenia.
- Hippotragus niger variani*; Thomas, 1916, Angola
- Hippotragus niger anelli*; Groves, *Rev. Zool. afr.* 1983, 97, 4, p. 821-828, Ost-Sambia, Malawi, Luangwa-Tal.

Eine umfassende Revision der *Hippotragus*-Systematik wurde kürzlich von Colin P. Groves (1998) angekündigt.

3. Zoogeographie

Das heutige gestreute Vorkommen der Rappenantilope ist auf die ökotonen Habitate des *miombo* (Brachystegia) Baumsavannen-Gürtels in Süd- und Ostafrika beschränkt, mit zwei isolierten Populationen in Angola und Kenia. Das Verbreitungsmuster korreliert in grobem geographischem Maßstab mit dem Vorkommen der o.g. lokalen Varianten. *H. n. kirkii* dehnt sich über Tansania bis nach Malawi aus; *H. n. niger* ist südlich des Sambesi verbreitet; *H. n. variani* kommt nur noch in Zentral-Angola vor und *H. n. roosevelti* soll auf ein kleines Territorium in Süd-Ost-Kenia (Shimba Hills NR) reduziert sein. Die jeweiligen exakten Verbreitungsgrenzen, mögliche Überlappungs- bzw Hybridzonen und weitere regionale Differenzierungen sind unbekannt. Die Tatsache, daß Groves (1983) eine eigene Unterart (*H. n. anelli*) im klassischen Verbreitungsgebiet von *H. n. kirkii* erkannt haben will, weist auf die bestehenden Unsicherheiten in der zoogeographischen Charakterisierung der Unterarten-variabilität. Die neuerdings kontrovers geführte Diskussion über eine mögliche Ausdehnung des Vorkommens von *H. n. roosevelti* nach Ost-Tansania ist ein weiteres Beispiel für die allgemein unklaren genetischen und geographischen Beziehungen zwischen den traditionell anerkannten Unterarten.

4. Status

Obwohl die wildlebende Population der Rappenantilope durch direkte Verfolgung (Trophäenjagd) und Habitatschwund infolge von Landnahme und Konkurrenz mit Rinderhaltung beständig abnimmt (Wilson & Hirst 1977), gilt die Spezies z. Zt. nicht als gefährdet. Der Bestand der Riesenrappenantilope in Angola ist in den CITES-Anhang I aufgenommen und nach den Mace-Lande- Kriterien der IUCN (Mace & Stuart 1994) als "kritisch" eingestuft (Estes & Estes 1974). Die

Shimba Hill-Population wird als „endangered“ betrachtet. Da die phylogeographische Differenzierung der Art unbekannt ist, besteht permanent die Gefahr, daß die genetische Diversität durch weitgehend unbemerktes Erlöschen lokaler Populationen drastisch absinken kann.

Nach ISIS Informationen befanden sich 1996 (30. Juni) weltweit 328 (95.228.5) Rappenantilopen unbekannter Subspezies in 55 tiergärtnerischen Einrichtungen und 78 (25.53.0) Individuen der Subspezies *H. n. niger* in 16 Zoos. Die meisten Tiere (>96%) wurden in Gefangenschaft geboren. Eine Geburtsrate von 0,26 pro Weibchen und Jahr ist relativ hoch und läßt erkennen, daß die Haltung und Reproduktion der Rappenantilope in Menschenhand keine prinzipiellen Probleme macht.

5. Ökologie

Aufgrund ihrer Nahrungspräferenz wird die Rappenantilope zur *grazer*-Gilde gerechnet. Sie bevorzugen den frische Aufwuchs dominanter Grasarten *Andropogon*, *Brachiaria*, *Digitaria*, *Panicum* und *Setaria* in der Grenzzone zwischen Savanne und meist höher gelegenen lockeren und artenreichen Baumbeständen. In der Trockenzeit suchen sie weit verstreute Grasmosaiken in den bewaldeten Hügeln auf, die sich nach regelmäßigen Buschbränden durch schnellen Auswuchs feuerresistenter Arten (*Themeda* und *Hyparrhenia*) regenerieren. Wenn das Gras vertrocknet ergänzen Rappenantilopen ihre Nahrung durch Kräuter (*Dolichos* und *Mucuna*), Leguminosen (*Letuca* und *Cryptosepalum*) sowie Laub von *Julbernardia*, *Taracanthus*, *Dombeya* und *Grewia*. Es ist bemerkenswert, daß die Tiere im Wechsel zwischen Regen- und Trockenzeit ausgedehnte Wanderungen (bis zu 40 km) unternehmen. Eine neuere Untersuchung des Panseninhaltes durch Reinhold Hofmann 1997 hat die bevorzugte Grasernährung der Rappenantilope bestätigt. Zusammen mit dem alimentären *browsing* verfolgt die Rappenantilope eine adaptive Ernährungsstrategie, die für die Aufrechterhaltung der ökotonen Vegetationsstruktur außerordentlich wichtig sein könnte. Jüngste Forschungsergebnisse zeigen die essentielle Bedeutung der afrotropischen Ökotope als Zentren der Biodiversität (Hobbs 1996). In welchem Maße wildlebende Ungulaten und insbesondere Rappenantilopen, die Dynamik von Ökotonen mitbestimmen, muß durch weitere Untersuchungen aufgeklärt werden.

6. Material und Methoden

6.1 Literatur und Kartenmaterial

Eine Literatur-Recherche (Nr. 32-94) zu *Hippotragus niger* (sable antelope) in der Datenbank BIOSIS ergab 69 Zitate über den Zeitraum 1969-30.4.1994.

Die geographischen Informationen des Programms Microsoft ENCARTA vers. 98 wurden verwendet.

6.2 Tiermaterial

Durch die dankenswerte Unterstützung von Dr. Siege und Dr. Baldus (SCP Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, Selous Conservation Programm), sowie von Dr. Richard Kock (Chefveterinär des Kenia Wildlife Service) konnte das in der Tabelle 1 aufgeführte Untersuchungsmaterial in die Projektstudie einbezogen werden. Alle verwendeten Bioproben wurden ordnungsgemäß im CITES-Verfahren deklariert und bearbeitet.

Tab. 1 Untersuchungsmaterial von Rappenantilopen (*Hippotragus niger sp.*) aus Ost-Afrika.

Probe	Ident. No.	Geschlecht	Unterart	Herkunft	Länge	Breite
1	S1	weibl.	<i>roosevelti</i>	Shimba Hills NR/ Kenia	4° 17' Süd	38° 39' Ost
2	S2	weibl.	<i>roosevelti</i>	Shimba Hills NR/ Kenia	4° 17' Süd	38° 39' Ost
3	S3	weibl.	?	Sadani GR/ Tansania	6° 4' Süd	38° 45' Ost
4	S4	männl.	?	Selous GR/ Tansania	8° 15' Süd	38° 44' Ost
5	S5	männl.	?	Selous GR/ Tansania	7° 52' Süd	38° 39' Ost
6	S6	männl.	?	Selous GR/ Tansania	7° 52' Süd	38° 44' Ost

6.3 DNA-Isolierung

Aus den vorliegenden Gewebeproben vom äußeren Ohr, die in 96% Äthanol fixiert waren, wurde mit Hilfe des QIAamp Tissue Kit (QIAGEN) genomische (Gesamt-)DNA isoliert. 300-500ng dieser DNA wurden für einen PCR-Ansatz verwendet.

6.4 PCR-Bedingungen

Folgende Primer wurden verwendet:

für die Amplifikation des Cytochrome-*b*-Gens

	5'	3'	
GluDG-L	TGA CTT GAA RAA CCA YCG TTG		Palumbi et al.91
CB1-L	CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA		Kocher et al.89
CB4a-L	AAC AAA GAA ACC TGA AAY ATY GG		Palumbi et al.91
CB3R-L	CAT ATT AAA CCC GAA TGA TAY TT		Palumbi et al.91
CB2-H	CCC TCA GAA TGA TAT TTG TCC TCA		Kocher et al. 89
CB3-H	GGC AAA TAG GAA RTA TCA TTC		Palumbi et al.91
CB6Thr-H	TTT CAT TCT TCG RCT TAC AAG		Palumbi et al.91

für die Amplifikation der Kontrollregion (D-loop)-

	5'	3'	
Pro-L	CTC CCA TTA GCA CCC AAA GC		Palumbi et al.91
HiPro-L	ACC ATT AGC ACC CAA AGC TG		Lieckfeldt 98
HiCtrII-L	AGT ACA TTA CAT GAT TTA CCC C		Lieckfeldt 98
HiCtrIII-L	CGA TGG ATT AAT GAT TAA TCA GC		Lieckfeldt 98
HiCtrI-H	ATG TAC GAT TAA ACA TTC TAT GTC		Lieckfeldt 98
HiCtrII-H	ATA GCT TGA GTC CAA GCA TCC		Lieckfeldt 98
Phe-H	CCG TCT AAA CAT TTT CAG TG		Palumbi et al.91
HiPhe-H	AGC ATT TTC AGT GCC CTT GC		Lieckfeldt 98
12SAR-H	ATA GTG GGG TAT CTA ATC CCA GTT		Palumbi et al.91

Die 50µl-PCR-Reaktionsansätze (Endkonzentration: 10mM Tris-HCl, pH 8,3, 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 200µM dNTPs) enthielten 0,8U AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin Elmer), je 50pmol des Hin- und Rückprimers sowie die oben angegebene Menge Template-DNA. Für die PCR wurde der GeneAmp PCR System 2400 Thermocycler (Perkin Elmer) genutzt. Die Reaktion verlief unter folgenden Bedingungen: ein 3-minütiger initialer Denaturierungsschritt bei 94° C, gefolgt von 30 Zyklen mit 15 Sekunden bei 94° C, 20 Sekunden bei 50°-55°C, 45 Sekunden bei 72° C und eine abschließende Elongation von 7 Minuten bei 72° C. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarosegel nachgewiesen und anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) gereinigt.

