

Conservation Genetics

Erstgutachter: Dr. Anne Schrimpf

Zweitgutachter: Dr. Kathrin Theissing-Theobald

**Genetische Überprüfung der Artzugehörigkeit von Zoo-
und privaten Zuchttieren der Pfeilgiftfroscharten
Epipedobates anthonyi und *tricolor***

Bachelorarbeit



Student	Philipp Bodenseh
Matrikelnummer	210 201 237
E-Mail-Adresse	bode4984@uni-landau.de
Adresse	Bergbornstraße 68, 76833 Frankweiler
Studiengang	Umweltwissenschaften (B. Sc.)

Zusammenfassung

Diese Bachelorarbeit befasst sich mit der genetischen Überprüfung der Artzugehörigkeit von Zoo- und privaten Zuchttieren der Pfeilgiftfroscharten *Epipedobates tricolor* und *Epipedobates anthonyi*. Die beiden unterschiedlich stark gefährdeten Pfeilgiftfroscharten weisen eine hohe morphologische Variabilität auf, bilden ähnliche Merkmale aus und lassen sich daher schwer voneinander trennen beziehungsweise unterscheiden. Aufgrund dieses Umstandes kam es 1976 durch Silverstone zu einer Verwechslung von *E. anthonyi* mit *E. tricolor*. Da viele nachfolgende Forschungsarbeiten auf die Ergebnisse von Silverstone zurückgriffen, hatte dies weitreichende Konsequenzen für die Artbestimmung der beiden Pfeilgiftfrösche. Erst 2004 wurde dieser Fehler durch genetische Untersuchungen bestätigt und die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass alle Tiere, die nach 1976 als *E. tricolor* identifiziert und gehalten wurden eigentlich zur Art *E. anthonyi* gehören.

In dieser Untersuchung wurden 95 individuelle Hautabstrichproben von als *E. tricolor* und *E. anthonyi* gehaltenen Tieren von 22 verschiedenen Zoos und Züchtern aus sieben Ländern (Belgien, Deutschland, Großbritannien, Lettland, Niederlande, Österreich und Polen) untersucht. Dabei wurde die extrahierte mitochondriale (mt) DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion vermehrt. Mit Hilfe vier verschiedener Primerpaare erfolgte dabei die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten der Gene 12s und 16s rRNA. Insgesamt lieferten die vervielfältigten DNA-Segmente ca. 2.600 Basenpaare mit genetischen Informationen. Die Sequenzergebnisse wurden mit Referenzsequenzen, der als sicher zugeordnet geltenden Individuen, der Arten *E. tricolor* und *E. anthonyi* verglichen, um eine eindeutige Artzuordnung der Proben zu erhalten.

Die Annahme, dass es sich bei den meisten Tieren tatsächlich um *E. anthonyi* handelt konnte bestätigt werden. Von 44 erfolgreich untersuchten Proben wurde die mitochondriale DNA in 42 Fällen *E. anthonyi* und nur in 2 Fällen *E. tricolor* zugeordnet. Auffällig dabei ist, dass sich beide *E. tricolor* Exemplare in Hand privater Züchter befinden. Des Weiteren handelt es sich bei diesen beiden Tieren um Morphe mit unterschiedlichem Phänotyp. Die restlichen 51 Proben lieferten keine Ergebnisse oder waren mit Fremd-DNA kontaminiert.

Im Sinne des Artsschutzes, der genetischen Biodiversitätserhaltung, sowie der Aufklärung über die Artzugehörigkeit und Taxonomie von Zuchtgruppen sind weitere genetische Untersuchungen der beiden Pfeilgiftfroscharten bei weiteren zoologischen Einrichtungen und Züchtern nötig. Zur Etablierung eines Arterhaltungsprogrammes in menschlicher Obhut für den seltener und stärker gefährdeten *E. tricolor* sind weitere Untersuchungen der beiden gefundenen *E. tricolor* Exemplare durchzuführen und noch mehr Tiere zu identifizieren.

Abstract

This bachelor thesis examines the genetic analysis of the species affiliation of captive-bred Poison Dart Frogs (*Epipedobates tricolor* and *Epipedobates anthonyi*). Both of these differently threatened species have a high morphological variability and yet share some of the same visible characteristics. Thus, they are often hard to distinguish and identify correctly, which has led to the misidentification of an *E. anthonyi* population as an *E. tricolor* population by Silverstone in 1976. Much of the subsequent research on these species was based on Silverstone's work, which resulted in large-scale consequences for the species affiliation of both poison dart frog species. Silverstone's error was discovered through genetic studies in 2004. Therefore it is possible that from 1976 to 2004 frogs previously identified as *E. tricolor* were actually *E. anthonyi*.

This study analyzed 95 individual skin swab-samples of *E. tricolor* and *E. anthonyi* from 22 different private breeders and zoos from seven countries (Austria, Belgium, Germany, Great Britain, Latvia, Netherland and Poland). The extracted mitochondrial DNA was multiplied at fragments of the genes 12s and 16s rRNA by polymerase chain reaction using four different primer pairs. In total, approximately 2.600 base pairs of genetic information were maintained. The sequencing results were compared with trusted reference sequences of *E. anthonyi* and *E. tricolor*.

The assumption that most of the sampled frogs are *E. anthonyi* could be proved. Forty-two (42) of the 44 successfully analyzed samples were *E. anthonyi* and only two could be determined to be *E. tricolor*. Both of these *E. tricolor* specimens are from different phenotypes that are being held as different morphs by private breeders. The remaining 51 samples did not provide any results or were contaminated with foreign DNA.

To ensure species conservation, foster genetic biodiversity and establish appropriate breeding groups more genetic studies are required, in cooperation with an even wider range of zoos and breeders. To establish a viable species conservation program in human care of the rare and more threatened *E. tricolor* frogs more species samples must be identified and more genetic studies are required.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Einstieg in das Thema Pfeilgiftfrösche	7
1.2 Artbeschreibung <i>E. anthonyi</i>	9
1.3 Artbeschreibung <i>E. tricolor</i>	10
1.4 Erhaltung der biologischen Vielfalt.....	12
1.5 Ziel der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Pilotstudie	15
2.1.1. DNA Extraktion aus Hautabstrichproben.....	16
2.1.2. DNA Extraktion aus Gewebeproben	17
2.2. Hauptstudie.....	18
2.2.1. Kooperationspartner	18
2.2.2. Verwendete Primer	20
2.3. Genetische Auswertung	21
2.4. Morphologischer Vergleich	22
3. Ergebnisse	23
4. Diskussion	29
5. Fazit	33
6. Literaturverzeichnis	34
Eidesstattliche Erklärung	38
Danksagung	38
Anhang 1	39
Anhang 2	42
Anhang 3	48
Anhang 4	48
Anhang 5	49

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verbreitungsgebiete der Pfeilgiftfroscharten laut IUCN und Fundorte der Referenzsequenzen	9
Abbildung 2: <i>E. anthonyi</i> Morph 1.....	10
Abbildung 3: <i>E. anthonyi</i> Morph 2.....	10
Abbildung 4: <i>E. tricolor</i> Morph 1.....	11
Abbildung 5: <i>E. tricolor</i> Morph 2.....	11
Abbildung 6: Verwandtschaftsverhältnisse in der <i>Epipedobates</i> -Clade.....	13
Abbildung 7: Lage der DNA-Sequenzen.....	21
Abbildung 8: Median Joining Netzwerk mit DNA-Sequenzen (Primerpaar 2).....	24
Abbildung 9: Median Joining Netzwerk mit DNA-Sequenzen (Primerpaar 3).....	25
Abbildung 10: Median Joining Netzwerk mit DNA-Sequenzen (Primerpaar 2 und 3).....	26
Abbildung 11: Median Joining Netzwerk mit DNA-Sequenzen (Primerpaar 1).....	27
Abbildung 12: <i>E. anthonyi</i> Morph Nr. 1 (Probentier SWT01, dorsale Ansicht).....	48
Abbildung 13: <i>E. anthonyi</i> Morph Nr. 1 (Probentier SWT01, ventrale Ansicht).....	48
Abbildung 14: <i>E. anthonyi</i> Morph Nr. 2 (Probentier SWT02, dorsale Ansicht).....	48
Abbildung 15: <i>E. anthonyi</i> Morph Nr. 2 (Probentier SWT02, ventrale Ansicht).....	48
Abbildung 16: <i>E. anthonyi</i> Morph Nr. 3 (Probentier SWT04, dorsale Ansicht).....	49
Abbildung 17: <i>E. anthonyi</i> Morph Nr. 3 (Probentier SWT04, ventrale Ansicht).....	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kooperationspartner und Proben in der Pilotstudie.	15
Tabelle 2: Bestandteile 25 µl PCR-Ansatz	18
Tabelle 3: PCR-Programm der Pilotstudie	18
Tabelle 4: Gesamtprobenübersicht der Hauptstudie.	19
Tabelle 5: Verwendete Primer.	20
Tabelle 6: PCR-Programm der Hauptstudie.....	21
Tabelle 7: Ergebnistabelle der Artbestimmung.....	42

Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung
BMU:	Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit
bp:	Basenpaare
bspw.:	beispielsweise
bzw.:	beziehungsweise
<i>C. machalilla:</i>	<i>Colostethus machalilla</i>
CBD:	Convention on Biological Diversity
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. anthonyi:</i>	<i>Epipedobates anthonyi</i>
<i>E. machalilla:</i>	<i>Epipedobates machalilla</i>
<i>E. spec.:</i>	<i>Epipedobates species</i>
<i>E. tricolor:</i>	<i>Epipedobates tricolor</i>
Gew.:	Gewebe
<i>H. sapiens:</i>	<i>Homo sapiens</i>
IUCN:	International Union for Conservation of Nature and Natural Resources
mtDNA:	mitochondriale DNA
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
NN:	Normalnull
PBS:	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
per. Komm.:	persönlicher Kommentar
Tab.:	Tabelle
vgl.:	vergleiche

1. Einleitung

1.1. Einstieg in das Thema Pfeilgiftfrösche

Pfeilgiftfrösche, im wissenschaftlichen Dendrobatidae genannt, sind eine arten- und formenreiche Tiergruppe. Im Laufe der Jahrzehnte wechselte die Systematik der Pfeilgiftfrösche durch neue Erkenntnisse und Untersuchungen mehrmals. Während Glaw et al. (1998) die Gruppe der Pfeilgiftfrösche, noch in 186 Arten und in zehn Gattungen beschrieben, erstellten Grant et al. (2006) eine völlig neu aufgebaute Systematik. Dieser heute als am wahrscheinlichsten geltender Stammbaum, teilt die Überfamilie Dendrobatoidea in zwei große Familien, zu der auch die Dendrobatidae zählen, auf. Die zwei Familien spalten sich wiederum in drei Unterfamilien mit insgesamt 16 Gattungen und 247 bekannten Arten (Grant et al. 2006) auf. Die Systematik der Gruppe der Pfeilgiftfrösche befindet sich im ständigen Wandel und es existiert bisher keine universell vollständig akzeptierte Aufteilung. Gerade durch ihre hohe morphologische Variabilität sind die einzelnen Arten schwer eindeutig voneinander zu trennen und zu bestimmen. In diesem Zusammenhang möchte ich auf die Bachelorarbeit von Jan-Christopher Fischer „Die abgrenzungsorientierte Beschreibung der Baumsteigerfrösche *E. anthonyi* und *E. tricolor* vor dem Hintergrund der genetischen Artzuordnung“ (verfasst an der Universität Koblenz-Landau, 2015) verweisen, in der das Thema detailliert behandelt wird.

Anhand der Pfeilgiftfroscharten *E. anthonyi* und *E. tricolor* lässt sich das Ausmaß des Problems der morphologischen Vielfalt dieser Tiergruppe erkennen. Bereits 1899 wurde die Art *E. tricolor* als *Prostherapis tricolor* erstmals durch Boulenger beschrieben (Boulenger, 1899). Im Jahr 1921 erfolgte erstmals die Beschreibung von *E. anthonyi* durch Noble als *Phyllobates anthonyi* (Noble 1921). Immer wieder wurden die beiden Arten durch neue Forschungsergebnisse zu anderen Gattungen der Familie der Dendrobatidae gezählt (vgl. American Museum of Natural History 2014, Fischer 2015) und auch die Familienaufteilung der Dendrobatidae änderte sich fortlaufend (Myers 1987, Vences et al. 2000, Lötters et al. 2007, Grant et al. 2006).

Des Weiteren kam es im Jahr 1976 durch Silverstone (Silverstone 1976) zu einer folgenschweren Fehlbestimmung einer *E. anthonyi* Population (Graham et al. 2004, Lötters et al. 2007). Aufgrund der ähnlichen ventralen und dorsalen Zeichenmuster wurde diese *E. anthonyi* Population als zu *E. tricolor* gehörig interpretiert. Dieser Fehler hatte weitreichende Konsequenzen, da viele nachfolgende Publikationen auf die Ergebnisse, Daten und Beschreibungen von Silverstone zurückgriffen und aufbauten. Als Beispiel kann man Duellman und Wild (1993) nennen, welche annahmen, dass *E. anthonyi* ein Synonym für *E.*

tricolor darstellt, jedoch handelt es sich um zwei getrennte Arten (Verkade and Verkade 2011). Schulte (1999b) verwendet in seinem Buch ebenfalls die falschen Informationen zur Beschreibung und Unterscheidung von *E. tricolor* und *E. anthonyi*, basierend auf Silverstones Ergebnissen von 1976 (Lötters et al. 2007). Jedoch identifizierte er zusätzlich noch andere morphologische Unterscheidungsmerkmale zwischen den beiden Arten. Clough und Summers (2000) erachteten *E. tricolor* und *E. anthonyi* als zwei getrennte Arten und fanden zudem erst wenige genetische Unterschiede zwischen diesen. Erst 2004 wurde der weitläufige „Fehler“ Silverstone's (1976) von Graham et al. (2004) durch weitere, detailliertere genetische Analysen der beiden Arten vollkommen erkannt, diese geographisch voneinander getrennt beschrieben und ein neues Verwandtschaftsverhältnis der beiden Arten innerhalb der gesamten Pfeilgiftfroschgruppe „erstellt“. Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse wird von Graham et al. (2004) geraten, alle Tiere die nach der Fehlbestimmung untersucht und die Art bestimmt wurde als *E. anthonyi* zu erachten. Dieses Problem der unklaren Artzuordnung der Tiere betrifft nicht nur die wissenschaftliche Welt, sondern auch die Terraristik und zoologische Einrichtungen. Oftmals ist den Haltern der Tiere das Problem der Artverwechslung nicht bewusst und sie besitzen auch nicht die Möglichkeiten einer Überprüfung. Manche Einrichtungen und Züchter sind sich der Artzuordnungsproblematik zwar bewusst, führen aber den Namen *E. tricolor* weiter.

