

Lehrstuhl für Genetik

Molekulare Phylogenie der Halbaffen, Schlankaffen und Gibbons

Christian Roos

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. Grill

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl
2. Univ.-Prof. Dr. P. M. Kappeler, Georg-August-Universität Göttingen
3. Priv.-Doz. Dr. R. A. Tórres Ruiz

Die Dissertation wurde am 17.06.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 09.10.2003 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Allgemeine Einführung	1
1.1. Die Ordnung der Primaten	1
1.2. Molekulare Phylogenie	3
1.3. Sequenzanalyse mitochondrialer DNA-Abschnitte	5
1.4. Transpositionereignisse als molekular-kladistische Marker	7
1.5. Ziele	9
2. Methoden	11
2.1. DNA-Extraktion	11
2.2. Analyse mitochondrialer DNA	11
2.2.1. Amplifikation von mitochondrialen DNA-Fragmenten	11
2.2.2. Gelelektrophorese und Aufreinigung von DNA aus dem Gel.....	13
2.2.3. Ligation und Klonierung von PCR-Produkten.....	13
2.2.4. Sequenzierung	14
2.2.5. Alignierung, statistische Auswertung und Stammbaumrekonstruktion.....	14
2.3. Analyse von SINE-Integrationen	16
2.3.1. Datenbank-Suchstrategien	16
2.3.2. Southern-Blot- und Hybridisierungstechniken	16
2.3.3. Konstruktion genomischer Banken und deren Weiterbearbeitung.....	18
2.3.4. Spezies-übergreifende SINE-PCRs	18
2.3.5. Weiterbearbeitung und Auswertung von SINE-PCRs.....	20
3. Kapitel 1: Molekulare Phylogenie der Halbaffen (Strepsirrhini)	21
3.1. Einleitung	21
3.2. Material und Methoden	24
3.3. Ergebnisse	25
3.3.1. Sequenzanalyse des mitochondrialen Cytochrom b Gens.....	25
3.3.2. SINE-Transpositionen als molekular-kladistische Marker.....	33
3.3.3. Berechnung von Aufspaltungszeiten.....	40
3.4. Diskussion	42
3.5. Zusammenfassung	53

4. Kapitel 2: Molekulare Phylogenie der Schlankaffen (Colobinae).....	54
4.1. Einleitung	54
4.2. Material und Methoden	56
4.3. Ergebnisse	57
4.3.1. Sequenzanalyse mitochondrialer DNA-Abschnitte	57
4.3.2. Berechnung von Aufspaltungszeiten.....	62
4.4. Diskussion.....	63
4.5. Zusammenfassung	67
5. Kapitel 3: Molekulare Phylogenie der Gibbons (Hylobatidae)	68
5.1. Einleitung	68
5.2. Material und Methoden	70
5.3. Ergebnisse	71
5.3.1. Sequenzanalyse des mitochondrialen Cytochrom b Gens.....	71
5.3.2. Berechnung von Aufspaltungszeiten.....	75
5.4. Diskussion.....	77
5.5. Zusammenfassung	81
6. Allgemeine Diskussion.....	83
7. Allgemeine Zusammenfassung	91
8. Literatur	95
9. Danksagung	109
10. Anhang.....	110
11. Curriculum vitae	115

1. Allgemeine Einführung

1.1. Die Ordnung der Primaten

Die Ordnung der Primaten stellt eine der erfolgreichsten und formenreichsten Säugetierordnungen dar. Derzeit werden etwa 230 (Rowe, 1996) bis 350 (Geissmann, 2002a) Arten anerkannt, wobei die Entdeckung weiterer Arten noch nicht abgeschlossen sein dürfte. Dies liegt vor allem an der wissenschaftlichen Erschließung weiterer, bislang unberührter Gebiete und einer zunehmenden Zahl an Freilandstudien. Zudem ist durch den routinemäßigen Einsatz von molekulargenetischen Methoden ein wichtiges Hilfsmittel zur Erfassung genetischer Diversität hinzugekommen. Prinzipiell läßt sich ein klarer Trend in der Primaten-Systematik erkennen: die Diversität kleinerer und nachtaktiver Formen wurde bisher meist unter-, die größerer und tagaktiver Formen jedoch eher überschätzt (Castresana, 2001). Die gesamte Artenvielfalt an rezenten Primaten wird aber wohl niemals vollständig geklärt werden können, da aufgrund von Habitatzerstörung und Wilderei heute viele Primatenformen am Rande der Ausrottung stehen.