6.5 DNA-Sequenzierung

Nach der Kettenabbruchmethode mit Dideoxynukleotiden (Sanger et al. 1977) wurden die Fragmente direkt sequenziert. Dafür benutzten wir fluoreszenzgestützte Terminator Cycle Sequencing Kits (Dye/BigDye) und die automatischen Sequenzer 373A und 310C (Perkin Elmer/Applied Biosystems).

Die in der Projektstudie ermittelten DNA-Sequenzen wurden unter den Accession-Nummern: AF045230-AF045237 in die Internationale Genbank eingetragen.

6.6 Datenanalyse

Die Alinierung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe des CLUSTAL W Algorithmus (Higgins & Sharp 1989).

Für die Bestimmung diagnostischer Restriktionsorte aus den ermittelten Sequenzdaten wurde das Programm OLIGO herangezogen.

DNA-Sequenzstatistik und Bestimmungen verschiedener genetischer Distanz-Parameter wurden mit Hilfe des Programmpakets MEGA vers. 1.01 (Kumar et al. 1993) durchgeführt.

Die phylogenetischen Rekonstruktionen auf der Grundlage von Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe verschiedener Methoden, um einseitige Wertungen durch ein einziges Verfahren auszuschließen. Maximum parsimony (MP)- und Neighbor-Joining (NJ)-Stammbäume wurden mit Hilfe des Programmpakets PHYLIP (Felsenstein 1993) konstruiert. Für die Maximum-Likelihood (ML)-Methode wurde das Softwareprogramm PUZZLE (Strimmer & von Haeseler 1996) verwendet. Die statistische Prüfung der erhaltenen Stammbaumtopologien erfolgte mit Hilfe der Bootstrap-Methode (Felsenstein 1985, 100 Replikationen) in PHYLIP.

7. Ergebnisse

7.1 Sequenzdivergenz

Um die genealogischen Beziehungen zwischen geographisch getrennten Lokalpopulationen zu bestimmen, werden Sequenzunterschiede in schnell evolvierenden DNA-Abschnitten identifiziert. Art und Ausmaß der ermittelten Sequenzunterschiede erlauben Schlußfolgerungen über den Grad der genetischen Verwandtschaft zwischen den untersuchten Individuen und über die Dauer ihrer räumlichen Trennung. Wir wählten für diesen Vergleich das Cytochrom *b* Gen und die Kontrollregion der mitochondrialen DNA, weil sie sich schneller (d.h. in kürzeren Zeiträumen) als Kern-DNA verändern, matrilinear (d.h. mütterlicherseits) vererbt werden und keiner Beeinflussung durch zufällige sexuelle Rekombinationsereignisse unterliegen.

7.1.1 Cytochrom *b*

Das mitochondriale Cytochrom *b* Gen gehört zu den bestuntersuchten DNA Abschnitten in Säugetieren (Irwin, Kocher & Wilson 1991). Als Protein-kodierendes Gen liefert die abgeleitete Aminosäuresequenz zusätzliche Informationen über den molekularen Divergenzprozeß.

Das PCR-amplifizierte *cyt b* Gen von *Hippotragus niger sp.* besitzt eine Länge von 1140 Basenpaaren (bp) und das Translationsprodukt besteht aus 379 Aminosäuren, beginnend mit einem konservativen Methionin Initiationscodon (ATG) und abschließend mit einem AGA Stopcodon. Die prozentuale Basenzusammensetzung zeigt einen für Säuger typischen Mangel an Guaninresten speziell in der dritten Codonposition. Der prozentuale Netto-Basengehalt beträgt: Adenin (31.2%), Thymin (26.5%), Cytosin (29.1%), und Guanin (13.2%).

Die *cyt b* Sequenzen der Individuen SA1 und SA2 aus der Shimba Hills NR Population sind vollständig identisch..

Da die *cyt b* Sequenz keine Stopcodons, Deletionen und/oder Insertionen enthält und die typische Variation in der 1., 2. und 3. Codonposition aufweist, ist es sehr unwahrscheinlich, daß eine Kernkopie des mitochondrialen Gens sequenziert wurde (Zhang and Hewitt 1996).

von der Annahme einer uniformen Evolutions-geschwindigkeit der DNA-Sequenzen (p-Werte 94.06-100%).

27 der gemessenen Basensubstitutionen führen im *Oryx-Hippotragus*-Vergleich zu Aminosäureaustauschen. Im innerartlichen Vergleich treten 2 Aminosäureaustausche auf; SA4 und SA6 zeigen in Position 162 Lysin statt Glutamin und SA1 und SA2 besitzen in Position 348 ein Threonin statt Isoleucin.

Abb. 3 Abgeleitete Aminosäuresequenz des mitochondrialen Cytochrom *b* Gens von *Hippotragus niger* sp. in verschiedenen ostafrikanischen Lokalpopulationen. Identische Aminosäuren im Vergleich zur orthologen Sequenz von *Oryx leucoryx* werden nicht angezeigt.

	1	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
Oryx	MTNIRKTHSL	MKIVNNAFID	LPAPSNISSW	WNFGSLGIC	LILQILT?LF	LAMHYTSDTT	TAFSSVTHIC	RDVNYGWIIR	YMHANGASMF	FICLFMHVGR
SA1	.I.....P.T.P.G.MMMMMMM
SA2	.I.....P.T.P.G.MMMMMMM
SA3	.I.....P.T.P.G.MMMMMMM
SA4	.I.....P.T.P.G.MMMMMMM
SA5	.I.....P.T.P.G.MMMMMMM
SA6	.I.....P.T.P.G.MMMMMMM
	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111112
	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990
Oryx	GLY?GSYTFE	ETWNVGVILL	FATMATAF?G	YVLPWQMSF	WGATVITNLL	SAIPYIGTNL	VENIWWGFSV	DKATLRFYAI	FHFILPFYIA	ALAMVHLIFL
SA1	..Y.....K	..I.....TMMMMMMMM
SA2	..Y.....K	..I.....TMMMMMMMM
SA3	..Y.....K	..I.....TMMMMMMMM
SA4	..Y.....K	..I.....TMMMMMMMM
SA5	..Y.....K	..I.....TMMMMMMMM
SA6	..Y.....K	..I.....TMMMMMMMM
	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222223
	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990
Oryx	HETGSNNPTG	ITSDDKIPF	HPYYTIKDLI	GALLLILVLM	LLVLPAPDLL	GDPNYTPAN	PLNTPHHPK	EWYFLFAYAI	LRSIPNKLGG	VLALVLSILI
SA1S..AAAAAAAAAA
SA2S..AAAAAAAAAA
SA3S..AAAAAAAAAA
SA4S..AAAAAAAAAA
SA5S..AAAAAAAAAA
SA6S..AAAAAAAAAA
	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333
	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990
Oryx	LVLVLPALHMS	KQRSMFRPI	SQCIFWILVA	DLTLTWIGG	QPVEHPYIII	QQLASIMYFL	LILVLPVAVS	VIENNFLKW*		
SA1	..M.....TTTTTTM.G	S...KL
SA2	..M.....TTTTTTM.G	S...KL
SA3	..M.....TTTTTTM.G	S...KL
SA4	..M.....TTTTTTM.G	S...KL
SA5	..M.....TTTTTTM.G	S...KL
SA6	..M.....TTTTTTM.G	S...KL

Abb. 4 Maximum likelihood Distanzen basierend auf der kompletten *cyt b* Gen Sequenz

	Oryx	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6
Oryx	0,00000	0,13072	0,13072	0,13170	0,13423	0,13284	0,13403
SA1		0,00000	0,00000	0,00796	0,00976	0,00707	0,00796
SA2			0,00000	0,00796	0,00976	0,00707	0,00796
SA3				0,00000	0,00353	0,00088	0,00176
SA4					0,00000	0,00264	0,00176
SA5						0,00000	0,00088
SA6							0,00000

Die durchschnittliche Distanz über alle paarweisen Sequenzvergleiche (Abb. 4) beträgt 4,15%. Im zwischenartlichen *Oryx-Hippotragus*-Vergleich ist die mittlere Distanz $13,27 \pm 0,15\%$. Innerhalb der *Hippotragus*-Gruppe beträgt die mittlere genetische Distanz $0,38 \pm 0,30\%$. Die größte innerartliche Distanz besteht mit 0,976% zwischen den Individuen aus der Shimba Hills Region (SA1 und SA2) und SA4 aus dem Selous.

7.1.2 Kontrollregion

Die Kontrollregion der mitochondrialen DNA ist der variabelste, nicht-kodierende DNA-Abschnitt, der bisher bekannt ist. Er ist daher gut geeignet, Sequenzdifferenzen in relativ kurzen phylogenetischen Zeiträumen zu untersuchen.

Die PCR-amplifizierte und anschließend sequenzierte Kontrollregion von *Hippotragus niger sp.* besitzt eine Länge von 1083 Basenpaaren (Abb. 5). Der prozentuale Netto-Basengehalt beträgt: Adenin (32.0%), Thymin (27.3%), Cytosin (25.5%), und Guanin (15.2%).