Viele der Pfeilgiftfrösche besitzen eine aposematische Färbung (Warnfärbung für Fressfeinde, die Ungenießbarkeit und Gefährlichkeit symbolisiert, Santos et al. 2003) und scheiden durch ihre Hautdrüsen Gifte/Alkaloide zum Schutz vor Fressfeinden aus. Essentiell ist hierfür die Aufnahme bestimmter Beutetiere, bspw. Ameisen und Milben (Santos et al. 2003, Lötters et al. 2007). Gerade für die medizinische Forschung stellen die in der Natur vorkommenden Giftstoffe die Grundlagen für neue, effiziente und risikoarme Medikamente, insbesondere Schmerzmittel dar. Ein aktuelles Beispiel ist das Hautdrüsensekret Epibatidin des Pfeilgiftfrosches *E. anthonyi*, welches eine 260fach größere angetische Wirkung hat als Morphin (Daly et al. 1980b; Spande et al. 1992). Auch in Bezug auf das Hautdrüsensekret führte das Problem der schwierigen Unterscheidung von *E. tricolor* und *E. anthonyi* zu einer Verwechslung der beiden Arten. In der Veröffentlichung von Daly et al. (1980b), die sich auch auf Silverstone (1976) bezogen, wurde beschrieben, dass das Alkaloid Epibatidin bei *E. tricolor* entdeckt wurde, jedoch handelte es sich bei der Art in Wahrheit um *E. anthonyi* (Lötters et al. 2007).

1.2. Artbeschreibung *E. anthonyi*

Das ca. 20.000 km² große Verbreitungsgebiet (gelbes Gebiet in Abb. 1) von *E. anthonyi* liegt westlich der Anden im Südwesten Ecuadors in den Provinzen El Oro, Azuay und Loja, sowie auch im angrenzenden Nordwesten Perus in den Regionen Ancash, Piura und Tumbes (Luis et al. 2010). Beide Arten kommen endemisch nur in Ecuador vor und ihre Verbreitungsgebiete liegen ca. 200 km voneinander entfernt (Abb. 1), isoliert durch ein Gebirge (Graham et al. 2004).

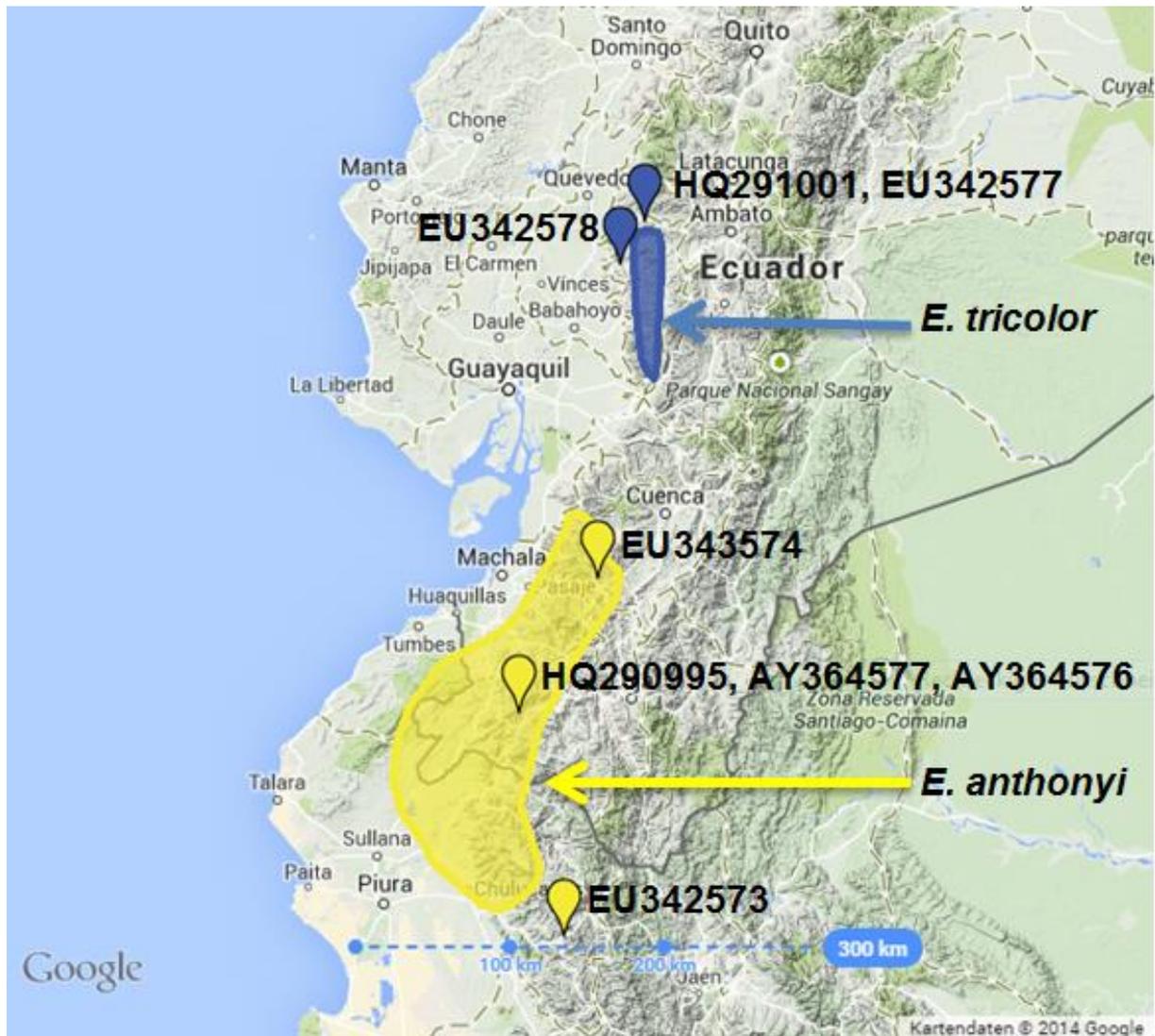


Abbildung 1: Verbreitungsgebiete der Pfeilgiftfroscharten laut IUCN und Fundorte der Referenzsequenzen (Blau: *E. tricolor*, gelb: *E. anthonyi*). Mehr Informationen zu den Referenzsequenzen finden sich in Fischer (2015). Kartengrundlage: © Google 2014, Verbreitungsgebietsdaten: © IUCN 2014, Bildbearbeitung: Philipp Bodenseh

Die unterschiedlichen Habitate der Tiere reichen von äquatorialen Trockenwäldern, feuchtheißen, mit hoher Vegetation bewachsenen Waldrandgebieten über Zuckerrohrfelder bis hin zu alten Kakaopflanzungen (Schmidt und Henkel 1995, Lötters et al. 2007). Die Tiere halten sich vor allem in der Nähe von Wasserläufen am Gebirgsrand der Anden in einer Höhe von 20 bis 1800 m NN auf (Lötters et al. 2007).

Je nach Alter und Geschlecht weist *E. anthonyi* eine Kopf-Rumpf-Länge von 17 bis 27 mm auf, wobei die Männchen etwas schlanker als die Weibchen sind. Das morphologische Erscheinungsbild der Tiere variiert nicht nur zwischen einzelnen Populationen, sondern auch innerhalb dieser selbst. Die Grundfärbung der Frösche reicht von dunkelbraun über rotbraun bis hin zu hellweißlich braun. Auch die Farbe der verschiedenen dorsalen und ventralen Mustervarianten erstrecken sich von cremeweiß, gelb, gelbgrün, weißlich blau bis hellblau. Ausgehend von den Augen und/oder der Schnauzenspitze können die Tiere Streifen mit unterschiedlicher Breite aufweisen, die sich am hinteren Teil des Frosches in Striche oder Flecken umwandeln. Ebenso wie die Rückenfärbung, ist auch die Bauchfärbung in Farbe und Muster sehr unterschiedlich. Die Formenvielfalt reicht dabei von einer kompletten Bedeckung mit hellen Flecken bis hin zum vollständigen Fehlen dieser (Lötters et al. 2007).



Abbildung 2: *E. anthonyi* Morph 1. Diese Farbvariante von *E. anthonyi* stammt aus dem Bestand einer Züchterin aus Malsch. Bild: © Philipp Bodenseh



Abbildung 3: *E. anthonyi* Morph 2. Diese Farbvariante von *E. anthonyi* stammt aus dem Bestand des Landauer Zoos. Bild: © Philipp Bodenseh

1.3. Artbeschreibung *E. tricolor*

Die Art *E. tricolor* besitzt nur ein 5.000 km² großes Verbreitungsgebiet (blaues Gebiet in Abb. 1) und kommt in den westlichen Andensteigungen der Provinzen Bolíva und Cotopaxi vor (Luis et al. 2010). Die Froschart besiedelt vermutlich noch einige andere angrenzende Gebiete, jedoch ist dies nicht eindeutig belegt. Der Lebensraum der Tiere liegt in einer Höhe von 600 bis 1800 m und das sonnenreiche Habitat ist geprägt von einer relativ trocknen, savannenartigen Fauna (Lötters et al. 2007). Die Froschart hält sich daher an feuchten,

lichtgeschützten Stellen mit Ufervegetation entlang einiger Flussläufe auf (Schmidt und Henkel 1995, Lötters et al. 2007).



Abbildung 4: *E. tricolor* Morph 1 (links dorsal, rechts ventral). Diese Farbvariante von *E. tricolor* stammt aus dem Bestand eines Züchters aus Leverkusen (Probentier E.t.N). Bild: © Tim Schikora

Die Kopf-Rumpf-Länge der Frösche reicht von 19 bis 23 mm, wobei die Weibchen einen breiteren Körperbau als die Männchen besitzen. Ebenso wie bei *E. anthonyi* weist *E. tricolor* ähnliche Erscheinungsformen mit einer ebenso großen Muster- und Farbvariabilität (vgl. Abb. 4 und 5) auf. Die Grundfarbe der Frösche ist dunkelbraun mit hellgelben Streifen. Am Rücken der Tiere finden sich verschiedene Streifen, ausgehend von den Augen und der Schnauze. Diese gehen in Striche oder Fleckmuster über. Die Bauchseite weist eine helle Färbung mit oder ohne Flecken in unterschiedlichen starken Ausprägungen auf. Eine Besonderheit sind die orangeroten bis roten Flecken auf den Unter- und Oberschenkeln bis zum Knie hin (Lötters et al. 2007).



Abbildung 5: *E. tricolor* Morph 2 (links ventral rechts dorsal). Diese Farbvariante von *E. tricolor* stammt aus dem Bestand eines Züchters aus Schwerte (Probentier SWT03). Bild: © Tim Schikora

Ein großes Problem bei den schwer nach äußeren Gesichtspunkten zu unterscheidenden Froscharten *E. tricolor* und *E. anthonyi* stellt ihr unterschiedlicher Gefährdungsstatus dar. Die Art *E. tricolor* wird laut IUCN als stark gefährdet eingestuft, hingegen *E. anthonyi* nur als potenziell gefährdet (Luis 2004; Luis et al. 2010).

Beide Froscharten sind durch Brandrodung, Waldeinschlag sowie Umwandlung ihres Lebensraumes in Nutzflächen (z.B. Ackerbau) bedroht. Neben der Verkleinerung ihres Habitats, sind Umweltverschmutzung, z.B. durch Belastung der Fließgewässer mit Pestiziden, illegale Wildfänge und Entnahmen für Medizinische Forschung für eine weitere Verringerung der Populationen verantwortlich. Aufgrund all dieser Faktoren besitzt *E. tricolor*, welcher nur an sieben Standorten innerhalb des Verbreitungsgebietes nachgewiesen werden konnte, einen rückläufigen Populationstrend, während die *E. anthonyi* Population als stabil gilt (Luis 2004; Luis et al. 2010).

1.4. Erhaltung der Biologischen Vielfalt

Das seit 1993 in Kraft getretene internationale Umweltabkommen namens „Übereinkommen über die biologische Vielfalt“ (Convention on Biological Diversity, CBD), auch Washingtoner Artenschutzabkommen genannt, beschäftigt sich explizit mit den Themen Art- und Biodiversitätserhaltung (United Nations CBD 1992). Zu den Zielen der CBD zählen die Erhaltung der Biodiversität und die nachhaltige Nutzung ihrer Bestandteile. Im Sinne der CBD ist unter anderem jedes genetische Material von Tieren zu schützen, auch in Bezug auf die biologische Vielfalt zwischen und innerhalb von Arten. Desweiteren schließt die Übereinkunft neben der „In-situ-Erhaltung“, die „Ex-situ-Erhaltung“ ein. Dies steht für den Schutz der biologischen Vielfalt, einschließlich ihrer einzelnen Bestandteile außerhalb ihres natürlichen Verbreitungsgebietes (BMU 1992). Um diesem internationalen Abkommen gerecht zu werden und die Art- und Biodiversitätserhaltung zu fördern, ist es wichtig eine Artbestimmung bei *E. tricolor* und *E. anthonyi* durchzuführen. Ohne Artidentifikation kann es bei der Nachzucht im Sinne der Arterhaltung zu einer Hybridisierung von *E. anthonyi* und *E. tricolor* kommen.

Bei dieser Vergesellschaftung kam es in einem Versuch zu fertilen Nachkommen bis zur F3 Generation (Zimmermann & Zimmermann 1988), jedoch birgt dieser Hybrid die Gefahr der genetischen Verarmung und einer geringeren Fitness. Da dieser Versuch, jedoch vor den Untersuchungen von Graham et al. (2004) stattfand, kann man heute nicht sicher sagen ob es sich bei den damaligen Versuchstieren um *E. tricolor* und *E. anthonyi* handelte. Um eine erfolgreiche und zielgerichtete Weiterzucht zu etablieren, gerade für den seltenen *E. tricolor*, setzt dies Tiere mit eindeutiger Artzuordnung voraus. Solch eine Artzuordnung lässt sich nur durch eine genetische Untersuchung zweifelsfrei realisieren.

CATHERINE H. GRAHAM ET AL.