Die Kontrollregion Sequenzen der Individuen SA1 und SA2 aus der Shimba Hills Population sind vollständig identisch, die Sequenzen von SA3 und SA6 stimmen ebenfalls überein.

Wie Abb. 5 zeigt, fallen die zwischenartlichen Sequenzunterschiede erwartungsgemäß hoch aus und von den 1259 Positionen (einschl. Alinierungsgaps) sind nur 886 Positionen (70.4% aller Positionen) konstant. Die Transitions/Transversions Rate beträgt 2.71 ± 0.28 .

Die Alinierung der Sequenzen benötigen eine erhebliche Anzahl von „indels“ (Insertions/Deletions-Ereignisse). Zur besseren Übersicht werden daher in Abb. 6 nur die variablen Positionen der kompletten Kontrollregion von *Hippotragus* gezeigt.

Abb. 5 Nukleotidsequenz der kompletten mitochondrialen Kontrollregion von *Hippotragus niger sp.* in verschiedenen ostafrikanischen Lokalpopulationen. Identische Nukleotide im Vergleich zur orthologen Sequenz von *Oryx leucoryx* werden nicht angezeigt.

		1	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990
oryx2	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
SA1	.A..G.....	.T....C.T.	.C...T.TCC...C...C...C...C...T....A.A.....A.....
SA2	.A..G.....	.T....C.T.	.C...T.TCC...C...C...C...C...T....A.A.....A.....
SA3	.A..G.....	.T....C.T.	.C...T.TCC...C...C...C...C...T....A.A.....A.....
SA4	.A..G.....	.T....C.T.	.C...T.TCC...C...C...C...C...T....A.A.....A.....
SA5	.A..G.....	.T....C.T.	.C...T.TCC...C...C...C...C...T....A.A.....A.....
SA6	.A..G.....	.T....C.T.	.C...T.TCC...C...C...C...C...T....A.A.....A.....
	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111112
oryx2	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990	1234567890
SA1	ACACACCTGC	ACGCAGGAAC	TTCAATAACAC	TACTATAAAC	AAATACC-AC	ACCCACATAA	CCCACCTTAC	TGCACATGAG	CCAGCAGCSTA	TACAAATCATC	
SA2T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.	
SA3T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.	
SA4T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.	
SA5T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.	
SA6T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.T.C.CTC.	
	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222223
oryx2	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990	1234567890
SA1	ACAAACATGG	CATACCTACA	AAATGTATAA	CGACCTACTC	ATATATAAAC	CAATATATGC	AAACTGATGT	ACTGCAAAACA	CGACGTATGC	GCAGTGCATC	
SA2	
SA3	
SA4	
SA5	
SA6	
	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333333	3333333334
oryx2	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990	1234567890
SA1	AAACAGTTAT	ACACGCCAAA	GACGTACAAA	AATACATTA	CGTCCACAAA	GTACTGTATG	CCATACATTA	AGTGATTAT	TCATACAGT	-TCATTACA	
SA2	
SA3	
SA4	
SA5	
SA6	
	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444445
oryx2	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990	1234567890
SA1	CATGTTGATG	TACCAAGGAC	ATAACATGTA	CGTAGTACAT	AA-ATAATTC	AACCTACTTA	CGTAGGTTGA	GTAGTACATA	TAGATCAATG	CATCCAGAC	
SA2	
SA3	
SA4	
SA5	
SA6	
	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555556
oryx2	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990	1234567890
SA1	ATAAATATGTA	TATAGTACAT	TAAATTATTG	TCCCATCGCG	TATAAGCCAG	TACTGTTTAA	ACATTAACCG	TACATTAAGA	CATAATATGG	TTAATCGTAC	
SA2	
SA3	
SA4	

Fortsetzung Abb. 5

SA5	..G.....	..C..G...T	A.....AA..	...-A..AT-	.TC....TA.-G..GA...T
SA6	..G.....	..C..G...T	A.....AA..	...-A..AT-	.TCC...TA.-G..GA...T
	6666666666	6666666666	6666666666	6666666666	6666666666	6666666666	6666666666	6666666666	6666666666
	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889
oryx2	ATAGCACCATT	TAAGTCAAAT	CCATTCTTGT	CAACATGCGT	ATCCCGCCCA	TTAGATCAGC	AGCTTAATTA	CCATGCCCGC	T?AAACCAAC
SA1C	..G.C...C	A.....A..C..C..G..G..T..
SA2C	..G.C...C	A.....A..C..C..G..G..T..
SA3GCC...AA..T..A..C..C..G..G..T..
SA4GCC...AA..T..A..C..G..G..G..T..
SA5GCC...AA..T..A..C..G..G..G..T..
SA6GCC...AA..T..A..C..G..G..G..T..
	7777777777	7777777777	7777777777	7777777777	7777777777	7777777777	7777777777	7777777777	7777777778
	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889
oryx2	GCAGGGATCT	CTCTTCTCGC	TCCGGGCCCA	TTACTTGTGG	GGGTAGCTAA	TAAATGAAGT	TTATCAGACA	TCTGGTCTCT	TCTTCAGGGC
SA1CA.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....
SA2CA.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....
SA3CA.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....
SA4CA.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....
SA5CA.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....
SA6CA.....C.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....
	8888888888	8888888888	8888888888	8888888888	8888888888	8888888888	8888888888	8888888888	8888888889
	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889
oryx2	AAAGTCGCC	ACTCTTCC	CTTAAATAAG	ACATCTCGAT	GGACTAATGA	CTAATCAGCC	CATGCCACCA	CATAACTGTG	CTGTATGCA
SA1A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....
SA2A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....
SA3A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....
SA4A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....
SA5A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....
SA6A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....
	9999999999	9999999999	9999999999	9999999999	9999999999	9999999999	9999999999	9999999999	9999999999
	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889
oryx2	TTTAATTTTC	GGGGATGCTT	GGACTCAGCT	ATGGCCGTCT	GAGGCCCCGA	CGCAGAGCAT	ATATTGTAGC	TGGACTTAAC	TGCATCTTGA
SA1T.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
SA2T.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
SA3T.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
SA4T.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
SA5T.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
SA6T.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111
	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000001
oryx2	AATGGTAAAG	ACGCGTATCA	CAGTCAATGG	TAAACAAG-C	ATGGTTTGTG	ATTAAGCATG	GACATTATAG	TTAATGGTCA	CAGGACATAA
SA1G.....AAC.....GGA.T.....TG.....A.....A.....A.....A.....A.....C.....C.....C.....CT.....TT.C.....-
SA2G.....AAC.....GGA.T.....TG.....A.....A.....A.....A.....A.....C.....C.....C.....CT.....TT.C.....-
SA3G.....T.GAC.....GGA.T.....TGT.....A.....A.AC.....A.....A.AC.....A.....C.....C.....C.....CT.....TT.C.....-
SA4G.....AAC.....GGA.T.....TGT.....A.....A.AC.....A.....A.AC.....A.....C.....C.....C.....GT.....TT.C.....-
SA5G.....T.GAC.....GGA.T.....TGT.....A.....A.AC.....A.....A.AC.....A.....C.....C.....C.....CT.....TT.C.....-
SA6G.....T.GAC.....GGA.T.....TGT.....A.....A.AC.....A.....A.AC.....A.....C.....C.....C.....T.....TT.C.....-
	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111
	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889
oryx2	CTTCCCTAG	GCCCTCCCT	TTTCCCTTAC	CCC-GTTTTC	AACATACFCC	CCCCAAGATG	CTAATTTAAA	TTTATCCCTAT	TTCCAATACT
SA1AG.....A.....TA.....GAC.....T.....C.....T.....C.....T.....C.....TG.....G.....GCT.....G.....CCT.....
SA2AG.....A.....TA.....GAC.....A.....TA.....T.....C.....T.....C.....TG.....G.....GCT.....G.....CCT.....
SA3AG.....A.....TA.....GAC.....A.....TA.....T.....C.....T.....C.....TG.....G.....GCT.....G.....CCT.....
SA4AG.....A.....TA.....AAC.....A.....TA.....T.....C.....T.....C.....TG.....G.....GCT.....G.....CCT.....
SA5AG.....A.....TTA.....GAC.....A.....TA.....T.....C.....T.....C.....TG.....G.....GCT.....G.....CCT.....
SA6AG.....A.....TA.....GAC.....A.....TA.....T.....C.....T.....C.....TG.....G.....GCT.....G.....CCT.....
	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111
	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222
	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889
oryx2	TAAATTAGCA	CTCCAAGCAA	AGTAAGTATA	TAAGCACCCG	GACCATCTTA	TAACACACA			
SA1GA.....TA.....AG.....TA.....TA.....TA.....TA.....TA.....TA.....
SA2GA.....TA.....AG.....TA.....TA.....TA.....TA.....TA.....TA.....
SA3GA.....TA.....AG.....TA.....TA.....TA.....TA.....TA.....TA.....
SA4T.....GA.....TA.....AG.....TA.....TA.....TA.....TA.....TA.....TA.....
SA5GA.....TA.....AG.....TA.....TA.....TA.....TA.....TA.....TA.....
SA6GA.....TA.....AG.....TA.....TA.....TA.....TA.....TA.....TA.....