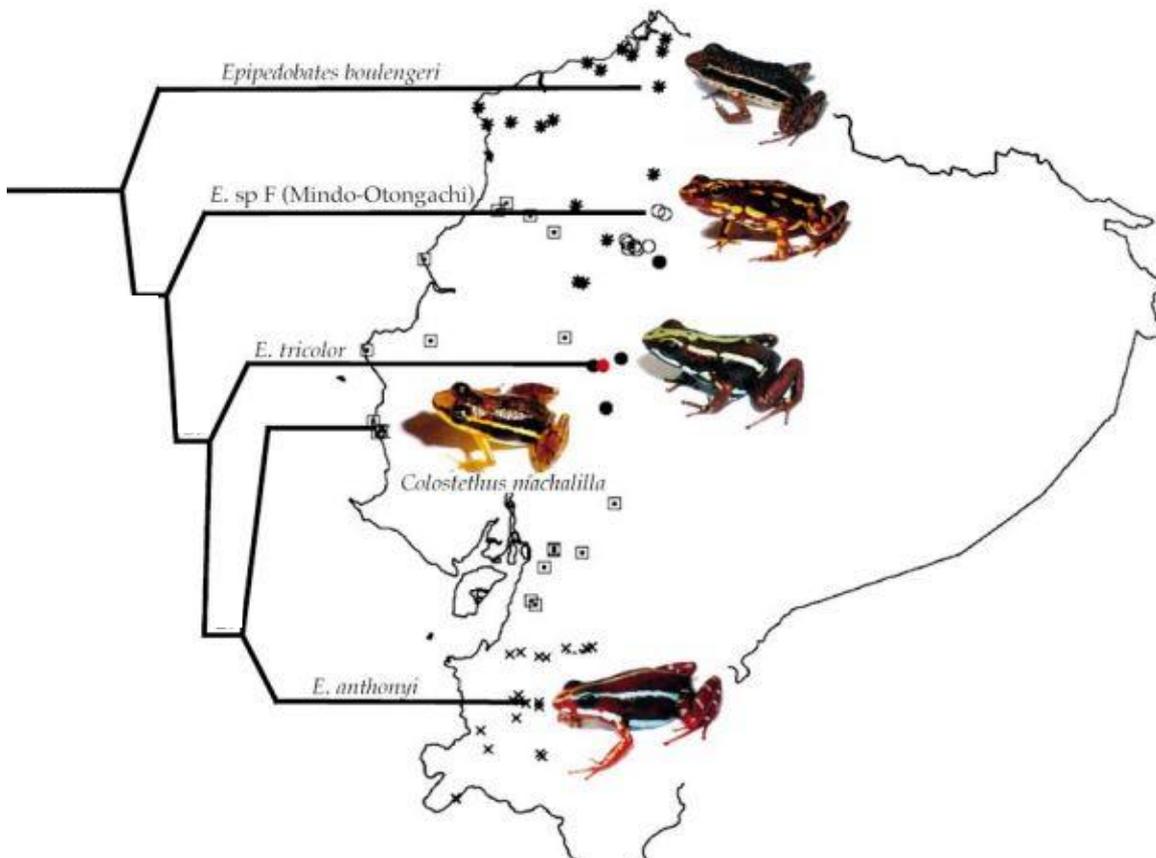


Abbildung 6: Verwandtschaftsverhältnisse in der *Epipedobates*-Clade. *E. anthonyi* ist mit *E. machalilla* (in der Abbildung als *Colostethus machalilla* bezeichnet) näher verwandt (Schwesterarten), als mit *E. tricolor* (nur Schwestergruppe zu der Clade). Das Verbreitungsgebiet von *E. machalilla* liegt zwischen den Gebieten von *E. anthonyi* und *E. tricolor*. Bild: © Graham et al. (2004)

Bei den beiden Pfeilgiftfroscharten *E. tricolor* und *E. anthonyi* sind die Verwandtschaftsverhältnisse noch nicht abschließend geklärt. Laut Clough und Summers (2000) sind die beiden Pfeilgiftfroscharten zwar miteinander verwandt, jedoch handelt es sich um keine unmittelbaren Schwestergruppen. Da die Habitate der beiden Arten ca. 200 km voneinander entfernt liegen (Abb. 1), ist eine allopatrisch Artbildung auf den ersten Blick anzunehmen. Für Vences et al. (2003) spielen die Andengebirgsbildung eine große Rolle für die Bildung der *Epipedobates*-Linie. Graham et al. (2004) ziehen jedoch eine parapatrische Artbildung mit gelegentlichem genetischen Austausch zwischen den beiden Arten vor und sehen *E. tricolor* in einer Clade mit *E. anthonyi* und dessen Schwesterart *E. machalilla* vereint (Abb. 6). Laut Aussage von Juan C. Santos (2014) sind die drei Arten *E. tricolor*, *E. anthonyi* und *E. machalilla* sehr nahe miteinander verwandt, jedoch ist noch nicht vollkommen klar, wie die drei Arten im Stammbaum zueinander stehen und wie die Schwesterarten-Verhältnisse aussehen. Santos (pers. Komm. 2014) und Graham et al. (2006) empfehlen weitere genetische Untersuchungen der drei Arten, um die Verwandtschaftsverhältnisse zu klären. Ebenso Vences et al. (2003) sehen die Dendrobatiden-Taxonomie und Klassifikation als noch nicht abschließend geklärt an.

1.5 Ziel der Arbeit

Die Punkte Artenschutz, Biodiversitätserhaltung und Wissensetablierung im Bereich der Artbestimmung dienen als Grundlage für diese Arbeit. Das Ziel dieser Bachelorarbeit ist *E. spec.* Populationen verschiedener internationaler Zoos und Züchter auf genetischer Ebene zu untersuchen und eine Artzuordnung zu erstellen. Es soll die Frage beantwortet werden, ob es sich bei den Tieren nur um *E. anthonyi* handelt, da Graham et al (2004) vermuten, dass alle Tiere nach 1976, die aus den südlichen Regionen von Ecuador stammen (nach der Fehlbestimmung durch Silverstone (1976)), zur Art *E. anthonyi* gehören. Ziel ist es, die Halter mit Hilfe einer mtDNA Analyse über die genaue Art ihrer Tiere aufzuklären, um somit klare Verhältnisse für die Weiterzucht der Tiere zu schaffen. Zur Etablierung einer Aufzucht des vom Aussterben bedrohten *E. tricolor* durch den Menschen, ist es nötig geeignete Zuchttiere zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1. Pilotstudie

Die Methodenetablierung begann im Dezember 2012 im Rahmen des Projektes Umweltwissenschaften (Modul aus dem Studiengang Umweltwissenschaften) in Zusammenarbeit mit Jan-Christopher Fischer. In Kooperation mit Dr. Tim Schikora (Zoo Dortmund) wurden hierfür im Vorfeld mehrere deutsche Zoos angeschrieben und um Hautabstrichproben von *E. tricolor* und *E. anthonyi* gebeten. Diese sollten mit Hilfe von sterilen Baumwollwattestäbchen genommen werden und für eine DNA-Extraktion und Sequenzanalyse zur Verfügung gestellt werden. Zur Probenahme wurden die Probestiere in einzelne Aufbewahrungsgefäße separiert oder einzeln in die Hand genommen und mit sterilen Baumwollstäbchen dorsal sowie ventral abgestrichen. Da die Probenahme in den Zoos und bei den Züchtern selbst stattfand, konnte das Vorgehen nicht überprüft werden. Die Zoos, die sich an der Pilotstudie beteiligten sind in Tabelle 1 gelistet.

Da die Proben nicht alle zeitgleich, sondern über mehrere Monate versetzt eintrafen, erstreckte sich die Methodenentwicklung innerhalb der Pilotstudie über sieben Monate (bis Juli 2013). Während dieses Zeitraumes sind die DNA-Extraktionsmethode, der PCR-Ansatz, die Mastermixzusammenstellung, die Primer und das PCR-Programm etabliert worden. Die beschriebenen Methoden wurden auch in der Hauptstudie verwendet.

Tabelle 1: Kooperationspartner und Proben in der Pilotstudie. Insgesamt standen 36 Proben für die Pilotstudie zur Verfügung. Im Landauer Zoo wurden 4 Individuen jeweils doppelt beprobt (Probe A und Probe B). Daher gab es vom Landauer Zoo insgesamt 8 Abstriche. Bei der Gewebeprobe der Züchterin aus Malsch handelte es sich um eine in Ethanol gelagerte Kaulquappe.

Probensteller	Abkürzung [X=Nummerierung]	Probenanzahl	Probenart
Tiergarten Nürnberg	TGN XX	2	Hautabstrich
Tiergarten Ulm	ULM XX	2	Hautabstrich
Tierpark Chemnitz	TPC XX	2	Hautabstrich
Zoo Landau	LD XX A und XX B	4 (8)	Hautabstrich
Zoo Salzburg	ZSBG XX	6	Hautabstrich
Zoo Stralsund	TPS XX	3	Hautabstrich
Zoologischer Garten Hof	ZHO XX	6	Hautabstrich
Zoologischer Garten Stuttgart	Will XX	6	Hautabstrich
Züchterin aus Malsch	Gew. Zeilfelder	1	Gewebe

2.1.1. DNA Extraktion aus Hautabstrichproben

Das grundsätzliche Vorgehen zur Extrahierung der DNA aus den Hautzellen auf den Wattestäbchen basiert auf der Anleitung „Support protocol for purification of genomic DNA from buccal swabs“ (Machery-Nagel 2010). Die DNA-Extraktion erfolgte nach einem festen Schema unter Verwendung von NucleoSpin Tissue Kits von Macherey-Nagel. Aus den Extraktionskits wurden folgende Chemikalien verwendet: Proteinase K Pulver, Puffer (B3, B5, BE, BW, PB), NucleoSpin Tissue Columns und Sammelröhrchen. Zunächst wurden die einzelnen Wattestäbchenköpfe mit einer in DNA-Exitus gereinigten Schere abgeschnitten und jeweils in extra, mit dem entsprechenden Kürzel der Probe beschrifteten, 1,5 ml Tubes aufbewahrt. Zwischen den einzelnen Proben wurde die Schere in einem Gefäß mit Alkohol (70 % Ethanol) aufbewahrt. Es erfolgte die Zugabe von 400 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), sowie 25 µl Proteinase K (30 mg Proteinase K Pulver mit 1,35 ml PB Puffer angesetzt) zum Vorbereiten der Lyse (Zellauflösung). Die phosphatgepufferte Salzlösung wurde mit 0,8 g Natriumchlorid, 0,02 g Kaliumchlorid, 0,024 g di-Kaliumhydrogenphosphat und 0,144 g di Natriumhydrogenphosphat und 80 ml destilliertem Wasser angesetzt. Nachdem der pH Wert mit 1 molarer HCL auf 7,4 eingestellt wurde, wurde der Puffer mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und autoklaviert. Die mit PBS und Proteinase K versetzten Proben wurden zwei mal fünf Sekunden durchmischt und danach für 10 Minuten bei 56 °C inkubiert. Es erfolgte die Entfernung des Wattestäbchenkopfes mit einer, am Anfang in DNA-Exitus gereinigten und zwischen den einzelnen Proben in 70%tigem Ethanol aufbewahrten, Pinzette. Es folgte die Zugabe von 400 µl B3 Puffer und kräftiges Durchmischen. Danach inkubierten die Proben zum Lysieren für 10 Minuten bei 70 °C. Um die Bedingungen zur DNA-Bindung an die später verwendeten NucleoSpin Tissue Columns (Kieselsäure-Membran Filter) zu verbessern, wurden 400 µl 96 % Ethanol hinzugegeben und die Proben erneut gevortext. Anschließend wurde jeweils die komplette Probenlösung aus den 1,5 ml Tubes auf die Filter, welche in 2 ml Sammelröhrchen steckten, übertragen. Dieser Vorgang erfolgte in zwei Durchgängen, indem zwei Mal 600 µl Probenlösung auf die Filter pipettiert wurde und zwischen den Pipettierschritten erfolgte eine Zentrifugation mit den Filtern für 1 Minute bei 11.000 x g.

Die DNA befindet sich nach diesem Schritt auf der Filtermembran und der bei der Zentrifugation angefallene Flüssigkeitsdurchfluss in den Sammelröhrchen wurde entsorgt. Zum Säubern (Waschen) der Membran wurden im ersten Waschgang 500 µl BW Puffer auf die Filterröhrchen gegeben und wieder eine Minute lange bei 11.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder entsorgt. Im zweiten Waschgang wurden 600 µl B5 Puffer auf die Filterröhrchen pipettiert und erneut für eine Minute bei 11.000 g zentrifugiert, sowie der Durchfluss entfernt. Zum Trockenzentrifugieren der Filtermembran erfolgte ein einminütiger Durchgang bei 11.000 x g. Die Eluierung der DNA erfolgte zwei Mal, um die größtmögliche

Menge an DNA aus der Filtermembran zu erhalten. Im ersten Schritt wurden 25 µl, auf 70°C vorgewärmter, BE Puffer auf die Membran der Filtrertubes pipettiert und eine Minute lang bei Raumtemperatur einwirken gelassen. Die Abzentrifugation der Flüssigkeit erfolgte eine Minute lang bei 11.000 x g in 1,5 ml Tubes. Diese beiden Schritte wurden noch ein zweites Mal wiederholt, sodass ca. 50 µl Probenflüssigkeit mit DNA gewonnen wurden. Alle 1,5 ml Tubes wurden mit den entsprechenden Abkürzungen zur Herkunft beschriftet und im Gefrierschrank bei -18°C eingefroren.

2.1.2. DNA Extraktion aus Gewebeproben

Es wurden auch zwei DNA-Extraktionen aus Gewebematerial (tote Kaulquappe) vorgenommen (Tab. 1), wobei eine Probe erst in der Hauptstudie zur Verfügung stand. Dabei handelte es sich um die Proben namens „Gew. Zeilfelder“ von einer Züchterin aus Malsch (Pilotstudie) und „E.t.N“ von einem Züchter aus Leverkusen (Hauptstudie). Die Extraktion der DNA aus dem Gewebematerial erfolgte nach der Anleitung „Standard protocol for human or animal tissue and cultured cells“ (Machery-Nagel 2010). Die Quappe wurde mit einem, in Alkohol (70 % Ethanol) gereinigten, Skalpell in mehrere kleine Stücke geschnitten und in ein 1,5 ml Tube gegeben. Nach der Zugabe von 180 µl T1 Puffer und 25 µl Proteinase K wurde die „Suspension“ gemischt. Das Stoffgemisch wurde für 1,5 Stunden bei 56 °C auf einem Rüttelinkubator inkubiert, bis sich (fast) das komplette Gewebematerial aufgelöst hatte. Zum kompletten Auflösen der Zellen wurden 200 µl B3 Puffer hinzugeben und die Proben kräftig gemischt, bevor sie für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert wurden. Nach dieser Zeit wurden die Proben bei 11.000 x g für zwei Minuten zentrifugiert und in neue 1,5 ml Tubes überführt, um sichtbare Gewebereste zu entfernen. Danach erfolgte die Zugabe von 210 µl 96%igem Ethanol und kräftiges Mischen, um optimale DNA Bindungsbedingungen für den nächsten Schritt, die DNA Bindung, an den Filter zu schaffen. Ab diesem Schritt (Übertragen der Probelösung auf die Filter) ist das Vorgehen gleich zu dem der Extraktion bei Hautabstrichproben (Kapitel 2.1.1).

In der Pilotstudie wurden die Primer 16 SAR-L und 16 SBR-H nach Palumbi et al. (1991) verwendet. Die Primer wurden in einer Konzentration von 10 pmol/µl genutzt. Als Grundlage für den PCR-Ansatz diente der „5 PRIME HotMasterMix“ von 5 PRIME. Die Bestandteile des 25 µl PCR-Ansatz sind in Tabelle 2 gelistet. Das Programm für die Vervielfältigung der DNA durch die PCR wird in Tabelle 3 gezeigt. Die PCR wurde mit dem „T3 Thermocycler“ von Biometra durchgeführt.

Tabelle 2: Bestandteile 25 µl PCR-Ansatz.

Bestandteil	Menge [µl]
5 PRIME HotMasterMix	10,0
Autoklaviertes Wasser	12,1
Primer 16 SAR-L	0,7
Primer 16 SBR	0,7
DNA (Proben)	1,5

Tabelle 3: PCR-Programm der Pilotstudie. Die Schritte Denaturierung, Primerannealing und Elongation wurden während der PCR 32-mal wiederholt.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94	90	-
Denaturierung	94	45	
Primerannealing	55	45	32
Elongation	72	90	

Um den Erfolg der PCR zu bestätigen, wurde anschließend mit den PCR-Produkten eine Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurde ein 1,44 % Agarosegel (30 ml TBE 1x mit 0,42 g Agarosepulver) verwendet. Die Gele wurden für 35 Minuten bei 100 Volt laufen gelassen und danach für 20 Minuten im bewegten Ethidiumbromidbad zum Anfärben der DNA einwirken gelassen. Die Bildaufnahme erfolgte mit einer UV Lampe und einer Canon EOS 550D Kamera.

Die PCR-Produkte, bei denen bei der Auswertung der Gelelektrophoresebilder Banden sichtbar waren, wurden zur Sequenzanalyse ins Institut für Immunologie und Genetik Labor Dr. Thiele nach Kaiserslautern geschickt.

2.2 Hauptstudie

2.2.1. Kooperationspartner

Für die Hauptstudie wurden erneut Zoos und Züchter angeschrieben um eine größere Vielfalt an Proben zu erhalten. Die bereits vorhandenen Proben aus der Pilotstudie wurden weiter verwendet. Um eine einheitliche, schonende und relativ gering invasive Probennahme bei den unterschiedlichen Kooperationsteilnehmern zu gewährleisten, die Fehleranfälligkeit, wie Kontaminationen und zu wenig DNA-Material an den Wattestäbchen zu verringern, wurde eine stichpunktartige, englischsprachige Probennahmeanleitung mit Piktogrammen (Anhang 1) erstellt. Allen Kooperationspartnern wurden zur Probennahme sterile Baumwollwattestäbchen und die Probennahmeanleitung geschickt. Alle 95 individuellen in der Hauptstudie zur Verfügung stehenden Proben finden sich in Tabelle 4. Die erhaltenen

2. Material und Methoden

Hautabstrichproben wurden mit gleichen Verfahren wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben extrahiert.

Tabelle 4: Gesamtprobenübersicht der Hauptstudie. Insgesamt wurden von den Kooperationspartnern 95 (inklusive der Proben aus der Pilotstudie) individuelle Proben von als *E. tricolor* und *E. anthonyi* gehaltenen Tieren zur Verfügung gestellt. 93 Proben wurden in Form von Hautabstrichen und 2 Proben in Form von Gewebe bereitgestellt. Bei den Gewebeproben handelt es sich um in Ethanol gelagerte Kaulquappen. Die Zahl in Klammer in der Spalte Probenanzahl gibt die Probenanzahl inklusive Wiederholungsbeprobung an.

Probensteller	Herkunftsland	Abkürzung [X=Nummerierung]	Probenanzahl	Probenart
Berkshire College	Großbritannien	BCA XX	6	Hautabstrich
Lakeland Wildlife Oasis Hale	Großbritannien	CWO XX	6	Hautabstrich
Sparholt Hampshire	Großbritannien	SPA XX	9	Hautabstrich
Tiergarten Nürnberg	Deutschland	TGN XX	2	Hautabstrich
Tiergarten Ulm	Deutschland	ULM XX	2	Hautabstrich
Tierpark Chemnitz	Deutschland	TPC XX	3 (4)	Hautabstrich
Tierpark Emmen	Niederlande	EMM XX	4	Hautabstrich
Zoo Antwerpen	Belgien	ANT XX	2	Hautabstrich
Zoo aus Dortmund	Deutschland	DO XX	3	Hautabstrich
Zoo Landau	Deutschland	LD XX A und XX B	4 (8)	Hautabstrich
Zoo Poznań	Polen	POZ XX	5	Hautabstrich
Zoo Riga	Deutschland	RIG XX	5	Hautabstrich
Zoo Salzburg	Österreich	ZSBG XX	6	Hautabstrich
Zoo Stralsund	Deutschland	TPS XX	3	Hautabstrich
Zoo Thoiry	Frankreich	THO XX	6	Hautabstrich
Zoo Vivarium Darmstadt	Deutschland	ZVD XX	8	Hautabstrich
Zoologischer Garten Hof	Deutschland	ZHO XX	6	Hautabstrich
Zoologischer Garten Stuttgart	Deutschland	Will XX	6	Hautabstrich

Züchter aus Leverkusen	Deutschland	E.t.N	1 (2)	Gewebe
Züchter aus Schwerte	Deutschland	SWT XX	4	Hautabstrich
Züchter aus Witten	Deutschland	WIT XX	3	Hautabstrich
Züchterin aus Malsch	Deutschland	Gew. Zeilfelder	1	Gewebe

2.2.2. Verwendete Primer

Um bessere Ergebnisse und längere Sequenzen zu erhalten wurden in der Bachelorarbeit Primer und PCR-Programm gewechselt. Der Wechsel erfolgte aufgrund der Kontaktaufnahme mit Santos J.C. und dessen Ergebnisse bei der Analyse von *E. spec.* DNA (Santos et al. 2003). Von sechs Primerpaaren (Santos et al. 2003), die Santos empfohlen hat (pers. Komm. 2013) wurden drei in dieser Arbeit verwendet (Tab. 5). Die Primer wurden in einer 10 pmol/ μ l Konzentration verwendet. Die DNA-Sequenzen, die mit den Primerpaaren 2, 3 und 4 (Tab. 5) erzeugt wurden, überlappen sich gegenseitig und bilden zusammen ein ca. 2000 basenpaarlanges Segment (Abb. 7). Das Primerpaar 1 (aus dem Pilotprojekt) (Tab. 5) wurde bei metabion international AG Planegg/Steinkirchen und die Primerpaare 2, 3 und 4 (Tab. 5) wurden bei VBC-Biotech Service GmbH Wien gekauft.

Tabelle 5: Verwendete Primer. Das Primerpaar 1 wurde verwendet, da es bereits erfolgreich im Pilotprojekt und bei anderen Untersuchungen zum Einsatz kam (Vences et al. 2003). Die Primerpaare 2, 3 und 4 sind ebenfalls für Pfeilgiftfrösche geeignet (Santos et al. 2003). Die Länge des mit dem jeweiligen Primerpaar sequenzierten DNA-Fragments ist angegeben. Die Abkürzung bp steht dabei für die Anzahl der Basenpaare.

Primer	Paar Nr.	Länge [bp]	Basenabfolge [5'-3']
16SAR-L 16SBR	1	500-650	CGCCTGTTTATCAAAAACAT CCGGTCTGAACTCAGATCACGT
12L1-L 16SH-H	2	700-800	AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT GCTAGACCATGATGCAAAAGGTA
12SM-L 16SA-H	3	700-800	GGCAAGTCGTAACATGGTAAG ATGTTTTTGTATAAACAGGCCG
16SC-L 16SD-H	4	700-800	GTRGGCCTAAAAGCAGCCAC CTCCGGTCTGAACTCAGATCACGTAG

Das neue PCR-Programm (Tab. 6), das nach dem Wechsel zu den Santos-Primern verwendet wurde, basiert ebenfalls auf Santos Grundlagen (Santos et al. 2003 und pers. Komm.2014). Um die Qualität der PCR zu erhöhen, wurde für jedes Primerpaar jedoch noch eine extra Gradienten-PCR mit dem peqSTAR 96 Universal Gradient Thermocycler

durchgeführt, um deren optimale Annealingtemperatur herauszufinden. Dieser Schritt war notwendig, da die vom Hersteller der Primer (VBC-Biotech) angegebenen Temperaturen keine hohe Erfolgsrate bei den durchgeführten PCRs lieferten. Für die Gradienten-PCR wurden Proben verwendet, die bereits im Pilotprojekt erfolgreich Sequenzen geliefert hatten. Beim Primerannealing wurde ein Temperaturgradient gefahren, der über 12 Temperaturschritte (48°C bis 59°C) verfügte.

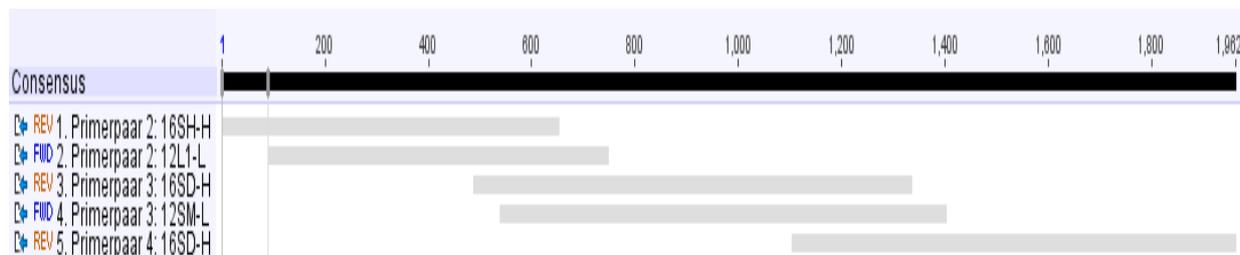


Abbildung 7: Lage der DNA-Sequenzen, die mit den Primerpaaren 2, 3 und 4 erzeugt wurden zueinander. Die Primerpaare bilden somit ein ca. 2.000 Basenpaar langes Segment. Das Primerpaar 1 überlagert sich nicht mit den anderen Primerpaaren und liefert somit 500 bis 650 bp an zusätzlicher genetischer Information.

Tabelle 6: PCR-Programm der Hauptstudie. Die Temperatur beim Primerannealing (ermittelt durch eine Gradienten-PCR) lag bei Primerpaar 1 bei 55°C, bei Primerpaar 2 bei 52°C, bei Primerpaar 3 bei 50,6°C und bei Primerpaar 4 bei 58,4°C. Die Schritte Denaturierung, Primerannealing und Elongation wurden während der PCR 34-mal wiederholt.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94	120	-
Denaturierung	94	30	34
Primerannealing	je nach Primer	40	
Elongation	72	60	
Finale Elongation	72	420	-

2.3. Genetische Auswertung

Die genetische Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mit dem Programm Geneious Version 7.1.5 (Drummond et al. 2005-2014). Die erhaltenen Sequenzen wurden in Geneious geladen, nach ihrer Primerzugehörigkeit sortiert und nach ihrer „Basenqualität“ aufgelistet. Alle Sequenzen mit „unsauberen“ Chromatogrammen und weniger als 35 % an qualitativ hochwertigen Basen wurden aussortiert und nicht weiter bearbeitet. Alle verbleibenden Sequenzen wurden manuell einzeln bearbeitet, um falsch beschriftete Basen zu korrigieren. Anfangs- und Endbereiche der Sequenzen mit geringer Basenqualität wurden zuerst grob geschnitten, bevor es an die Betrachtung einzelner Basen ging. Falls sich zwei Basengraphen an der gleichen Stelle überlagerten, wurde die Bezeichnung der Base entsprechend den IUPAC nucleotide codes (Bioinformatics 2015) abgeändert. Bei

Unklarheiten innerhalb eines Stranges wurde auf den invertierten Gegenstrang (Rückprimer) zurückgegriffen und mit diesem verglichen, falls die Unklarheit im Überlappungsbereich der beiden DNA-Stränge lag (Abb. 7Abbildung). Die Sequenzen jedes Primerpaares wurden mit Geneious zueinander angeglichen und ausgerichtet. Die DNA-Sequenz, die mit dem jeweiligen Rückprimer sequenziert wurde, wurde invertiert und mit dem Strang des Hinprimers zu einem einzigen Strang verbunden. Mit Geneious wurden mehrere Alignments der Primerpaare aus den vorhandenen Sequenzen erstellt und danach auf die gleiche Basenlänge geschnitten. Danach erfolgte der Export der Sequenzen aus Geneious.

Die bearbeiteten Sequenzen wurden mit der integrierten Suchfunktion in Geneious mit Sequenzeinträgen aus der GenBank Datenbank (National Center for Biotechnology Information 2014) verglichen und die Ergebnisse der Suche mit den Referenzsequenzen abgeglichen. Bei den acht Referenzsequenzen (Abb. 1) handelt es sich um Sequenzen, bei denen die korrekte Artzuordnung von *E. tricolor* oder *E. anthonyi* nach Aussage von Santos, der die Sequenzen in die Datenbank hochgeladen hat, gesichert ist (pers. Komm. Santos 2014). Zur Verifikation der Referenzen wurden die GPS Koordinaten der Fundorte der Proben herangezogen (vgl. Abb. 1). Weitere Informationen und Verifikationsaspekte zu den Referenzsequenzen sind in Fischer (2015) zu finden.

Die Darstellung der genetischen Verwandtschaftsverhältnisse wurde mit Network Version 4.6.1.2 (Fluxus Technology 2004-2014, Suffolk, U.K.) realisiert. Dabei wurden, mit den aus Geneious exportierten Sequenzen zur Visualisierung der Verwandtschaftsverhältnisse, Median Joining Grafiken erstellt.

2.4. Morphologischer Vergleich

Um die Morphologie der Probestiere untersuchen zu können, stellten einige Kooperationspartner Fotos ihrer Probestiere zur Verfügung. Es wurden sowohl Fotos von *E. anthonyi* Morphen (Abb. 2, 3, 13, 14, 15, 16, 17 und 18), also auch Fotos von *E. tricolor* Morphen (Abb. 4 und 5) bereitgestellt. Beim morphologischen Vergleich der Tiere wurde auf die Grundfärbung, sowie Farbe und Form der dorsalen und ventralen Zeichnungsmuster der Tiere geachtet.

3. Ergebnisse

Bei nur zwei von 95 untersuchten Proben handelt es sich um *E. tricolor*. Von den verbleibenden 93 Proben wurden 42 als *E. anthonyi* identifiziert worden, 46 Proben lieferten keinerlei Ergebnisse und fünf Proben waren mit menschlicher DNA kontaminiert (vgl. Tab. 7 in Anhang 2). Bei nur 44 erfolgreich extrahierten und sequenzierten Proben sind somit 4,5 % (zwei Proben) *E. tricolor*. Beide *E. tricolor* Proben („SWT03“ und „E.t.N“) stammen von privaten Züchtern (Tab. 7). Die zur Vervielfältigung der DNA-Sequenzen genutzten Primerpaare lieferten unterschiedlich gute Ergebnisse (Tab. 7). Am erfolgreichsten ließen sich DNA-Fragmente mit Primerpaar 2 (34 Proben) sequenzieren. Primerpaar 1 und 3 lieferten nur in 16 bzw. 11 Fällen auswertbare DNA-Sequenzen. Mit Hilfe von Primerpaar 4 konnten nur 2 DNA-Sequenzen repliziert werden.

Nicht jede Probe lieferte mit Hilfe jedes Primerpaares brauchbare DNA-Fragmente (Tab. 7). Aus diesem Grund wurden in der Untersuchung der Proben passende DNA-Fragmente zusammengesetzt (vgl. Abb. 7 und Tab. 7) um möglichst jede Probe genetisch mit den restlichen Proben vergleichen zu können (Abb. 8, 9, 10 und 11). DNA-Fragmente der Probe „SWT03“, erzeugt mit Hilfe der Primerpaaren 2, 3 und 4, konnten teilweise sequenziert werden. Durch das Alignen und das Zusammensetzen der Basenabschnitte konnte ein 1.961 bp langes Stück erzeugt werden (vgl. Abb. 7). Dieses Stück weist mit den *E. tricolor* Referenzsequenzen HQ291001 und EU342577 eine 100 % Übereinstimmung auf. Nach der Aufarbeitung der mit Hilfe von Primerpaar 2 und 3 vervielfältigten DNA-Fragmente (733 Basen und 915 Basen), überlagern sich beide Fragmente um 252 Basen. Durch die Verknüpfung der beiden DNA-Fragmente ergibt sich somit ein Sequenzstrang mit 1396 Basen. Bei dieser Basensequenz weist die Probe „SWT03“, identifiziert als *E. tricolor*, mindestens 16 Mutationen (1,14 % Unterschied) zu den nächst verwandten *E. anthonyi* Exemplaren auf (vgl. Abb. 10).