Abb. 6 zeigt 49 variable Nukleotidsequenzpositionen innerhalb der *Hippotragus*-Gruppe, von denen 33 in mehr als einem Individuum vorkommen und daher phylogenetisch informativ sind. Alle Basensubstitutionen sind Transitionen (A G bzw. C T) mit Ausnahme des Tieres SA4, daß in Position 915 eine Transversion vom Typ C G oder T G aufweist. Zusätzlich existiert in Position 398 der Alinierung eine informative Insertion/Deletion; während die Individuen SA1 und SA2 einen Thymidinrest (T) besitzen, fehlt dieser bei den übrigen Tieren.

Abb. 6 Variable Nukleotidsequenzpositionen in einem 1083 bp Abschnitt der Kontrollregion von *Hippotragus niger* sp. aus verschiedenen ostafrikanischen Lokalpopulationen. Identische Nukleotide im Vergleich zur orthologen Sequenz des Individuums SA1 werden nicht angezeigt.

	1112222223	3333333333	3344444444	4444555678	8888899990
	0480357890	0011123347	7900244466	6689379324	4578815554
	8566174631	5602323920	9802707901	2525636555	9110350267
SA1	GCGTGATCTA	GGGACACCAA	ATCTCACGGT	CCCATTCCGG	CACGTCACGC

SA2
 SA3 AT.C.GCTC. A.AGT.TTG. -TCTGTAAC .TT.CC..A. TGTACT....
 SA4 .TACAGCT.G AAAGTGTGG G-TC..TAA. TTTG.CTTAA ..TACGG.AT
 SA5 AT.C.GCTC. A.AGT.TTG. -T.TGTAAC .TT.CC..A. TGTAC..T..
 SA6 AT.C.GCTC. A.AGT.TTG. -TCTGTAAC .TT.CC..A. TGTACT....

Die durchschnittliche Distanz über alle paarweisen Sequenzvergleiche (Abb. 7) beträgt 6,8%. Im zwischenartlichen *Oryx-Hippotragus*-Vergleich ist die mittlere Distanz $18,08 \pm 0,73\%$. Innerhalb der *Hippotragus*-Gruppe beträgt die mittlere genetische Distanz $2,23 \pm 1,38\%$. Die größte innerartliche Distanz besteht mit 3,78% zwischen den Individuen aus dem Shimba Hills NR (SA1 und SA2) und SA4 aus dem Selous GR.

Abb. 7 Maximum likelihood Distanzen basierend auf der kompletten Kontrollregion Sequenz

	Oryx	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6
Oryx	0,00000	0,17178	0,17178	0,18286	0,18906	0,18523	0,18401
SA1		0,00000	0,00000	0,03109	0,03782	0,03009	0,03108
SA2			0,00000	0,03109	0,03782	0,03009	0,03108
SA3				0,00000	0,02252	0,00278	0,00000
SA4					0,00000	0,02440	0,02252
SA5						0,00000	0,00278
SA6							0,00000

7.1.3 Kombinierte mtDNA-Abschnitte

Die beiden untersuchten DNA-Abschnitte liegen gemeinsam auf dem ringförmigen mitochondrialen Chromsomen, sie werden gekoppelt vererbt und unterliegen keiner sexuellen Rekombination. Daher ist es gerechtfertigt die kombinierten Sequenzen als einheitliches genetisches Merkmal zu behandeln.

Von den 2399 Nukleotidpositionen sind 1885 (78.6% aller Orte) konstant. Die Transition/Transversion Rate beträgt $4,44 \pm 0,60\%$. Die Nukleotidzusammensetzung ergibt sich zu 31,6% Adenin, 27,3% Cytosin, 14,2% Guanin und 26,9% Thymin. Ein 5% Chi-Quadrat Test der Divergenzrate ergibt keine Abweichungen von der Annahme einer uniformen Evolutionsgeschwindigkeit der DNA-Sequenzen (p-Werte 99,02% -99,99%).

Die kombinierte 2399 bp Sequenz, aliniert mit *Oryx* enthält 326 variable und 47 phylogenetisch informative Positionen. Innerhalb der *Hippotragus*-Gruppe werden 61 variable und davon 42 phylogenetisch informative Positionen registriert. Die kombinierten Sequenzen der Tiere SA1 und SA2 aus dem Shimba Hills NR sind vollkommen identisch. Abb. 8 zeigt die Anzahl von Transitionen und Transversionen im paarweisen Vergleich.

Abb. 8 Anzahl Transitionen (über der Diagonalen) und Transversionen (unter der Diagonalen) im paarweisen Vergleich der kombinierten Kontrollregion- und Cytochrom *b* Sequenzen.

	Oryx	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6
Oryx	-	220	220	232	236	234	234
SA1	69	-	0	42	49	40	42
SA2	69	0	-	42	49	40	42
SA3	69	0	0	-	26	4	2
SA4	71	2	2	2	-	27	24
SA5	69	0	0	0	2	-	4
SA6	69	0	0	0	2	0	-

Im zwischenartlichen *Oryx-Hippotragus*-Vergleich ist die mittlere genetische Distanz $15,52 \pm 0,42\%$ (Abb. 9). Innerhalb der *Hippotragus*-Gruppe beträgt die mittlere genetische Distanz $1,44 \pm 0,78\%$. Die größte innerartliche Distanz besteht mit $2,34\%$ zwischen den Individuen aus dem Shimba Hills NR (SA1 und SA2) und SA4 aus dem Selous GR.

Abb. 9 Maximum likelihood Distanzen basierend auf der kombinierten Kontrollregion- und Cytochrom *b* Sequenz.

	Oryx	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6
Oryx	0.00000	0.15002	0.15002	0.15581	0.16007	0.15753	0.15756
SA1		0.00000	0.00000	0.01917	0.02336	0.01824	0.01918
SA2			0.00000	0.01917	0.02336	0.01824	0.01918
SA3				0.00000	0.01274	0.00180	0.00090
SA4					0.00000	0.01319	0.01182
SA5						0.00000	0.00180
SA6							0.00000

7.2 Molekulare Phylogenie

Quantitative genetische Beziehungen zwischen Rappenantilopen aus verschiedenen Lokalpopulationen können mit Hilfe von Ähnlichkeits (Maximum Likelihood)-, Sparsamkeits (Parsimony)- und Distanzmethoden (Neighbor-joining) ermittelt werden. In jedem Falle werden die Analyseergebnisse in Form von Netzwerken oder Dendrogrammen dargestellt, die einen optischen Eindruck von der Topologie und Intensität der genetischen Beziehungen vermitteln. Die erhaltenen genetischen Beziehungsstrukturen können mit verschiedenen statistischen Verfahren auf Gültigkeit geprüft werden. Abb. 10 zeigt einen Parsimony-Stammbaum, auf der Grundlage der kombinierten Nukleotidsequenzen (2399 bp), die 326 variable und 47 phylogenetisch informative Orte enthalten. Als Außengruppe wird die orthologe Sequenz von *Oryx leucoryx* gewählt. Außengruppen ermöglichen es, dem konstruierten Stammbaum eine evolutionäre Richtung zu geben. Allerdings ist die Wahl der Außengruppe bei innerartlichen Vergleichen, wie im vorliegenden Fall, problematisch und wäre am günstigsten durch eine näherverwandte *Hippotragus*-Subspezies (z.B. *H.n.niger*) zu bewältigen.

Abb. 10 Maximum-Parsimonie-Stammbaum der kombinierten mitochondrialen DNA-Sequenzen von Rappenantilopen aus Ostafrika mit der orthologen Sequenz von *Oryx* als Außengruppe. Die Verzweigungspunkte „a“ und „b“ werden angezeigt

Es werden drei gleichlange Parsimonie-Stammbäume produziert, die 461 Schritte benötigen und sich nur leicht in der Anordnung der Sequenzen A3-A6 unterscheiden.

Alle drei Stammbäume zeigen eine deutliche Trennung der Sequenzen SA1 und SA2 von den übrigen *Hippotragus*-Sequenzen. Alternative Rekonstruktionsmethoden (ML und NJ) liefern ähnliche Ergebnisse (nicht gezeigt). In jedem Falle sind die Tiere aus Shimba Hills NR genetisch getrennt von den Tieren aus den Einstandsgebieten in Tansania (SA3-SA6). Die Verwandtschaft zwischen den letzteren ist grundsätzlich größer, läßt sich aber aufgrund der verfügbaren Daten nicht sicher auflösen. Auf der Basis des kompletten Datensatzes bildet das Tier südlich vom Rufiji (SA4) eine eigene Linie, die von den enger miteinander verwandten Tieren nördlich des Rufiji (SA3, SA5 und SA6) meistens getrennt ist. Wenn die Kontrollregion-Sequenzen gesondert analysiert werden, ergibt sich ebenfalls eine genetische Differenzierung zwischen SA4 und den Sequenzen SA3, SA5 und SA6. Auf der Basis der Cytochrom *b*-Sequenzen läßt sich aber die Verwandtschaft zwischen den Tieren aus Tansania nicht sicher auflösen.

Die statistische Analyse der erhaltenen Stammbaumtopologien konzentriert sich daher auf folgende Fragen:

1. Wie sicher ist die beobachtete, genetische Differenzierung der Rappenantilopen aus Shimba Hills NR/Kenia ?
2. Wie sicher ist die beobachtete, genetische Differenzierung der Rappenantilope aus dem Selous GR südlich des Rufiji (SA4) innerhalb der Gruppe aus Tansania ?