Die Probe „E.t.N“ wurde mit Hilfe der durch die Primerpaare 1, 2, und 4 vervielfältigten DNA-Sequenzen als *E. tricolor* identifiziert. Die drei DNA-Sequenzen überlappen sich nicht gegenseitig (Abb. 7) und bilden somit kein zusammengehöriges Gesamtsegment. Die vervielfältigte Sequenz durch Primerpaar 2 (264 bp) stimmt mit den Referenzsequenzen HQ291001, EU342577 und EU342578 von *E. tricolor* zu 99,8 % überein. Die vervielfältigte Sequenz durch Primerpaar 1 (582 bp) und Primerpaar 4 (898 bp) stimmt mit der Referenzsequenz HQ291001 von *E. tricolor* zu 100% überein.

Anhand der Median Joining Netzwerke (Abb. 8, 9, 10 und 11) lassen sich genetische Unterschiede innerhalb der *E. anthonyi* Exemplare ausmachen. Unterschiede in der Sequenzabfolge der als *E. anthonyi* identifizieren Tiere finden sich sowohl bei Tieren der

gleichen Population als auch bei Tieren verschiedener Populationen. Allerdings sind die genetischen Unterschiede zwischen den einzelnen *E. anthonyi* Exemplaren sehr gering. Zwischen den DNA-Sequenzen der identifizierten *E. anthonyi* Exemplare liegen ein bis maximal 4 Mutationen vor (vgl. Abb. 8, 9, 10 und 11). Alle Basenlängen in Median Joining Netzwerken der verschiedenen Primerpaare beziehen sich auf Angaben nach dem Post-Trim (Schneiden).

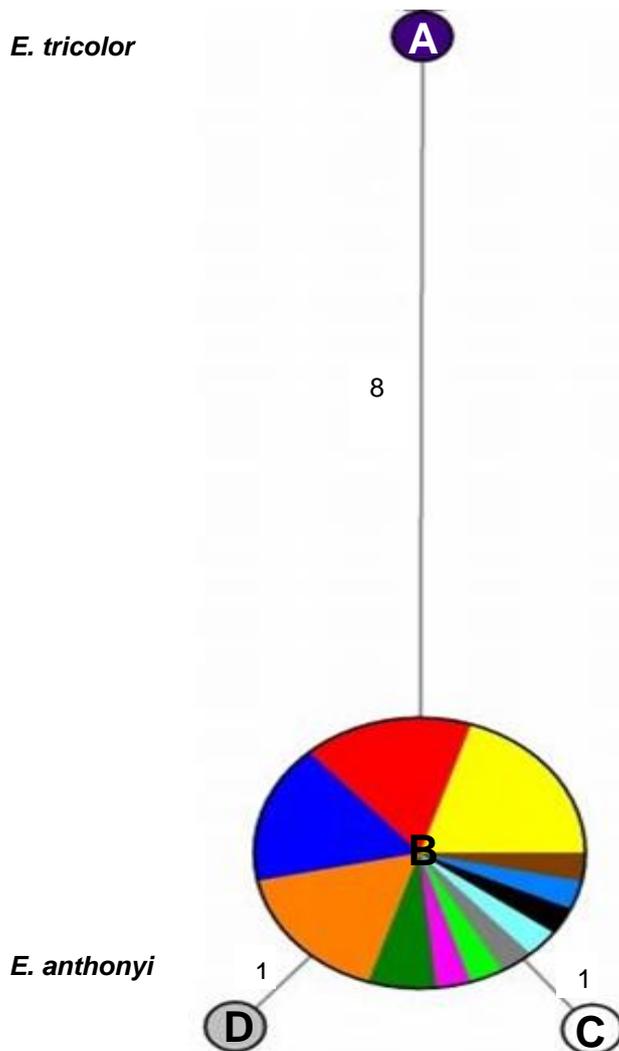


Abbildung 8: Median Joining Netzwerk mit DNA-Sequenzen, die mit Hilfe des Primerpaares 2 vervielfältigt wurden. Das Median Joining Netzwerk, erzeugt mit Network 4.6.1.2, zeigt die genetischen Verwandtschaftsverhältnisse von 33 *E. spec.* Proben (davon 32x *E. anthonyi* und 1x *E. tricolor*) an einem Genausschnitt (mitochondrial) mit einer Länge von 733 Basen. Jeder Kreis beinhaltet nur Individuen den gleichen Haplotyp besitzen, sich im betrachteten Genausschnitt also nicht unterscheiden. Der Kreisumfang ist proportional zur Anzahl der Individuen innerhalb der Gruppen. Die Länge der Äste zwischen den einzelnen Gruppen ist proportional zu den Unterschieden zwischen den Gruppen, wobei die Zahl am Ast für die genaue Mutationsanzahl steht. Bei den Proben handelt es sich um: Kreis A (SWT03), Kreis B (ANT01, BCA01, BCA03, BCA04, BCA05, BCA 06, CWO05, CWO06, EMM04, LD-3A, POZ01 bis POZ05, RIG03, SWT04, TPC10, WIT01, ZSBG01 bis ZSBG06, ZVD03, ZVD04, ZVD06 bis ZVD08), Kreis C (SWT01), Kreis D (DO 03).

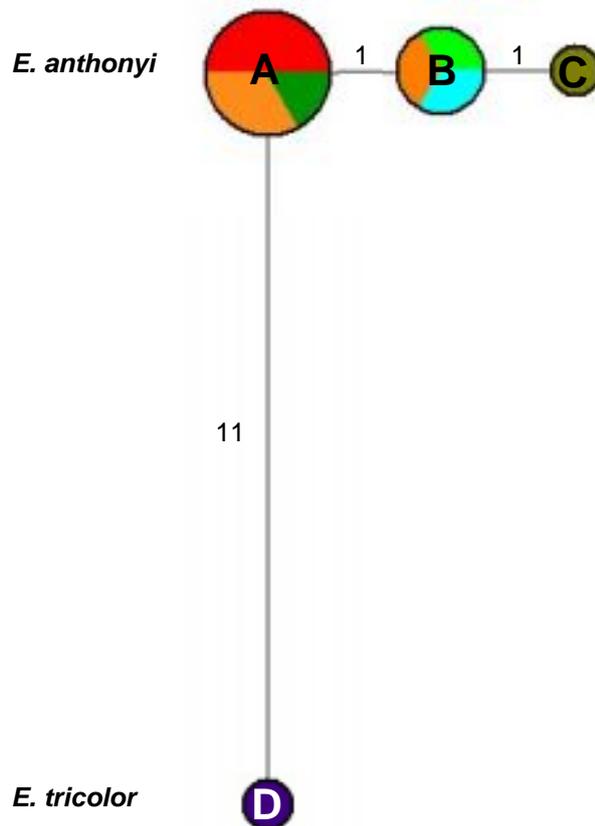


Abbildung 9: Median Joining Netzwerk mit DNA-Sequenzen, die mit Hilfe des Primerpaares 3 vervielfältigt wurden. Das Median Joining Network zeigt die genetischen Verwandtschaftsverhältnisse von 11 *E. spec.* Proben (davon 10x *E. anthonyi* und 1x *E. tricolor*) an einem Genausschnitt (mitochondrial) mit einer Länge von 915 Basen. Eine ausführliche Erklärung der Grafik findet sich bei Abbildung 8. Bei den Proben handelt es sich um: Kreis A (BCA01, BCA02, BCA05, CWO05, POZ01, POZ05), Kreis B (LD-3A, POZ04, SWT04), Kreis C (SWT02), Kreis D (SWT03).

Bei Verwendung aller durch die Primerpaare vervielfältigten, verschiedenen DNA-Fragmente standen ca. 2.500 bis 2.650 bp mit genetischen Informationen zur Verfügung (Tab. 5 und Abb. 7). Bei den 29 gefundenen Mutationen (5 bei Primerpaar 1, 16 bei der Kombination von Primerpaar 2 und 3, 8 bei Primerpaar 4, vgl. Abb. 8, 9, 10 und 11) zwischen *E. anthonyi* und *E. tricolor* macht dies ca. 1,09 bis 1,16 % genetischen Unterschied aus. Zwischen einzelnen *E. anthonyi* Exemplaren liegt der genetische Unterschied zwischen 0,07 (Abb. 10) und maximal 0,69 % (Abb. 11). Die Median Joining Grafik (Abb. 8) zeigt acht Mutationen in den DNA-Fragmenten (733 bp) zwischen *E. tricolor* (Probentier SWT03) und den nächst verwandten Exemplaren von *E. anthonyi*. Ebenso beim Vergleich der DNA-Fragmente (915 bp) in Abbildung 9 zeigen sich genetische Unterschiede (mindestens 11 Mutationen) zwischen *E. tricolor* (Probentier SWT03) und *E. anthonyi*. Die meisten Mutationen (mindestens 16 Stück) beim Vergleich der DNA-Fragmente (1396 bp) von *E. tricolor* (Probentier SWT03) und *E. anthonyi* werden in Abbildung 10 dargestellt. Abbildung 11 zeigt, dass zwischen den DNA-Fragmenten (582 bp) verschiedener Probetiere der Art *E. anthonyi* genetische Unterschiede (bis zu 4 Mutationen) vorhanden sind.

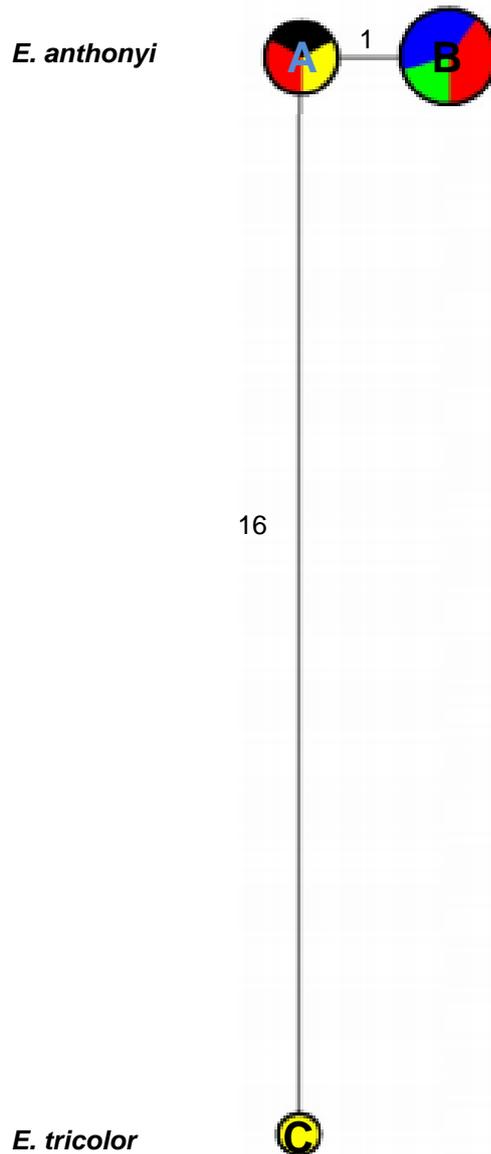


Abbildung 10: Median Joining Netzwerk mit verknüpften DNA-Sequenzen, die mit Hilfe der Primerpaares 2 und 3 vervielfältigt wurden (Tab. 5 und Abb. 7). Das Median Joining Network zeigt die genetischen Verwandtschaftsverhältnisse von 9 *E. spec.* Proben (davon 8x *E. anthonyi* und 1x *E. tricolor*) an einem Genausschnitt (mitochondrial) mit einer Länge von 1396 Basen. Eine ausführliche Erklärung der Grafik findet sich bei Abbildung 8. Bei den Proben handelt es sich um: Kreis A (LD-3A, POZ04, SWT04), Kreis B (BCA01, BCA05, CWO05, POZ01, POZ05), Kreis C (SWT03).

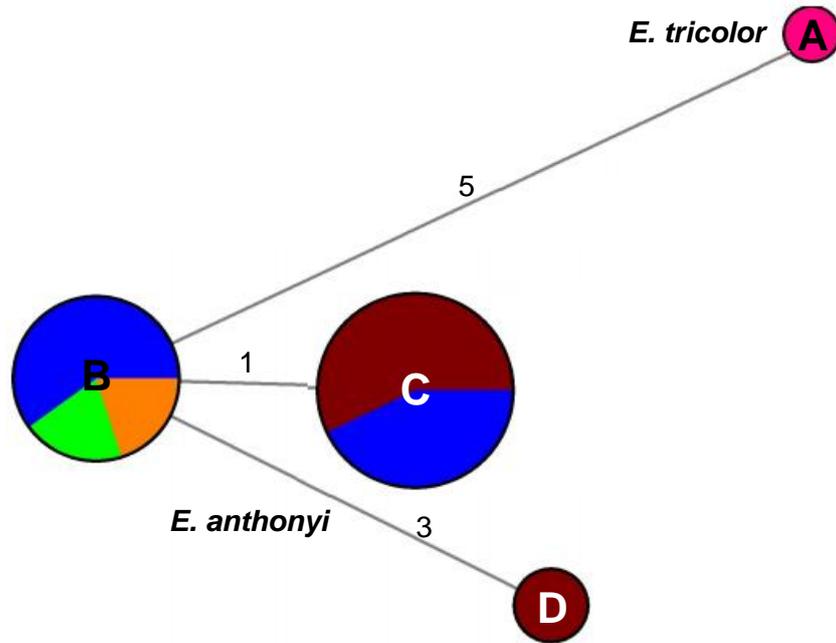


Abbildung 11: Median Joining Netzwerk mit DNA-Sequenzen, die mit Hilfe des Primerpaares 1 vervielfältigt wurden. Das Median Joining Netzwerk zeigt die genetischen Verwandtschaftsverhältnisse von 14 *E. s spec.* Proben (davon 13x *E. anthonyi* und 1x *E. tricolor*). Bei dem betrachteten Genausschnitt (mitochondrial) an einem Genausschnitt (mitochondrial) mit einer Länge von 582 Basen. Eine ausführliche Erklärung der Grafik findet sich bei Abbildung 8. Bei den Proben handelt es sich um: Kreis A (*E.t.N*), Kreis B (ZSBG01, ZSBG05, ZSBG06, Gew. Zeilfelder, LD3A), Kreis C (ZSBG02, ZSBG03, ZSBG04, ZHO01, ZHO03, ZHO04, ZHO05), Kreis D (ZHO02).