Dazu wurde die statistische Sicherheit der Verzweigungspunkte „a“ und „b“ in Abb. 10 mit Hilfe des bootstrap-Verfahrens bestimmt (Tab. 2). In allen angewendeten Stammbaum-rekonstruktionen divergieren die Sequenzen der Rappenantilopen aus Shimba Hills NR/Kenia mit einer bootstrap-Wahrscheinlichkeit von 100%. Nur auf der Grundlage der Aminosäure Sequenzen des Cytochrom *b* Gens bilden die Sequenzen SA1 und SA2 im Distanzverfahren keinen gesonderten Zweig (bootstrap-Wahrscheinlichkeit > 50%), was durch die geringe Zahl von Aminosäureaustauschen auch zu erwarten ist. Eine phylogenetische Trennung der Sequenz SA4 von den Sequenzen SA3, SA5 und-SA6 wird durch die Kontrollregion mit hohen bootstrap-Werten (100%) unterstützt. Auf der Grundlage des Cytochrom *b* Gen kann SA3 einen eigenen Zweig bilden.

Tab. 2 Bootstrap-Werte für die Divergenzpunkte „a“ (vor der Diagonalen) und „b“ (hinter der Diagonalen) in Abb. 10 bei verschiedenen phylogenetischen Rekonstruktionsverfahren. n.a. bedeutet nichtaufgelösten Divergenzpunkt und * steht für SA3 statt SA4

mtDNA-Abschnitt	Maximum-Parsimonie	Maximum-Likelihood	Neighbor-Joining
-----------------	--------------------	--------------------	------------------

Cytochrom b Nukleotide	100% / *	n.a / *	100% / n.a.
Cytochrom b Aminosäuren	100% / *	n.a. / n.a.	46% / *
Kontrollregion	100% / 100%	n.a. / 100%	100% / 100%
kombiniert	100% / 100%	n.a. / 100%	100% / 100%

7.3 Divergenzzeiten

Die robusten phylogenetischen Beziehungen der untersuchten Rappenantilopen in Abb. 10 erlauben in Verbindung mit einer molekularen Uhr (Li, Tanimura & Sharp 1987), eine Abschätzung der ungefähren zeitlichen Trennung der genetischen (Matri-) Hauptlinien. Legt man eine mittlere Substitutionsrate von grobgeschätzt 1% pro 1 Millionen Jahre für die gesamte mtDNA von Säugetieren entlang einer Linie zugrunde (Wilson et al 1985), so ergibt sich bei einer Sequenzdivergenz von durchschnittlich $1,996 \pm 0,229$ zwischen der *Hippotragus*-Linie in Shimba Hills NR und den *Hippotragus*-Linien in Tansania, daß sich beide Linien vor etwa 1 Millionen Jahre getrennt haben.

7.4 Phylogeographie

Eine Analyse der molekularen Varianz (AMOVA) zeigt, daß die küstennahe, ostafrikanische Rappenantilopen-Population hoch strukturiert ist (Tab. 3). Der Φ_{ST} Wert beträgt 0,941 ($p = 0,037$). Der Φ_{ST} Wert ist die Korrelation zwischen zufälligen Haplotypen in einer Population, glieder der Population unterschiedliche Haplotypen besitzen. Mit Hilfe der Φ -Statistik läßt sich prüfen, ob weitere geographische, taxonomische oder andere Aufteilungen der Gesamtpopulation gestützt werden (Excoffier, Smouse & Quattro 1992). Der resultierende Φ_{CT} Wert ist die Korrelation von zufälligen Haplotypen in einer Gruppe von Populationen, relativ zu allen Haplotypen einer Spezies und bestimmt den Anteil der genetischen Variation zwischen den Gruppierungen. Solche Gruppierungen, die den Φ_{CT} Wert maximieren und signifikant unterschiedlich von einer Zufallsverteilung der Individuen sind, werden als die wahrscheinlichsten geographischen, taxonomischen oder anderen Gruppen angesehen.

Tab. 3 AMOVA Ergebnisse für die regionale und lokale Unterteilung der küstennahen Rappenantilopen-Population in Ost-Afrika.

Gruppierungen	Anzahl Gruppen	Φ -Statistik	p-Wert
keine	1	$\Phi_{ST} = 0,941$	0,0370
Kenia (Shimba Hills NR) vs Tansania (Sadani GR, Selous GR)	2	$\Phi_{ST} = 0,955$ $\Phi_{SC} = 0,926$ $\Phi_{CT} = 0,605$	0,0340 0,1479 <0,0010
Shimba Hills NR vs. Sadani GR vs. Selous GR	3	$\Phi_{ST} = 0,943$ $\Phi_{SC} = 0,926$ $\Phi_{CT} = 0,229$	0,0420 <0,0010 0.1888
Shimba Hills NR vs. nördl. Rufiji vs. südl. Rufiji	3	$\Phi_{ST} = 0,949$ $\Phi_{SC} = 0,200$ $\Phi_{CT} = 0,937$	0,0490 0,4725 <0,0010

Das Resultat der AMOVA-Analyse in Tab. 3 ergibt den höchsten Φ_{CT} Wert ($\Phi_{CT} = 0,937$; $p < 0,001$), wenn die Gesamtpopulation in drei Subpopulationen (1) Shimba Hills NR, (2) nördlich des Rufiji und (3) südlich des Rufiji unterteilt wird. Dagegen sinkt der Φ_{CT} Wert dramatisch auf 0,229, $p = 0,1888$ ab, wenn die Gesamtpopulation nach den drei Schutzgebieten (1) Shimba Hills NR, (2) Sadani GR und (3) Selous GR unterteilt wird. Dieses Ergebnis weist nachdrücklich daraufhin, daß der Rufiji offensichtlich eine wirksame geographische Barriere für die genetische Differenzierung der küstennahen Rappenantilopen-Population in Ost-Tansania darstellt. Weitere Unterstützung kommt durch die Anwendung einer Methode von Page 1993, die nach der besten Übereinstimmung zwischen dem Gen-Stammbaum und einem optimalen geographischen Netzwerk sucht.

Abb. 11 Zoogeographische Kartierung der mtDNA-Linien von Rappenantilopen in Ost-Afrika. Duplikationen sind durch Pfeile angezeigt.

Abbildung 11 zeigt, daß die beste Übereinstimmung mit nur einer Überlappung erreicht wird, wenn die mtDNA-Sequenzen durch den Rufiji getrennt werden. Die Annahme, daß sich die mtDNA-Sequenzen auf die Schutzgebiete Sadani GR und Selous GR verteilen, benötigt zwei Duplikationen und ist daher abzulehnen.

7.5 Genfluß

Auf der Grundlage des erstellten Datensatzes können erste Abschätzungen des genetischen Austausches zwischen geographisch getrennten Lokalpopulationen nach einer Methode von Hudson, Slatkin und Maddison 1992 durchgeführt werden. Es werden 3 Lokalpopulationen (Shimba Hills NR, nördl. Rufiji und südl. Rufiji) definiert.

Tab. 4 Bestimmung des genetischen Austausches zwischen Lokalpopulationen der ostafrikanischen Rappenantilope. F_{ST} Werte (unter der Diagonale) und N_m (über der Diagonale).

	Shimba Hills NR	nördl. Rufiji	südl. Rufiji
Shimba Hills NR	-	0,02	0,00
nördl. Rufiji	0,9597	-	0,03
südl. Rufiji	1,0000	0,9398	-

Die Resultate in Tab. 4 geben keinen Hinweis auf demographischen und genetischen Austausch zwischen den definierten Lokalpopulationen. Dagegen läßt sich ein moderater Genfluß ($N_m = 3,2$) zwischen den etwa 200 km voneinander entfernten Populationen im Sadani GR und Selous GR

feststellen. Diese Ergebnisse müssen allerdings als vorläufig betrachtet werden, da die Stichprobenanzahl (6 Individuen) relativ zur Populationsgröße (ca. 1600 Individuen) gering ist.

7.6 Diagnostische Genmarken

Für die Entwicklung einer einfachen Labormethode zum schnellen Nachweis von DNA-Sequenz-Unterschieden zwischen Rappenantilopen aus den Lokalpopulationen in Kenia und Tansania sollte eine PCR-gestützte Analyse von DNA-Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen genutzt werden. Diese Methode beruht auf nachgewiesenen DNA-Sequenzunterschieden, ohne in jedem Falle eine aufwendige Sequenzierung individueller Gene durchführen zu müssen. DNA-Sequenzunterschiede werden auf ihre Eignung als Schnittorte für spezifische Restriktionsorte geprüft. Die An- bzw. Abwesenheit solcher Schnittorte führt nach entsprechender Restriktion zu unterschiedlichen und damit diagnostischen Schnittmustern, die mit einfachen elektrophoretischen Auftrennungsverfahren nachgewiesen werden können. Tab. 5 zeigt das Ergebnis der Suche nach diagnostischen Restriktionsorten im Vergleich der Cytochrom *b* Sequenzen von Tieren aus Shimba Hills NR und Sadani GR.

Tab. 5 Restriktionsorte in der kompletten Nukleotidsequenz des Cytochrom *b* Gens von Rappenantilopen aus (A) Shimba Hills NR und (B) Sadani GR. Diagnostische, d.h. exclusive in der jeweiligen Sequenz vorkommende Schnittorte sind fettgedruckt.

A.

<u>Enzym</u>	<u>Ort</u>	<u>Schnitte</u>	<u>Positionen (und Fragmentgrößen)</u>			
AatI	AGG [^] CCT	1	(300)	300	(841)	
AatII	GACGT[^]C	1	(214)	214	(927)	
AccI	GT [^] MKAC	1	(508)	508	(633)	
AcyI	GR[^]CGYC	1	(214)	214	(927)	
AlwI	GGATC (4/5)	1	(313)	313	(828)	
ApoI	R [^] AATTY	1	(629)	629	(512)	
AvrII	C [^] CTAGG	2	(108)	108	(579)	687 (454)
BanI	G [^] GYRCC	1	(691)	691	(450)	
BbiII	GR[^]CGYC	1	(214)	214	(927)	
BclI	T [^] GATCA	1	(2)	2	(1139)	
BlnI	C [^] CTAGG	2	(108)	108	(579)	687 (454)
BmyI	GDGCH [^] C	1	(692)	692	(449)	
BsaBI	GATNN [^] NNATC	1	(3)	3	(1138)	
BsaHI	GR [^] CGYC	1	(214)	214	(927)	
BsiBI	GATNN [^] NNATC	1	(3)	3	(1138)	
BsiQI	T [^] GATCA	1	(2)	2	(1139)	
Bsp1286I	GDGCH [^] C	1	(692)	692	(449)	
BspHI	T [^] CATGA	1	(85)	85	(1056)	
BspMI	ACCTGC (4/8)	2	(587)	587	(325)	912 (229)
BsrFI	R [^] CCGGY	1	(1105)	1105	(36)	
Cfr10I	R [^] CCGGY	1	(1105)	1105	(36)	
Eco64I	G [^] GYRCC	1	(691)	691	(450)	
Eco130I	C [^] CWWGG	2	(108)	108	(579)	687 (454)
Eco147I	AGG [^] CCT	1	(300)	300	(841)	
EcoT14I	C [^] CWWGG	2	(108)	108	(579)	687 (454)
EcoT22I	ATGCA [^] T	1	(286)	286	(855)	
FbaI	T [^] GATCA	1	(2)	2	(1139)	
HgaI	GACGC (5/10)	1	(640)	640	(501)	
HinII	GR[^]CGYC	1	(214)	214	(927)	
HincII	GTY [^] RAC	1	(217)	217	(924)	
HindII	GTY [^] RAC	1	(217)	217	(924)	
MamI	GATNN [^] NNATC	1	(3)	3	(1138)	
Mph1103I	ATGCA [^] T	1	(286)	286	(855)	
MseI	T[^]TAA 3	(121)	121	(556)	677	(126) 803 (338)
MslI	CAYNN [^] NNRTG	2	(83)	83	(918)	1001 (140)
NsiI	ATGCA [^] T	1	(286)	286	(855)	
NspI	RCATG [^] Y	2	(246)	246	(42)	288 (853)
Ppu10I	A [^] TGCAT	1	(286)	286	(855)	
RcaI	T [^] CATGA	1	(85)	85	(1056)	
Sau96I	G [^] GNCC	1	(141)	141	(1000)	

ScaI	AGT [^] ACT	3	(726)	726	(177)	903	(186)	1089	(52)
SduI	GDGCH [^] C	1	(692)	692	(449)				
SfaNI	GCATC (5/9)	2	(259)	259	(801)	1060	(81)		
SfcI	C [^] TRYAG	1	(374)	374	(767)				
SpeI	A [^] CTAGT	1	(723)	723	(418)				
SspI	AAT [^] ATT	1	(264)	264	(877)				
StuI	AGG [^] CCT	1	(300)	300	(841)				
StyI	C [^] CWWGG	2	(108)	108	(579)	687	(454)		

Nichtschneidende Enzyme:

AccIII, Acc65I, AflIII, AflIII, AgeI, Alw21I, Alw26I, Alw44I, AlwNI, Aor51HI, ApaI, ApaLI, AscI, AseI, AsnI, AspI, Asp700I, Asp718I, AspEI, AspHI, AsuII, AvaI, AviIII, AxyI, BalI, BamHI, BanII, BanIII, BbeI, BbrPI, BbsI, BbuI, BbvI, BcgI, BcoI, BfrI, BglI, BglIII, BpmI, Bpu1102I, BpuAI, BsaI, BsaAI, BsaMI, BsaOI, BsaWI, BscI, Bsc91I, BscCI, BseAI, BseNI, BsgI, Bsh1285I, BsiCI, BsiEI, BsiHKAI, BsiMI, BsiWI, BsiXI, BsmI, BsmAI, BsmFI, Bsp13I, Bsp68I, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp143II, Bsp1407I, BspCI, BspDI, BspEI, BspMII, BspM90I, BspXI, BsrI, BsrBI, BsrDI, , BsrGI, BssHII, BstI, Bst7II, Bst1107I, BstBI, BstEII, BstPI, BstUI, BstXI, BstYI, BstZI, Bsu15I, Bsu23I, Bsu36I, CcrI, CelII, Cfr9I, Cfr42I, ClaI, CpoI, CspI, Csp45I, CvnI, DraI, DraII, DraIII, DrdI, DsaI, EaeI, EagI, Eam1104I, Eam1105I, EarI, Ecl136II, EclXI, Eco24I, Eco31I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco57I, Eco72I, Eco81I, Eco88I, Eco91I, Eco105I, EcoICRI, EcoNI, EcoO65I, EcoO109I, EcoRI, EcoRV, EheI, EspI, Esp3I, FdiII, FokI, FspI, GsuI, HaeII, , HgiAI, HindIII, HpaI, HphI, KasI, KpnI, Kpn2I, KspI, Ksp632I, LspI, MboII, McrI, MflII, MluI, MroI, MscI, MspAI, MstI, MstII, MunI, MvaI269I, NaeI, NarI, NciI, NcoI, NdeI, NgoMI, NheI, NotI, NruI, NspIII, NspV, NspBII, PacI, PaeI, Paer7I, Pfl23II, PflMI, PinAI, PleI, PmaCI, PmeI, PmlI, PpuMI, PshAI, Psp5II, Psp1406I, PspAI, PstI, PvuI, PvuII, RsrII, SacI, SacII, SalI, SapI, SauI, SexAI, SfiI, SfuI, SgrAI, SmaI, SnaBI, SnaI, SphI, SphII, SphIII, SrfI, Sse8387I, SstI, SstII, SunI, SwaI, Tth111I, Van91I, VspI, XbaI, XcmI, XhoI, XhoII, XmaI, XmaIII, XmnI, XorII.

B.

<u>Enzym</u>	<u>Ort</u>	<u>Schnitte</u>	<u>Positionen (und Fragmentgrößen)</u>						
AatI	AGG [^] CCT	1	(300)	300	(841)				
AccI	GT [^] MKAC	1	(508)	508	(633)				
AlwI	GGATC (4/5)	1	(313)	313	(828)				
ApoI	R [^] AATTY	1	(629)	629	(512)				
AvrII	C [^] CTAGG	2	(108)	108	(579)	687	(454)		
BanI	G [^] GYRCC	1	(691)	691	(450)				
BclI	T [^] GATCA	1	(2)	2	(1139)				
BlnI	C [^] CTAGG	2	(108)	108	(579)	687	(454)		
BmyI	GDGCH [^] C	1	(692)	692	(449)				
BsaBI	GATNN [^] NNATC	1	(3)	3	(1138)				
BsiBI	GATNN [^] NNATC	1	(3)	3	(1138)				
BsiQI	T [^] GATCA	1	(2)	2	(1139)				
Bsp1286I	GDGCH [^] C	1	(692)	692	(449)				
BspHI	T [^] CATGA	1	(85)	85	(1056)				
BspMI	ACCTGC (4/8)	2	(587)	587	(325)	912	(229)		
BsrFI	R [^] CCGGY	1	(1105)	1105	(36)				
Cfr10I	R [^] CCGGY	1	(1105)	1105	(36)				
EaeI	Y[^]GGCCR	1	(1103)	1103	(38)				
Eco64I	G [^] GYRCC	1	(691)	691	(450)				
Eco130I	C [^] CWWGG	2	(108)	108	(579)	687	(454)		
Eco147I	AGG [^] CCT	1	(300)	300	(841)				
EcoT14I	C [^] CWWGG	2	(108)	108	(579)	687	(454)		
EcoT22I	ATGCA [^] T	1	(286)	286	(855)				
FbaI	T [^] GATCA	1	(2)	2	(1139)				
HgaI	GACGC (5/10)	1	(640)	640	(501)				
HincII	GTY [^] RAC	1	(217)	217	(924)				
HindII	GTY [^] RAC	1	(217)	217	(924)				
MamI	GATNN [^] NNATC	1	(3)	3	(1138)				
Mph1103I	ATGCA [^] T	1	(286)	286	(855)				
MseI	T[^]TAA 2	(121)	121	(556)	677	(464)			
MslI	CAYNN [^] NNRTG	3	(83)	83	(918)	1001	(82)	1083	(58)
NsiI	ATGCA [^] T	1	(286)	286	(855)				
NspI	RCATG [^] Y	2	(246)	246	(42)	288	(853)		
Ppu10I	A [^] TGCAT	1	(286)	286	(855)				
RcaI	T [^] CATGA	1	(85)	85	(1056)				
Sau96I	G [^] GNCC	1	(141)	141	(1000)				
ScaI	AGT[^]ACT	2	(726)	726	(177)	903	(238)		
SduI	GDGCH [^] C	1	(692)	692	(449)				
SfaNI	GCATC (5/9)	2	(259)	259	(801)	1060	(81)		
SfcI	C [^] TRYAG	1	(374)	374	(767)				
SpeI	A [^] CTAGT	1	(723)	723	(418)				