Beim Vergleich der DNA-Sequenzen, der als *E. tricolor* identifizierten Proben „SWT03“ und „E.t.N“, welche mit den Primerpaaren 2 und 4 vervielfältigt wurden, zeigen sich keinerlei genetische Unterschiede. Die Sequenzen der beiden Proben stimmen 100 % überein. Jedoch besitzen die beiden Probetiere unterschiedliche Phänotypen (vgl. Abb. 4 und 5), es handelt sich um Morphe. Morph Nr.1 (Probetier E.t.N, Abb. 4) hat eine dunkle, rotbraune Grundfärbung mit schmalen hell weiß-bläulichen Dorsolateral- und Medianstreifen und besitzt nur wenige ventrale Flecken gleicher Farbe. Morph Nr. 2 (Probetier SWT03, Abb. 5) hingegen hat eine braune Grundfärbung mit breiteren blass, gelblichen Dorsolateral- und unterbrochenen Medianstreifen und einen stark fleckigen Bauch. Als Besonderheit besitzt dieses *E. tricolor* Exemplar intensive orangene Flecken am Ober- und Unterschenkel.

Bei den Proben „SWT01“, „SWT02“ und „SWT04“, die vom gleichen Züchter stammen wie „SWT03“ (Tab. 7) handelt es sich um Morphe von *E. anthonyi*. Alle drei Probetiere besitzen unterschiedlichen Phänotypen (vgl. Abb. in Anhang 3, 4 und 5). Die DNA-Fragmente der Proben SWT01 und SWT04 unterscheiden sich nur durch eine Base (Abb. 8). Ein Vergleich der beiden DNA-Fragmente (vervielfältigt mit Primerpaar 2) mit dem DNA-Fragment der Probe SWT02 ist nicht möglich, da diese nicht erfolgreich mit Hilfe von Primerpaar 2 vervielfältigt werden konnte. Morph Nr. 1 (Probetier SWT01, Anhang 3) weist eine dunkelbraune Grundfärbung mit schmalen cremeweißen Dorsolateral- und Medianstreifen

auf. Die Bauchseite ist fast vollständig mit cremeweißen Flecken bedeckt, nur wenig braune Grundfärbung ist sichtbar. Morph Nr. 2 (Proben tier SWT02, Anhang 4) besitzt eine braune Grundfärbung mit sehr breitem, cremegelbem Dorsalstreifen. Auf der Bauchseite findet sich ein netzartiges cremegelbes Muster. Die Grundfarbe von Morph Nr. 3 (Proben tier SWT04, Anhang 5) ist rotbraun mit blassgelben Dorsolateral- und Medianstreifen. Die Breite der Streifen liegt zwischen denen von Morph Nr. 1 und 2 (Anhang 3 und 4). Im Gegensatz zu den beiden anderen Morphen ist der weiße Bauch vollkommen fleckenfrei.

4. Diskussion

Insgesamt konnten aus den 95 zur Verfügung gestellten Proben nur bei 44 (46,3%) Proben eine Artbestimmung durchgeführt werden. Alle Kooperationspartner müssen nun über ihre Froschart aufgeklärt werden. Da nur zwei (4,5 %) der 44 erfolgreich sequenzierten Proben, als *E. tricolor* identifiziert werden konnten und es sich bei 42 Proben um *E. anthonyi* handelt, unterstützt dies die Annahme, dass es sich beim Großteil der als *E. tricolor* gehaltenen Tiere um *E. anthonyi* handelt. Dies wiederum hat weitreichende Konsequenzen für die Arterhaltung von *E. tricolor* in menschlicher Obhut. Auffällig dabei ist, dass sich die beiden als echte *E. tricolor* erwiesenen Tiere in Züchterhand befinden. Die beiden *E. tricolor* Proben stammen zwar von verschiedenen Züchtern, der Sequenzvergleich von Primerpaar 2 und 4 zeigt bei den beiden Proben keinerlei Mutationen und ist im untersuchten Abschnitt absolut identisch. Diese beiden Tiere eignen sich daher aus genetischer Sicht für eine reine *E. tricolor* Zuchtlinie. Jedoch besitzen die beiden als *E. tricolor* bestimmten Tiere der Züchter aus Leverkusen und Schwerte deutliche morphologische Unterschiede (Vergleiche Abb. 4 und Abb. 5). Aufgrund des unterschiedlichen Phänotyps lassen sich die beiden Individuen als Morphen der Art *E. tricolor* ansehen. Für weitere Untersuchungen sollte wenn möglich geklärt werden, aus welchen Regionen Ecuadors die beiden *E. tricolor* Exemplare oder deren Vorfahren stammen. Morphe können ohne geographische Isolation durch veränderte Umweltbedingungen und im natürlichen Variationsrahmen der Genexpression entstehen. Jedoch sind genetische oder auch umweltbedingte Grundlagen für Morphe nicht zwingend erforderlich (Allendorf et al. 2013). Chunco et al. (2007) fanden heraus, dass Gebiete mit verschiedenartigen Mikrohabitaten oder bereits schwacher sexueller Selektion zu Farb-Polymorphismen führen können. Die Frage stellt sich daher, ob die gefundenen Morphe von *E. anthonyi* und *E. tricolor* oder deren Elterntiere aus verschiedenen Regionen in ihren natürlichen Verbreitungsgebieten stammen. Rudh et al. (2007) sehen einen Zusammenhang zwischen Gendrift, sexueller sowie aposematischer Selektion bei der Ausbildung von Polymorphismus bei der Pfeilgiftfroschart *Dendrobates pumilio*. Weitere Untersuchungen der Morphe von verschiedenen *Epipedobates*-Arten in Zusammenhang mit den Fragen ob diese eine Vorstufe zur sympatrischen Artbildung darstellen und welche Faktoren (genetische, umweltbedingte, sexuelle, aposematische oder andere) für die Ausbildung von Polymorphismus verantwortlich bzw. eine Rolle spielen, sind zu empfehlen und wünschenswert. Neben *E. anthonyi* und *E. tricolor* sollte auch eine mögliche Hybridisierung mit *E. machalilla* untersucht werden, da das Verbreitungsgebiets dieser Art genau zwischen den beiden anderen Arten liegt. Ein weiterer Grund auch *E. machalilla* mit einzubeziehen ist seine direkte Verwandtschaft (Schwesterart) zu *E. anthonyi* (Abb. 6).

Es ist davon auszugehen, dass es sich bei den Unterschieden zwischen den *E. tricolor* und den *E. anthonyi* DNA-Sequenzen um zufällige Mutationen handelt, die durch eine unabhängige Entwicklung hin zu verschiedenen Arten zustande kommen. Zwischen *E. tricolor* und *E. anthonyi* wurden auf jedem durch die Primerpaare vermehrten DNA-Fragment genetische Unterschiede gefunden (vgl. Abb. 8, 9, 10 und 11).

Die verwendete mtDNA eignet sich sehr gut um phylogenetisch nah verwandte Arten zu bestimmen (Awise 1994). Gerade auch deshalb, da die untersuchten 12S und 16S rRNA Abschnitte nur sehr „zurückhaltend“ mutieren (Awise 1994, Goebel et al 1998), aufgrund der sehr geringen Austauschrate der Basen (Clough and Summers 2000). Ein weiterer Vorteil von mtDNA stellt ihrer Häufigkeit dar. In eukaryotische Zellen finden sich tausende Mitochondrien mit ebenso vielen Kopien an mtDNA, dem gegenüber aber nur ein Nukleus mit DNA (Clark 2005) steht. Die Genorte 12S und 16S wurden gewählt, um dem Problem der geringen Aussagekraft bei Betrachten nur eines Genortes bei nah verwandten Arten zu minimieren und da es für diese DNA-Abschnitte Referenzdaten in der Genbank (NCBI) gibt. Jedoch empfehlen Lamb und Lydeard (1994) zudem mehrere Gensequenzen mit unterschiedlichen Erhaltungsraten/Mutationsraten zu nutzen. Zu Beginn dieser Arbeit wurde das Protein Cytochrom b als möglicher weiterer genetischer DNA-Abschnitt bei Pfeilgiftfröschen in Betracht gezogen, jedoch aufgrund seiner zu hohen Mutationsrate fallen gelassen. Im Nachhinein wäre eine Untersuchung von Cytochrom b in Hinblick auf seine schnelle Mutation wünschenswert gewesen, um weitere genetische Unterscheidungsmerkmale zwischen und innerhalb der beiden nah verwandten Arten *E. tricolor*, inklusive seiner Morphe und *E. anthonyi* zu finden.

Ein weiteres Problem bei der Verwendung von mtDNA stellt die rein maternale Vererbung dieser dar. Dadurch vererbt nur das Muttertier seine mtDNA und es kommt somit zu keiner Rekombination mit der „väterlichen“ mtDNA (Moritz et al. 1987, Rolf und Wiegand 2004). Das Problem hierbei ist, dass man durch die fehlende Rekombination mögliche Hybride von *E. tricolor* und *E. anthonyi*, laut Zimmermann und Zimmermann (1988) im Terrarium möglich, nicht auf diesem Wege unterscheiden kann. Des Weiteren führt die rein maternal weitergegebene mtDNA dazu, dass über Generationen hinweg alle Nachkommen einer mütterlichen Linie dieselben genetischen Informationen besitzen. Da keinerlei Rekombination der mtDNA erfolge, lässt sich hierdurch ein Blick auf die weiblichen Vorfahren des Tieres werfen (Clark 2005). Die Frage, ob bei dieser Untersuchung auch Hybride untersucht wurden, lässt sich aufgrund dieser Problematik nicht beantworten. Im schlimmsten Fall kann diese Vererbung dazu führen, dass ein Tier zwar als *E. tricolor* identifiziert wurde, jedoch die nukleare DNA des Tieres zum Großteil zu *E. anthonyi* zählt. Dieser Fall kann eintreten, wenn die Urgroßmutter/das Muttertier der Mutter zu *E. tricolor*

gehörte und ihre mtDNA über die verschiedenen Generationen hinweg an ihre Urenkelin weitergab, aber alle männlichen Tiere aus dieser Linie zu *E. anthonyi* gehörten. Weiterhin ist aber nicht gesichert, ob es wirklich Hybride zwischen den beiden Arten gibt. Die Studie von Zimmermann und Zimmermann (1988) fand zu einer Zeit statt bevor die Fehlinterpretation Silverstones (1976) einer *E. anthonyi* Population bekannt wurde. Das Thema der Hybridisierung bedarf weiterer Forschung und sollte mit Hilfe der gefundenen *E. tricolor* und *E. anthonyi* und anderer Individuen näher untersucht werden.

Dass die beiden Arten *E. tricolor* und *E. anthonyi* schwer voneinander unterscheidbar sind und daher eine rein morphologische Bestimmung nicht zielführend ist, ist unter den betroffenen Zoos und Züchtern teilweise bekannt. Zoos und Züchtern stehen oftmals nicht die entsprechenden Mittel und Möglichkeiten zur Verfügung, um genetische Analysen ihrer Tiere durchführen zu können. Daher sind sie auf externe Untersuchungen bei dieser Problematik angewiesen. Die hohe Kooperationsbereitschaft und Bereitstellung der Proben durch Zoos und Züchter zeigen, dass die Unterstützung von außen gerne angenommen wird. Die genetischen Untersuchungen weisen darauf hin, dass es sich bei vielen Tieren nicht um *E. tricolor*, sondern um *E. anthonyi* handelt. Diese Verwechslung ist aufgrund der Fehlbestimmung von Silverstone (1976) nachvollziehbar. An diesem Fall lässt sich die Wichtigkeit der Aufklärung über die Problematik der Arten *E. anthonyi* und *E. tricolor*, sowie einer eindeutigen Artidentifikation der beiden Arten erkennen. Zoos und Züchtern müssen die Problematik und Folgen der Verwechslung und eventuellen Hybridisierung von *E. tricolor* und *E. anthonyi* und deren unterschiedlichen Gefährdungsstatus aufgezeigt werden.

Gerade bei Arten mit nur kleinen Populationen ist die evolutionäre Anpassungsfähigkeit gegenüber Fressfeinden, Konkurrenten und Krankheiten verringert und die Gefahr an den Rand des Aussterbens gedrängt zu werden größer, als bei Arten mit größeren Populationen (Frankham et al. 2002). Dies rührt daher, dass die kleine Populationsgröße als Flaschenhals bei der genetischen Vielfalt wirkt und sich diese mit jeder neuen Generation weiter verringert (Allendorf et al. 2013). Gerade bei mtDNA kommt es durch die rein maternale Vererbung zu einem schnelleren Verlust an genetischer Variabilität (Allendorf et al. 2013). Falls in einer Population nur noch Weibchen aus der gleichen genetischen Linien sind, können die Nachkommen wiederum auch nur diese mtDNA in sich tragen. Ein weiterer zu beachtender Faktor stellt Inzucht dar, was wiederum zu einer verminderten Reproduktionsfähigkeit und Fitness der Nachkommen führen kann. Gerade in menschlicher Obhut (Terrarienhaltung) sind *E. anthonyi* und *E. tricolor* hierdurch gefährdet. Daher ist es bei der Etablierung einer reinen Zuchtlinie von *E. anthonyi* und *E. tricolor* unerlässlich immer wieder neue Tiere zur Nachzucht mit anderen Haltern auszutauschen. Es ist speziell darauf zu achten, dass die

ausgetauschten weiblichen Tiere immer aus verschiedenen genetischen Linien stammen, um die genetische Vielfalt zu erhalten.

Eine eindeutige Artidentifizierung ist wichtig für den Schutz der beiden Arten, um speziell auf die Haltungsbedürfnisse der Arten in Terrarien eingehen zu können. Die Seltenheit einer Art stellt für Züchter einen weiteren Grund für eine eindeutige Artidentifizierung dar, da sich diese wiederum auf den Verkaufspreis der Tiere auswirken kann (Lilge und van Meeuwen 1987).

Da bei keiner einzigen Probe DNA-Sequenzen mit Hilfe aller Primerpaare (Tab. 5) vervielfältigt werden konnten, weist dies auch auf eine noch nicht optimale Primerauswahl oder Methodenetablierung hin. Am besten eignet sich Primerpaar 2 zur Vervielfältigung von *Epipedobates*-DNA-Sequenzen (77,27 % entspricht 34 von 44 DNA-Sequenzen, Tab. 7). Primerpaar 1 (36,36 % entspricht 16 von 44 DNA-Sequenzen, Tab. 7) und Primerpaar 3 (25,00 % 11 von 44 DNA-Sequenzen, Tab. 7) eignen sich zurzeit nur bedingt zur Vermehrung von DNA-Sequenz. Mit Hilfe von Primerpaar 4 konnten nur bei zwei Proben DNA-Sequenzen (4,54 % entspricht 2 von 44 DNA-Sequenzen, Tab. 7) vermehrt werden. Interessanter Weise handelt es sich bei den beiden mit Primerpaar 4 vervielfältigten DNA-Sequenzen um *E. tricolor* Sequenzen. Gründe für das schlechte Abschneiden der Primerpaare 1, 3 und 4 könnten unter anderem an einer zu geringen DNA-Qualität bzw. Quantität der Hautabstrichproben oder ein nicht optimal abgestimmtes PCR-Programm liegen. Weitere Untersuchungen zur Optimierung des Vervielfältigungserfolges durch die Primerpaare sind nötig.

Da nur 46,3% aller Proben (44 von 95 Proben, Tab. 7) ein Ergebnis lieferten, zeigt dies, dass die Methode zur Artbestimmung von Pfeilgiftfröschen mittels Hautabstrich noch nicht optimal funktioniert. Gründe hierfür finden sich in verschiedenen Schritten der Untersuchung. Das erste grundsätzliche Problem stellt die Probenahme selbst dar. Da die Probenahme größtenteils von den Kooperationspartnern selbst durchgeführt wurde, konnte das korrekte Vorgehen nicht überprüft werden. Hierbei stellt sich das Problem der Kontamination mit Fremd-DNA. Des Weiteren ist es wahrscheinlich, dass die Wattstäbchen zu wenig Zellmaterial aufnehmen, um daraus DNA extrahieren zu können. Gründe hierfür liegen vermutlich in der geringen Körpergröße und Verletzbarkeit der Tiere und den damit verbundenen sanften Vorgehen bei den Probenahmen, um die Tiere nicht zu verletzen. Weitere Untersuchungen zur Probenahme sind daher anzuraten, da aufgrund der geringen Körpergröße der Tiere ein Abstrich der Mundhöhle wegfällt. Daher ist zu prüfen, ob durch Anfeuchten der Wattestäbchen mit destilliertem Wasser die Aufnahme an Zellmaterial verbessert werden kann. Ein weiterer kritisch zu betrachtender Punkt war die Lagerung und das zeitlich versetzte Eintreffen der Proben. Vor allem die Proben aus dem Pilotprojekt

wurden oft auf- und abgetaut, bis eine passende Methode zur DNA-Extraktion und DNA-Vermehrung entwickelt war. Im Laufe der Hauptstudie erwies es sich als zunehmend schwerer aus „alten“ Proben brauchbare DNA-Sequenzen zu gewinnen. Um dieses Problem zu minimieren hätte von Anfang an jede Probe auf mehrere Arbeitsproben (Lagerung im Kühlschrank) und mehrere Sicherungsproben (Lagerung im Gefrierschrank) aufgeteilt werden müssen.

5. Fazit

Die durchgeführten genetischen Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, dass es sich bei den meisten von Zoos und Züchtern gehaltenen Tieren um *E. anthonyi* handelt. Die wenigen identifizierten *E. tricolor* befinden sich in Hand privater Züchter. Zwischen *E. anthonyi* und *E. tricolor* gibt es eindeutige genetische Unterschiede (vgl. Abb. 8, 9, 10 und 11), was wiederum zeigt, dass es sich trotz hoher morphologischer Ähnlichkeit um zwei Arten handelt. Mit Hilfe der gefundenen *E. tricolor* Exemplare ist der Grundstein gelegt worden, um eine reine *E. tricolor* Zuchtlinie zu erschaffen. Jedoch bedarf es weiterer genetischer Untersuchungen im Hinblick auf die Morphe innerhalb der beiden Pfeilgiftfroscharten. Auch das Problem der möglichen Hybride zwischen den beiden Arten, welches durch die Vererbungsproblematik von mtDNA nicht aufgedeckt werden kann, muss angegangen werden. In Zukunft sollten alle Zoos und Züchter, die *E. tricolor* und *E. anthonyi* halten, die genaue Art ihrer Tiere genetisch untersuchen lassen. Diese Überprüfung aller in Gefangenschaft lebender *E. tricolor* und *E. anthonyi* Exemplare ist nötig, um die Folgen der Fehlbestimmung durch Silverstone (1976) zu minimieren. Zoos und Züchter müssen über die Problematik der Fehlbestimmung und deren Konsequenzen bei der Haltung von *E. tricolor* und *E. anthonyi* besser aufgeklärt werden. Ohne eine Aufklärungskampagne über die Probleme und Gefahren bei der Haltung von *E. tricolor* und *E. anthonyi* und Artbestimmungsmaßnahmen, ist die Arterhaltung und genetische Biodiversitätserhaltung der beiden Pfeilgiftfroscharten durch den Menschen nicht vollkommen gegeben.

6. Literaturverzeichnis

Allendorf, W.F.; Luikart, G.; Aitken, N.S. (2013): *Conservation and the Genetics of Populations*. Second Edition, Wiley-Blackwell

American Museum of natural history, *Amphibian Species of the world 6.0*, <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>>, Schlüsselwörter „*Epipedobates anthonyi*“ und „*Epipedobates tricolor*“, Stand 27.10.2014.

Avise, J.C. (1994): *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman & Hall, New York.

Bioinformatics (2015): *IUPAC nucleotide code* URL: <<http://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html>>, Stand 25.01.2015

BMU (1992): *Übereinkommen über die biologische Vielfalt*; URL: <http://www.dgvn.de/fileadmin/user_upload/DOKUMENTE/UN-Dokumente_zB_Resolutionen/UEbereinkommen_ueber_biologische_Vielfalt.pdf>, Stand 25.01.2015

Boulenger, G.A. (1899): Descriptions of new reptiles and batrachians collected by Mr. P.O. Simons in the Andes of Ecuador. *Annals and Magazine of Natural History*. 7 (4) 454-457.

Chunko, J. A.; McKinnon, S. J.; Servedio, R. M. (2007): Microhabitat Variation and Sexual Selection Can Maintain Male Color Polymorphisms. *Evolution*, Vol. 61. No. 11 (Nov., 2007), pp. 2504-2515.

Clark, P.D. (2005): *Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution*, Elsevier Academic Press, Burlington, USA

Clough, M.; Summers, K. (2000): Phylogenetic systematics and biogeography of the poison frogs: evidence from mitochondrial DNA sequences. *Biological Journal of the Linnean Society*, Vol. 70, No. 3: 515-540.

Daly, J.W.; Tokuyama, T.; Fujiwara, T.; Highet R.J.; Karle, I.L. (1980b): A new class of indolizidine alkaloids from the poison frog, *Dendrobates tricolor*. X-ray analysis of 8-hydroxy-8-methyl-6-(2'-methylhexylidene)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane. *Journal of American Chemical Society*, 102: 830-836.

Drummond A.; Ashton B.; Buxton S.; Cheung M.; Cooper A.; Duran C.; Field M.; Heled J.; Kearse M.; Markowitz S.; Moir R.; Stones-Havas S.; Sturrock S.; Thierer T. ;Wilson A., 2005-2014. *GENEIOUS v 7.1.5 (Computer Program)*. URL: <<http://www.geneious.com>>

- Duellman, W.E.; Wild, E.R. (1993): Anuran amphibians from the Cordillera De Huancabamba, Northern Peru: systematics, ecology, and biogeography. *Occasional Papers of the Museum of Natural History*, The University of Kansas, 157, 1-28.
- Fischer, J.C. (2015): Die abgrenzungsorientierte Beschreibung der Baumsteigerfrösche *Epipedobates anthonyi* und *Epipedobates tricolor* vor dem Hintergrund der genetischen Artzuordnung. *Bachelorarbeit Studiengang Umweltwissenschaften*, Universität Koblenz-Landau, Campus Landau.
- Fluxus Technology 2004-2014, *Network Version 4.6.1.2 (Computer Program)*. Suffolk, U.K. URL: <<http://www.fluxus-engineering.com/>>
- Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. (2002): *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Glaw, F.; Köhler, J.; Hofrichter, R.; Dubois, A. (1998): *Systematik der Amphibien: Liste der rezenten Familien, Gattungen und Arten*, In Hofrichter, R. (Hrsg.): Amphibien.- Naturbuch-Verlag, S. 252-258.
- Goebel, A.M.; Donnelly, J.M.; Atz, M.E. (1998): PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome b in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 11, No. 1. February, 163-199.
- Graham, C.H.; Ron, S.R.; Santos, C.J.; Schneider, C.J.; Moritz, C. (2004): Integrating Phylogenetics and Environmental Niche Models to Explore Speciation Mechanisms in *Dendrobatid* Frogs. *Evolution*, Vol. 58, No. 8, pp. 1781-1793.
- Grand, T.; Frost, D.R.; Caldwell, J.P.; Gagliardo, R.; Haddad, C.F.B.; Kok, P.J.R.; Means, B. D.; Noonan, B.P.; Schargel, W.E.; Wheeler, W.C. (2006): Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (*Amphibia*, *Athesphatanura*, *Dendrobatidae*), *Bulletin of the American Museum of Natural History*, Number 299
- Lamb, T.; Lydeard, C. (1994): A Molecular Phylogeny of the Gopher Tortoises, with Comments on Familial Relationships within the *Testudinoidea*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Volumen 3, Issue 4: Pages 283-291.
- Lilge, D.; van Meeuwen, H. (1987): *Grundlagen der Terrarienhaltung*, Hannover: Landbuch Verlag
- Lötters, S.; Jungfer, K.-H.; Henkel, F. W.; Schmidt, W. (2007): *Pfeilgiftfrösche. Biologie, Haltung, Arten*, Fankfurt am Main, Edition Chimaira

- Luis, A. C. (2004): *Epipedobates tricolor*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 27.10.2014.
- Luis, A. C.; Santiago, R.; Stefan, L.; Pablo, V. (2010): *Epipedobates anthonyi*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. URL: <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 27.10.2014.
- Machery-Nagel (2010): *Genomic DNA from Tissue User Manual NucleoSpin Tissue*. January Rev. 011, Kapitel 5: Standard protocol for human or animal tissue and cultured cells, Kapitel 6.17: Support protocol for purification of genomic DNA from buccal swabs, Machery-Nagel.
- Mebis, D. (2000): *Gifftiere – Ein Handbuch für Biologen, Toxikologen, Ärzte und Apotheker*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. S. 244-245.
- Mebis, D. (2010): Biologische Vielfalt und Diversität von Naturstoffen. Frankfurt, *Naturwissenschaftliche Rundschau*, 63 Jahrgang, Heft 8, Seite 397-402.
- Moritz, C.; Downing, T.E.; Brown, W.M. (1987): Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Vol. 18, 269-292.
- Morris, W.F.; Daok, D.F. (2002): *Quantitative Conservation Biology*. Sunderland: Sinauer Associates. S.41.
- Myers, C.W. (1987): New generic names for some neotropical poison frogs (*Dendrobatidae*), São Paulo, *Papéis Avulsos de Zoologia*, 36: 301-306.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI), U.S. National Library of Medicine (2014): *GenBank* URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>, Stand 26.10.2014.
- Noble, G.K. (1921): Five new species of Salientia from South America. *American Museum of Novitates*. No. 29: 1-7.
- Palumbi, S.; Martin, A.; Romano, S.; McMillan, W.O.; Stice, L.; Grabowski, G. (2002): *THE SIMPLE FOOL'S GUIDE TO PCR*, Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii, Honolulu.
- Rolf, B.; Wiegand, P. (2004): Analyse biologischer Spuren Teil III: Mitochondriale DNA und Y-chromosomale STR, *Rechtsmedizin*, Volumen 13, Issue 2: Seite 473-483.
- Rudh, A.; Rogell, B.; Höglund, J. (2007): Non-gradual variation in colour morphs of the strawberry poison frog *Dendrobates pumilio*: genetic and geographical isolation suggest a role for selection in maintaining polymorphism. *Molecular Ecology*, No. 16, pages 4284-4294.

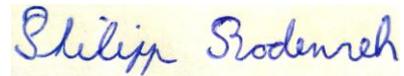
- Santos, J.C.; Coloma, L.A.; Cannatella, D.C. (2003): Multiple, recurring origins of aposematism and diet specialization in poison frogs. *PNAS*, Vol. 100 No. 22, Seite 12792-12797.
- Schmidt, W. ; Henkel, F.W. (1995): *Pfeilgiftfrösche im Terrarium*. Hannover: Landbuch-Verlag.
- Schulte, R. (1999b): *Pfeilgiftfrösche "Artenteil - Peru"*, Nikola-Verlag, Stuttgart
- Silverstone, P.A. (1976): A revision of the poison arrow frogs of the genus *Phyllobates Bibron* in Sagra (Family *Dendrobatidae*). *Natural History Museum of Los Angeles County Science Bull.* 27: 1-53.
- Spande, T.; Garraffo, H.; Edwards, M.; Yeh, H.; Pannell, L.; Daly, J. (1992): Epibatidine: A Novel (Chloropyridyl) azabicycloheptane with Potent Analgesic Activity from an Ecuadoran Poison Frog. *Journal of the American Chemical*.
- United Nations (1992): *CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY*; Quelle: <<https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-en.pdf>>, Stand 23.01.2015
- Vences, M.; Kosuch, J.; Lötters, S.; Widmer, A.; Jungfer, K.H.; Köhler, J.; Veith, M. (2000): Phylogeny and Classification of Poison Frogs (Amphibia: Dendrobatidae), Based on Mitochondrial 16S and 12S Ribosomal RNA Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 15, No. 1 April, Seite 34-40.
- Verkade, J.; Verkade, J.: *Epipedobates anthonyi*. *DN magazine* 2011; 2, 2011.
- Zimmermann, H.; Zimmermann, E. (1988): Etho-Taxonomie und zoogeographische Artengruppenbildung bei Pfeilgiftfröschen (Anura: *Dendrobatidae*).- *Salamandra*, 24 (2/3):125-160.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Internet-Quellen – benutzt habe und die Arbeit von mir vorher nicht in einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium (CD-ROM).

Frankweiler, den 27.01.2015

Ort, Datum



Unterschrift

Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei allen Personen, die mir während dieser Arbeit geholfen haben, diese durch einen anderen Blickwinkel betrachten zu können und somit durch ihr Feedback und ihre Ratschläge diese Arbeit verbesserten. Auch möchte ich mich bei allen Personen im Genetiklabor Geilweilerhof bedanken für ihre Hilfe, praktischen Tipps und Kooperation.

Ich danke allen Kooperationspartner zur Bereitstellung der Proben:

Berkshire College, Lakeland Wildlife Oasis Hale, Sparsholt College Hampshire, Tiergarten Nürnberg, Tiergarten Ulm, Tierpark Chemnitz, Tierpark Emmen, Tierpark Stralsund, Zoo Antwerpen, Zoo Dortmund, Zoo Landau, Zoo Poznań, Zoo Riga, Zoo Salzburg, Zoo Thoiry, Zoo Vivarium Darmstadt, Zoologischer Garten Hof, Zoologischer Garten Stuttgart, Züchter aus Leverkusen, Züchter aus Schwerte, Züchter aus Witten und der Züchterin aus Malsch

Ganz besonders möchte mich bei Frau Dr. Anne Schrimpf, Frau Dr. Kathrin Theissing-Theobald, sowie Herrn Dr. Tim Schikora bedanken für die Möglichkeit, diese Arbeit durchzuführen und ebenso für die gute Unterstützung in allen Stadien der Arbeit.

Ein spezieller Dank geht an Herrn Dr. Juan Carlos Santos für die Weitergabe seines detaillierten Wissens über Pfeilgiftfrösche. Seine spezifischen Informationen über *E. tricolor* und *E. anthonyi*, sowie seine bereitgestellte Literatur waren unerlässlich für diese Arbeit.

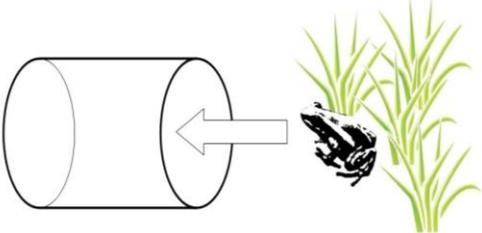
Ebenso danke ich meinem Laborpartner und Freund Jan-Christopher Fischer für die Zusammenarbeit im Genetiklabor. Ohne seine Hilfe, gute Laune und die Bereitschaft immer weiterzumachen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern für die Unterstützung und Geduld während meines kompletten Studiums und speziell bei dieser Arbeit.