SspI	AAT [^] ATT	1	(264)	264	(877)
StuI	AGG [^] CCT	1	(300)	300	(841)
StyI	C [^] CWWGG	2	(108)	108	(579) 687 (454)

Nichtschneidende Enzyme:

AatII, AccIII, Acc65I, AcyI, AflIII, AflIII, AgeI, Alw21I, Alw26I, Alw44I, AlwNI, Aor51HI, ApaI, ApaLI, AscI, AseI, AsnI, AspI, Asp700I, Asp718I, AspEI, AspHI, AsuII, AvaI, AviII, AxyI, BalI, BamHI, BanII, BanIII, BbeI, BbiII, BbrPI, BbsI, BbuI, BbvI, BcgI, BcoI, BfrI, BglI, BglIII, BpmI, Bpu1102I, BpuAI, BsaI, BsaAI, BsaHI, BsaMI, BsaOI, BsaWI, BscI, Bsc91I, BscCI, BseAI, BseNI, BsgI, Bsh1285I, BsiCI, BsiEI, BsiHKAI, BsiMI, BsiWI, BsiXI, BsmI, BsmAI, BsmFI, Bsp13I, Bsp68I, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp143II, Bsp1407I, BspCI, BspDI, BspEI, BspMII, BspM90I, BspXI, BsrI, BsrBI, BsrDI, BsrGI, BssHII, BstI, Bst71I, Bst1107I, BstBI, BstEII, BstPI, BstUI, BstXI, BstYI, BstZI, Bsu15I, Bsu23I, Bsu36I, CcrI, CelII, Cfr9I, Cfr42I, ClaI, CpoI, CspI, Csp45I, CvnI, DraI, DraII, DraIII, DrdI, DsaI, EagI, Eam1104I, Eam1105I, EarI, Ecl136II, EclXI, Eco24I, Eco31I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco57I, Eco72I, Eco81I, Eco88I, Eco91I, Eco105I, EcoICRI, EcoNI, Eco065I, Eco0109I, EcoRI, EcoRV, EheI, EspI, Esp3I, FdiII, FokI, FspI, GsuI, HaeII, HgiAI, HinII, HindIII, HpaI, HphI, KasI, KpnI, Kpn2I, KspI, Ksp632I, LspI, MboII, McrI, MflI, MluI, MroI, MscI, MspAI, MstI, MstII, MunI, Mva1269I, NaeI, NarI, NciI, NcoI, NdeI, NgoMI, NheI, NotI, NruI, NspIII, NspV, NspBII, PacI, PaeI, Paer7I, Pfl123II, PflMI, PinAI, PleI, PmaCI, PmeI, PmlI, PpuMI, PshAI, Psp5II, Psp1406I, PspAI, PstI, PvuI, PvuII, RsrII, SacI, SacII, SalI, SapI, SauI, SexAI, SfiI, SfuI, SgrAI, SmaI, SnaBI, SnoI, SphI, SplI, SpoI, SrfI, Sse8387I, SstI, SstII, SunI, SwaI, Tth111I, Van91I, VspI, XbaI, XcmI, XhoI, XhoII, XmaI, XmaIII, XmnI, XorII.

Tab. 6 zeigt Restriktionsorte in der Cytochrom *b* Sequenz, die exklusive entweder in Tieren aus Shimba Hills NR oder Tansania vorkommen. Solche Restriktionsorte wären besonders geeignet um Linien, die ursprünglich aus Kenia stammen in der Rappenantilopen-Population, insbesondere in Nordwest-Tansania nachzuweisen.

Tab. 6 Diagnostische, d.h. unterschiedliche Restriktionsorte in der kompletten Nukleotid-sequenz des Cytochrom *b* Gens der untersuchten Rappenantilopen.

	Eae I	Aat II	Acy I	Bbi II	Hin1 I
SA1	–	+	+	+	+
SA2	–	+	+	+	+
SA3	+	–	–	–	–
SA4	+	–	–	–	–
SA5	+	–	–	–	–
SA6	+	–	–	–	–

Andere Restriktionsenzyme finden Schnittorte an verschiedenen Positionen und liefern unterschiedliche Fragmentmuster (Abb. 12). Mit diesem Ansatz kann das Risiko einer unvollständigen Restriktion erkannt bzw. vermieden werden.

Abb. 12 Restriktionsenzym-Analyse von PCR-amplifizierten Fragmenten des Cytochrom *b* Gens zur Identifizierung populations-spezifischer Polymorphismen. Bahn 1 und 5: Molekulargewichtsmarker (100 bp ladder); Bahn 2 und 3: Restriktionsenzym MseI, mit einem 390 bp Fragment spezifisch für die Shimba Hills NR Population (Bahn 2) und einem 516 bp Fragment spezifisch für Tiere aus Tansania (Bahn 3). Bahn 6 und 7: Restriktionsenzym Sca I, mit einem 290 bp Fragment spezifisch für Tiere aus Tansania (Bahn 7) und den Verlust dieser Bande spezifisch für die Shimba Hills NR Population (Bahn 6). Bahn 4 und 8: ungeschnittenes 1236 bp Fragment.

8. Taxonomische Konsequenzen

Die vorliegenden genetischen Daten erlauben keine gesicherten Rückschlüsse auf die umstrittene Unterartenklassifikation von *Hippotragus niger*, da bisher kein Vergleichs-material von den anerkannten Unterarten *kirkii*, *anselli* und *niger* zur Verfügung stand. Eine hypothetische Unterteilung der Stichprobe in zwei Unterarten, z.B. *roosevelti* (Shimba Hills NR) und *kirkii* (Ost-Tansania), wäre zwar aufgrund der beobachteten Sequenzdivergenz und phylogenetischen Analyse möglich, wird aber durch das Ergebnis der AMOVA-Analyse (Tab. 3) nicht unterstützt. Es ist daher aus populationsgenetischer Sicht nicht zweifelsfrei zu begründen, daß die Herde in Shimba Hills NR/Kenia eine genetisch ausreichend abgrenzbare Subspezies darstellt. Wahrscheinlicher sind die

Tiere aus Shimba Hills NR die nördlichsten (4°Süd) Mitglieder der geographisch strukturierten Unterart *roosevelti*, die mindestens bis in das Gebiet des Selous GR verbreitet ist. Diese Schlußfolgerung wird durch Untersuchungen von Groves 1983 unterstützt, der Belegexemplare aus der Region Selous GR mit Hilfe craniometrische Messungen klar als Angehörige von *H. n. roosevelti* identifiziert hat. Roosevelt & Heller 1922 geben den Kigani-Fluß als südliche Verbreitungsgrenze von *roosevelti* an, während Swynnerton & Haymann 1951 die Subspezies auf Tansania beschränken (Meester & Setzer 1971-1975). Durch Einbeziehung von Populationen, die sich in westlicher und südlicher Nachbarschaft des Stichprobengebietes befinden, sollten sich die heutigen Verbreitungsgrenzen von *roosevelti* zu *kirkii* bzw. *anselli* mit Hilfe der DNA-Sequenzierung eindeutig klären lassen. Der Sequenzvergleich zwischen einem 486 bp Abschnitt des Cytochrom *b* Gens einer Rappenantilope aus Malawi (Robinson & Bastos 1996) und unserem Datensatz ergibt einen Unterschied von 2,3% und ist fast viermal größer, als die Sequenzdifferenz zwischen den Tieren aus Shimba Hills NR/Kenia und Ost-Tansania mit $0,78 \pm 0,11\%$ in diesem DNA-Abschnitt. Geographische und genetische Distanz machen es sehr wahrscheinlich, daß das Tier aus Malawi eine eigene Unterart repräsentiert. Interessant sind in diesem Zusammenhang die morphometrischen Befunde von Groves 1983, der in Malawi zwei unterscheidbare Unterarten *kirkii* und *anselli* identifizierte. Museums-Exemplare, die im Südosten Tansanias zwischen Rufiji und Ruvuma gesammelt wurden, repräsentieren nach seiner Ansicht eine Überlappungszone zwischen den nördlich bzw. süd-östlich davon verbreiteten *roosevelti* bzw. *anselli*. Exemplare aus Chera (8° 42'S - 36°50'O) und Nenura (8°30'S - 37°10'O) sind bereits eindeutig Vertreter von *roosevelti*, während Exemplare aus Lakua (13°10'S - 39°11'O) in Mosambik, nördlich des Sambesi der Nominat-Unterart *niger* zuzurechnen sind. Diese in Abb. 13 dargestellte Hypothese machen die abgebildete Region besonders interessant für genetische Untersuchungen der Divergenz und geographischen Abgrenzungen von 3 benannten Unterarten (*roosevelti*, *anselli* und *niger*). Vertreter der Unterart *kirkii* könnten im westlichen Tansania vorkommen.

Abb. 13 Kartierung der Fundorte morphometrisch identifizierter Unterarten der Rappenantilope in Ost-Afrika nach Groves 1983. 1. *anselli*, 2. *roosevelti*, 3. *niger*, 4. Hybridform zwischen *anselli* und *roosevelti*.

Zusammenfassung

1. Die Nukleotidsequenzen des mitochondrialen Cytochrom *b* Gens und der Kontrollregion (D-loop) von 6 Rappenantilopen (*Hippotragus niger sp.*) aus Ostafrika wurden bestimmt. Auf der Grundlage dieser Sequenzinformation wurde die genetische Populationsstruktur analysiert.
2. Die ostafrikanische Population der Rappenantilope ist in Nord-Süd-Richtung entlang des 38. Laengengrades genetisch hoch strukturiert ($\Phi_{ST} = 0,941$ $p < 0,05$).
3. Es werden erste Hinweise auf eine historische Trennung der Population in drei genetisch unterscheidbare Subpopulationen ($\Phi_{CT} = 0,937$, $p < 0,0010$) gegeben. Die Linie Usambara-Gebirge/Pangani-Fluß im Norden und der Rufiji-Fluß im Süden Tansanias wirken vermutlich als geographische Barrieren in der genetischen Differenzierung.
4. Die Schutzgebiete Shimba Hills NR, Sadani GR und Selous GR enthalten Vertreter der entsprechenden Subpopulationen. Die mittlere genetische Distanz innerhalb der Strichprobe beträgt $1,22 \pm 0,82\%$. Die maximale genetische Distanz besteht mit $2,33\%$ zwischen Tieren aus dem Shimba Hills NR und dem Selous GR, südl.Rufiji. Die Tiere aus der Region nördl. Rufiji (einschl. Sadani GR) nehmen eine verwandtschaftliche Mittelstellung zwischen dem Tier südl. Rufiji ($d = 1,26 \pm 0,07\%$) und den Tieren aus dem Shimba Hills NR ($d = 1,88 \pm 0,05\%$) ein.
5. Das Tier aus Sadani GR ist aufgrund der Sequenzdifferenzen mit den benachbarten Tieren nördlich des Rufiji am nächsten verwandt ($d = 0,95\%$), während es von den Tieren aus Shimba Hills NR $1,9\%$ und dem Tier südlich des Rufiji $1,3\%$ entfernt ist.
6. Die genetische Analyse und morphometrische Untersuchungen von Groves 1983 unterstützen die Annahme, daß die Rappenantilopen von Shimba Hills NR/Kenia bis zum Selous GR/Tansania der Unterart *H. n. roosevelti* zuzuordnen sind.
7. Die Gendiversität der ostafrikanischen *roosevelti* scheint auf wenige, geographisch getrennte Subpopulationen mit kritischen Bestandsgrößen verteilt zu sein. Übernutzung lokaler Bestände muß daher zwangsläufig zum Verlust der genetischen Vielfalt dieser Spezies führen.

New results of studies of additional samples:

We previously expected the existence of two different subspecies of *Hippotragus niger* in East Africa: *roosevelti* in the coastal region of Kenya and East Tanzania and *kirkii* in the western and central part of Tanzania. A more extensive study with enlarged sample sizes and a greater number of sampled locales has confirmed this subdivided population-genetic structure, which is concordant with previous subspecies designations based on nonmolecular data (Groves 1983). The phylogeographic structure and the genealogical relationship of nine mtDNA haplootypes detected in this study can be represented simultaneously on a minimum spanning tree (fig.1). The most remarkable feature of the distribution and topology of mitochondrial diversity in sable antelopes is the division of the mtDNA genealogy into two distinct clades, which have diverged from each other by 13.3% and 4.6% , in the control region and *cyt b* gene, respectively. The eastern 'clade' is composed of the haplotypes (G – 1) of three individuals from western and central Tanzania. The depth of divergence is suggestive of a long-term matrilineal history of genetic isolation and supports the conclusion that both clades should be regarded as separate subspecies.

Legend to Fig. 1

Minimum spanning network constructed from nine *H. niger* mtDNA Haplotypes detected in this study. The letters within each circle indicate the haplotype designations. Numbers along connecting branches indicate the number of mutational steps between haplotypes. The open circles indicate the western/central Tanzania clade of haplotypes (G, Kigosi; H, Ugalla; I, Kizigo) and the shaded circles indicate the clade of haplotypes from Kenia (A, Shimba Hills) and East Tanzania (B, Saadani; C, D, E, F, Selous).

Literatur

- Baldus, R.D. (1993): Report to Antelope Specialist Group (IUCN/SSC) on antelopes in the Selous Game Reserve. Selous Conservation Programme, Dar es Salaam.
- Baldus, R.D., Estes, R.D., Foley, C., Mduma, S. Moyer, D., Siegel, L., Grimshaw, J.M. & Newmark, W. (1997): Antelope Survey Update No. 4., pp. 15-52. IUCN/SSC Antelope Specialist Group Report, compiled by Rod East.
- Estes, R.D. & Estes, R.K. (1974): The biology and conservation of the giant sable antelope (*Hippotragus niger varians* Thomas 1916). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 126, 73-104.
- Excoffier, L., P. E. Smouse & Quattro, J.M. (1992): Analysis of molecular variance inferred from metric distances among haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131, 479-491.
- Felsenstein; J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39, 483-791.
- Felsenstein, J. (1993): PHYLIP-(Phylogeny Inference Package) 3.5c. Distributed by the author. University of Washington, Seattle.
- Fox, G.R. 1991. A Case for Conservation - Mkwaja Ranch. Presentation to the Wildlife Division Annual Meeting. Tanga 1991. Mimeo
- Groves, C.P. (1983): A new subspecies of sable antelope, *Hippotragus niger* (Harris 1838). Rev. Zool. afr. 97 (4) 821-828.
- Higgins, D.D. & Sharp, P.M.(1989): Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. CABIOS 5, 151-153.
- Hofmann,R.R., Pitra, C. und Lieckfeldt D. 1998. Phylogeographische Differenzierung von Subpopulationen der Rappenantilope (*Hippotragus niger* sp.) in Ostafrika. Bericht fuer die Deutsche Gesellschaft fuer Technische Zusammenarbeit. Projekt-Nr. 96.2134.3-001.00. Mimeo.
- Hobbs, N.T. (1996): Modification of ecosystems by ungulates. J. Wildl. Manage. 60, 695-713.
- Hudson, Slatkin & Maddison (1992): Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. Genetics 132, 583-589.
- Irwin, D.M., Kocher,T.D. & Wilson, A.C. (1991): Evolution of the cytochrome b gene of mammals. J. Mol. Evol. 32, 128-144.
- ISIS (International Species Information System) (1993): SPARKS (Single Population Animal Record Keeping System). Apple Valley, Minnesota.
- IUCN/SSC Antelope Specialist Group Report. 1997. Contributions by Baldus, R.D., Estes, R.D., Foley, C., Mduma,S., Moyer,D., Siegel,L., Grimshaw,J.M. & Newmark, W. Compiled by East, R. Antelope Survey Update No. 4., pp.15-52.
- Kingdon, J.S. (1982): East African mammals, vol 3C (Bovids). New York: Academic Press.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (1993): MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, version 1.01. Inst. Mol. Evol. Genet. Penn. State Univ., Univ.Park, Penn.
- Li, W. H., Tanimura, M., & Sharp, P.M. (1987): An evaluation of the molecular clock hypothesis using mammalian DNA sequences. J. Mol. Evol. 25,330-342.
- Mace, G. & Stuart, S. (1994): Draft IUCN red list categories, version 2.2. Species 21-22, 13-24.
- Meester, J. & Setzer, H.W. (1971-75): The Mammals of Africa. An Identification Manual. Smithsonian Inst. Press. Washington D.C.
- O'Brien, S.J., (1994): Genetic and phylogenetic analyses of endangered species. Annu. Rev. Genet. 28, 467-489.
- Page, R.D.M. (1996): Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput. Appl. Biosci. 12, 357-358.

Roosevelt, T. and Heller, E. 1922. Life Histories of African Game Animals 2E Vol. 2, 333. London, John Murrey.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl. Acad. Sci. USA 74, 5436-5467.

Siege, L. and Baldus, R.D. 1997. Proposal to Determine the Status of Sable Antelopes in the Saadani Ecosystem. Dar Es Salaam. Mimeo.

Strimmer, K. & von Haeseler, A. (1996): Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. Mol. Biol. Evol. 13, 964-969.

Tajima, F. (1989): Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123, 585-595.

Tanzania Wildlife Conservation Monitoring, Wildlife Census Sadani 1991 and 1992, Arusha 1993.

Tanzania Wildlife Conservation Monitoring, Wildlife Census Sadani 1998, forthcoming.

Tanzania Wildlife Conservation Monitoring, Wildlife Census Selous 1998, forthcoming.

Wilson, D.E. & Hirst, S.M. (1977): Ecology and factors limiting roan and sable antelope populations in South Africa. Wildl. Mono. 54, 1-111

Wilson, A.C., Ochmann, H. & Prager, E.M. (1987): Molecular time scale for evolution. Trends Genet. 3, 241-247.

Zhang, D.-X & Hewitt, G.M. (1996): Nuclear integrations: Challenges for mitochondrial DNA markers. TREE 11: 247-251.

Discussion Papers presently available at SCP:

No. 15 Checklist of the birds of the Selous Game Reserve

No. 16 People and wildlife, experiences from Tanzania

No. 17 Bibliography of the Selous Game Reserve

No. 18 A list of vernacular names of wild animals of Selous Game Reserve and the surrounding bufferzones: Kingindo, Kimatumbi and Kipogoro

No. 19 The elephants of the Selous Game Reserve and their management

No 23: Conservation attitudes of villagers living next to the Selous Game Reserve

No. 24: Assessment of crop damage and application of non-lethal deterrents for crop protection east of the Selous Game Reserve