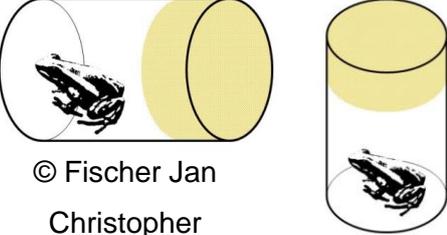
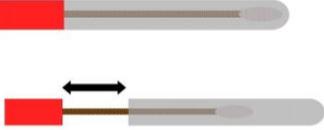
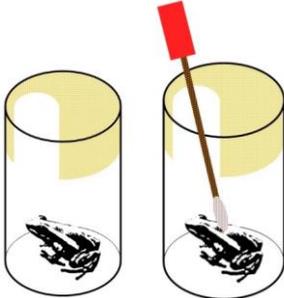
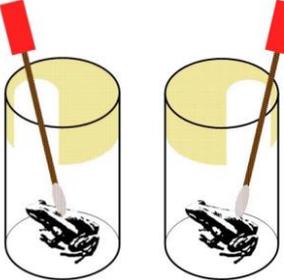
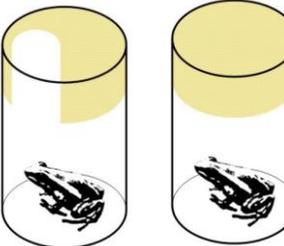
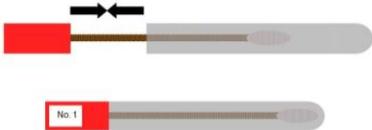
Anhang 1

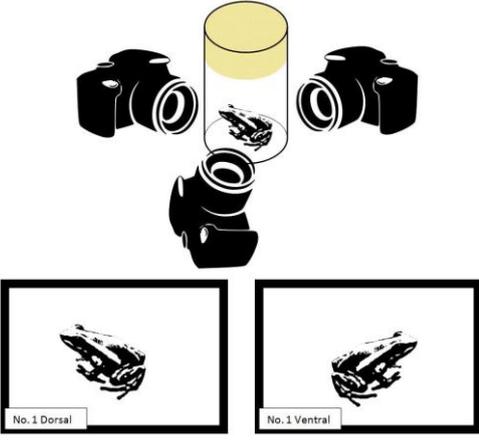
Probenahmeanleitung:

Die Probennahme war wie folgt durchzuführen:

Der/die Probennehmer/in ziehen neue, sterile Einweghandschuhe zur Vermeidung von Kontaminationen, durch menschliche und tierische DNA, bei jeder einzelnen Probennahme der Tiere, an. Jedes Probeindividuum wird in einem kleinen, sauberen und transparenten Probecontainer separiert. Der Probecontainer wird mit einem schaumstoffartigen Deckel verschlossen. Zur Probennahme wird der Deckel vorsichtig zur Seite gedrückt und mit dem sterilen und bereitgestellten Wattestäbchen der Hautabstrich genommen, ohne dabei mit dem Stäbchen den Deckel oder den Container zu berühren. Um eine ausreichende Menge an DNA Material zu gewinnen, wird das Tier an den Beinen, an der Kloake, bauch- und rückenseitig vorsichtig abgestrichen. Nach dem vorsichtigen Herausziehen des Probestäbchens wird dieses wieder mit der originalen Verpackung verschlossen und beschriftet. Bis zum Verschicken der Proben sollten diese kühl, trocken und unter Lichtabschluss in einem Kühlschrank gelagert werden.

Work step	Sample drawing instruction	Illustrated instruction
1.	Put on sterile examination gloves (change after each specimen sample drawing)	 <p>© Bodenseh Philipp</p>
2.	Separate each individual into a small and transparent sample container (easier sample drawing)	 <p>© Fischer Jan-Christopher</p>

<p>3.</p>	<p>Trap/Close the sampling container with a foam material plug</p>	 <p>© Fischer Jan Christopher</p>
<p>4.</p>	<p>Open and take the sterile sampling swab (provided)</p>	 <p>© Bodenseh Philipp</p>
<p>5.</p>	<p>Carefully put the plug partially aside and insert the sampling swab (without touching anything)</p>	 <p>© Fischer Jan-Christopher</p>
<p>6.</p>	<p>Intensive but gentle wiping of the frog (dorsum, ventral, legs and anus) with the sampling swab (use for each frog a new sampling swab)</p>	 <p>© Fischer Jan-Christopher</p>
<p>7.</p>	<p>Carefully remove the sampling swab (without touching the plug or the container)</p>	 <p>© Fischer Jan-Christopher</p>
<p>8.</p>	<p>Seal the sampling swab with the original wrapper and label it</p>	 <p>© Bodenseh Philipp</p>

<p>9.</p>	<p>If possible shoot photos of the dorsal and the ventral side of each individual (photos should have the same labeling as the sampling swabs for each individual)</p>	 <p>© Fischer Jan-Christopher</p>
<p>10.</p>	<p>Until the shipping store the sampling swabs in the fridge (cool, dry and out of light exposure)</p>	 <p>© Bodenseh Philipp</p>

Anhang 2

Tabelle 7: Ergebnistabelle der Artbestimmung. Bei den angegebenen Referenzen (vgl. Abb.1 und Fischer 2015) handelt es sich um NCBI Genbank Codes. Es werden nur Primerpaare (Tab. 5) aufgeführt mit deren Hilfe erfolgreich DNA-Fragmente der Probe vervielfältigt werden konnte.

Herkunft	Abkürzung	Tierart	Referenz	Übereinstimmung [%]	Primer- paar
Berkshire College	BCA01	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,0	2
		<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,9	3
	BCA02	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,9	3
		<i>E. anthonyi</i>	HQ290995	99,7	3
	BCA03	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	98,1	2
		<i>E. anthonyi</i>	AY364576	98,1	2
	BCA04	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	98,1	2
		<i>E. anthonyi</i>	AY364576	98,1	2
	BCA05	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,7	2
		<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,9	3
	BCA06	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	98,1	2
		<i>E. anthonyi</i>	AY364576	98,1	2
Lakeland	CWO01		Kein Ergebnis		
Wildlife	CWO02		Kein Ergebnis		
Oasis Hale	CWO03		Kein Ergebnis		
	CWO04		Kein Ergebnis		
	CWO05	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,7	2
		<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,9	3
	CWO06	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	98,1	2
			AY364576	98,1	

Sparsholt	SPA01				Kein Ergebnis
College	SPA02				Kein Ergebnis
Hampshire	SPA03				Kein Ergebnis
	SPA04				Kein Ergebnis
	SPA05				Kein Ergebnis
	SPA06				Kein Ergebnis
	SPA07				Kein Ergebnis
	SPA08				Kein Ergebnis
	SPA09				Kein Ergebnis
Tiergarten	TGN01				Kein Ergebnis
Nürnberg	TGN02				Kein Ergebnis
Tiergarten	ULM01	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,5	1
Ulm		<i>E. anthonyi</i>	HQ290995	99,3	1
		ULM02			
Tierpark	TPC01A/B				Kein Ergebnis
Chemnitz	TPC02				Kein Ergebnis
	TPC10	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	98,9	2
		<i>E. anthonyi</i>	AY364576	98,9	2
Tierpark	EMM01				Kein Ergebnis
Emmen	EMM02				Kein Ergebnis
	EMM03				Kein Ergebnis
	EMM04	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,9	2
		<i>E. anthonyi</i>	AY364576	99,9	2
Tierpark	TPS01				Kein Ergebnis
Stralsund	TPS02	<i>H. Sapiens</i>			Kontaminiert
	TPS03				Kein Ergebnis
Zoo	ANT01	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	98,1	2
Antwerpen		<i>E. anthonyi</i>	AY364576	98,1	2

Anhang 2

Zoo Antwerpen	ANT02			Kein Ergebnis		
Zoo Dortmund	DO01	<i>H. Sapiens</i>		Kontaminiert		
	DO02	<i>H. Sapiens</i>		Kontaminiert		
	DO03	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,9	2	
Zoo Landau	LD1A/1B	<i>H. Sapiens</i>		Kontaminiert		
	LD2A/2B	<i>H. Sapiens</i>		Kontaminiert		
	LD3A/3B	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	98,0	2	
		<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,9	3	
		<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,9	1	
	LD4A/4B			Kein Ergebnis		
Zoo Poznań	POZ01	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,9	2	
		<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,9	3	
	POZ02	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,9	2	
		<i>E. anthonyi</i>	AY364576	97,9	2	
	POZ03	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	98,1	2	
		<i>E. anthonyi</i>	AY364576	98,1	2	
	POZ04	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,9	2	
		<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,9	3	
	POZ05	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,7	2	
		<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,9	3	
	Zoo Riga	RIG01			Kein Ergebnis	
		RIG02			Kein Ergebnis	
		RIG03	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	98,1	2

Anhang 2

Zoo Riga	RIG03	<i>E. anthonyi</i>	AY364576	98,1	2
	RIG04			Kein Ergebnis	
	RIG05			Kein Ergebnis	
Zoo Salzburg	ZSBG01	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,8	2
		<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,9	1
	ZSBG02	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	98,1	2
		<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,8	1
	ZSBG03	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,8	2
		<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,8	1
	ZSBG04	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,7	2
		<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,8	1
	ZSBG05	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,9	2
		<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,9	1
	ZSBG06	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	98,2	2
		<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,9	1
Zoo Thoiry	THO01			Kein Ergebnis	
	THO02			Kein Ergebnis	
	THO03			Kein Ergebnis	
	THO04			Kein Ergebnis	
	THO05			Kein Ergebnis	
	THO06			Kein Ergebnis	
Zoo Vivarium Darmstadt	ZVD01			Kein Ergebnis	
	ZVD02			Kein Ergebnis	
	ZVD03	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,0	2
		<i>E. anthonyi</i>	AY364576	99,0	2
	ZVD04	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,1	2
		<i>E. anthonyi</i>	AY364576	97,1	2

Anhang 2

Zoo	ZVD05			Kein Ergebnis	
Vivarium	ZVD06	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,7	2
Darmstadt		<i>E. anthonyi</i>	AY364576	97,7	2
	ZVD07	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	95,8	2
		<i>E. anthonyi</i>	AY364576	95,8	2
	ZVD08	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,9	2
		<i>E. anthonyi</i>	AY364576	99,9	2
Zoologischer Garten Hof	ZHO01	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,8	1
		<i>E. anthonyi</i>	HQ290995	99,7	1
	ZHO02	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,7	1
		<i>E. anthonyi</i>	HQ290995	99,7	1
	ZHO03	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,8	1
		<i>E. anthonyi</i>	HQ290995	99,7	1
	ZHO04	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,8	1
		<i>E. anthonyi</i>	HQ290995	99,7	1
	ZHO05	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,8	1
		<i>E. anthonyi</i>	HQ290995	99,7	1
	ZHO06			Kein Ergebnis	
Zoologischer Garten Stuttgart	Wil01	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,4	1
		<i>E. anthonyi</i>	HQ290995	99,2	1
	Wil02			Kein Ergebnis	
	Wil03			Kein Ergebnis	
	Wil04			Kein Ergebnis	
	Wil05			Kein Ergebnis	
	Wil06			Kein Ergebnis	
Züchter aus Leverkusen	E.t.N	<i>E. tricolor</i>	HQ291001	99,8	2
	E.t.N	<i>E. tricolor</i>	HQ291001	100,0	4

Anhang 2

Züchter aus Leverkusen	E.t.N	<i>E. tricolor</i>	HQ291001	100,0	1
Züchter aus Schwerte	SWT01	<i>E. anthonyi</i>	AY364576	98,1	2
		<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,1	2
	SWT02	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,8	3
		<i>E. anthonyi</i>	HQ290995	99,7	3
	SWT03	<i>E. tricolor</i>	HQ291001	100,0	2-4
		<i>E. tricolor</i>	EU342577	100,0	2-4
		<i>E. tricolor</i>	EU342578	99,9	2-4
	SWT04	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,6	2
		<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,9	3
Züchter aus Witten	WIT01	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	97,6	2
		<i>E. anthonyi</i>	AY364576	97,6	2
	WIT02		Kein Ergebnis		
	WIT03		Kein Ergebnis		
Züchterin aus Malsch	Gew. Zeilfelder	<i>E. anthonyi</i>	EU342574	99,9	1
		<i>E. anthonyi</i>	HQ290995	99,7	1

Anhang 3

Abbildungen *E. anthonyi* Morph Nr. 1 dorsal und ventral:



Abbildung 12: *E. anthonyi* Morph Nr. 1 (dorsal). Es handelt sich um das Probestier SWT01 in der dorsalen Ansicht. © Tim Schikora



Abbildung 13: *E. anthonyi* Morph Nr. 1 (ventral). Es handelt sich um das Probestier SWT01 in der ventralen Ansicht. © Tim Schikora

Anhang 4

Abbildungen *E. anthonyi* Morph Nr. 2 dorsal und ventral:



Abbildung 14: *E. anthonyi* Morph Nr. 2 (dorsal). Es handelt sich um das Probestier SWT02 in der dorsalen Ansicht. © Tim Schikora

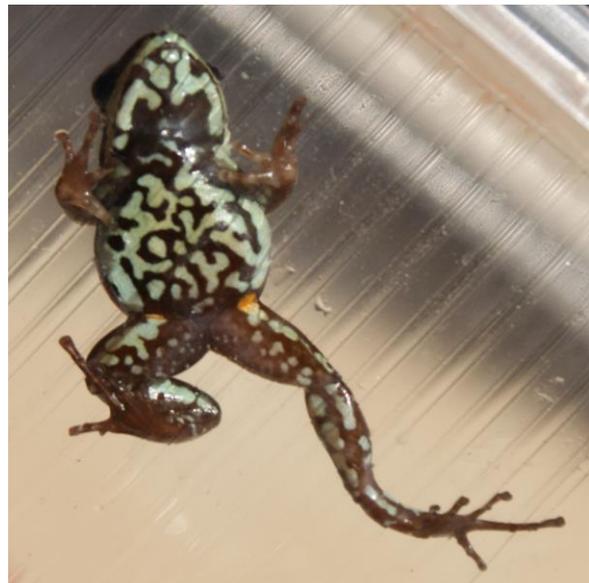


Abbildung 15: *E. anthonyi* Morph Nr. 2 (ventral). Es handelt sich um das Probestier SWT02 in der ventralen Ansicht. © Tim Schikora

Anhang 5

Abbildungen *E. anthonyi* Morph Nr. 3 dorsal und ventral:



Abbildung 16: *E. anthonyi* Morph Nr. 3 (dorsal). Es handelt sich um das Proben-tier SWT04 in der dorsalen Ansicht. © Tim Schikora



Abbildung 17: *E. anthonyi* Morph Nr. 3 (ventral). Es handelt sich um das Proben-tier SWT04 in der ventralen Ansicht. © Tim Schikora