Die Definition von Primaten und ihre Abtrennung von anderen Säugetierordnungen auf Basis synapomorpher Merkmale ist schwierig und komplex. Die meisten angeführten Merkmale sind ursprünglicher Natur und lassen sich auch bei anderen Säugetierordnungen finden. So besitzen Primaten zum Beispiel einen freihängenden Penis, einen wohlausgebildeten Blinddarm, ein Gebiß mit drei verschiedenen Zahntypen, einen Fuß mit greiffähigem Großzehen - besetzt (zumindest dieser) mit flachem Nagel statt einer Krallen, sowie ein vergrößertes Gehirn. Weiterhin zeichnen sich Primaten durch eine verkürzte Schnauze und eine damit verbundene Reduktion des Geruchssinnes aus. Im Gegenzug entwickelte sich das visuelle System zu einem binokularem Sehorgan weiter. Prinzipiell können aber nahezu alle diese Merkmale auch bei anderen Säugetierordnungen vorgefunden werden und somit stellt die Definition der Ordnung der Primaten eher einen Trend und keine klare Abtrennung von anderen Ordnungen dar (Geissmann, 2002a). Etwas einfacher erscheint die Definition mit Hilfe von genetischen Merkmalen. So gibt es eine spezielle Gruppe von kurzen interspergierten Elementen (SINEs), sogenannte Alus, die

ausschließlich in Primaten vorkommen und sich im menschlichem Genom in einer Kopienzahl von mehr als einer Million nachweisen lassen (Li et al., 2001).

Da die meisten angeführten Merkmale die Weichgewebe-Anatomie betreffen und daher auch nicht fossilieren, ist die Einstufung von fragmentarischen Fossilfunden problematisch und somit sind viele Fragen bezüglich des Ursprungs der Primaten ungeklärt. Zudem wird vermutet, daß erst etwa 7% aller ausgestorbenen Primatenarten von Fossilfunden her bekannt sind. Mit Hilfe von statistischen Methoden und Miteinbeziehung von Fossilfunden wurde der jüngste gemeinsame Vorfahr der Primaten kürzlich auf ein Alter von 81,5 Millionen Jahren geschätzt (Tavaré et al., 2002), deutlich älter als bisherige Fossilfunde (*Purgatorius* aus Nordamerika, etwa 65 Millionen Jahre) es vermuten lassen (Shoshani et al., 1996).

Innerhalb der Ordnung der Primaten besteht jedoch überwiegend Einigkeit über die Einteilung und phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen der Hauptgruppen (Geissmann, 2002a; Groves, 2001). Demnach werden Primaten in zwei Unterordnungen, die Feuchtnasen- oder Halbaffen (Strepsirrhini) und Trockennasaffen (Haplorrhini) unterteilt. Die Strepsirrhini stellen die ursprünglichere Gruppe der Primaten dar und zeichnen sich durch einige Merkmale aus, die sie mit anderen Säugerordnungen, jedoch nicht mit den Haplorrhini teilen. So zum Beispiel besitzen Halbaffen im Gegensatz zu Haplorrhini keine Orbitahöhle, sondern nur einen Orbitaring, eine feuchte Nase, ähnlich einer Hundeschnauze, mindestens vier Brustwarzen und - falls nicht sekundär reduziert - ein reflektierendes Tapetum lucidum. Halbaffen werden weiterhin in drei Infraordnungen unterteilt, wobei die Lemuriformes und Chiromyiformes auf Madagaskar und die Loriformes in Asien und Afrika beheimatet sind. Aus evolutionsgeschichtlicher und biogeographischer Sicht sind hier einige Fragen besonders interessant, wie die nach der Besiedelungsgeschichte Madagaskars, sowie den phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Loriformes und der damit verbundenen Besiedelung der Kontinente Afrika und Asien. Die Haplorrhini dagegen umfassen die nachtaktiven Koboldmakis (Tarsiiformes) Süd-Ost-Asiens und die höheren Primaten (Anthropoidea). Die phylogenetische Position der Koboldmakis war aufgrund ihrer Zwischenstellung zwischen Halbaffen und höheren Primaten lange Zeit ungeklärt, konnte aber über retropositionelle Evidenz definitiv geklärt werden

(Schmitz et al., 2001). Die Anthropeida spalten sich weiterhin in die in Süd- und Zentralamerika beheimateten Breitnasenaffen (Platyrrhini) und die in Asien und Afrika lebenden Schmalnasenaffen (Catarrhini) auf. Platyrrhini sind ausschließlich arboreale Waldbewohner und werden in mehrere Familien und Gattungen unterteilt, deren phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen erst mit Hilfe molekularer Methoden in den letzten Jahren ansatzweise geklärt werden konnten (Canavez et al., 1999; Schneider et al., 1993, 1996; Singer et al., 2003; von Dornum & Ruvolo, 1999). Bei den Catarrhini unterscheidet man dagegen zwischen geschwänzten (Cercopithecoidea) und ungeschwänzten (Hominoidea) Formen. Die Cercopithecoidea untergliedert man zusätzlich in die Schlankaffen (Colobinae) und Meerkatzenartigen (Cercopithecinae), wobei beide Unterfamilien besonders formenreiche Gruppen darstellen und über weite Teile Afrikas und Asiens verbreitet sind. Der Hauptunterschied zwischen beiden Unterfamilien liegt in ihrer Ernährungsweise und den davon abgeleiteten anatomischen Anpassungen. In Bezug auf die Colobinae-Evolution stellt sich besonders die Frage nach der jeweiligen Monophylie von afrikanischen und asiatischen Vertretern. Die Menschenaffen (Hominoidea) schließlich werden in Gibbons oder kleine Menschenaffen (Hylobatidae) und große Menschenaffen (Hominidae) unterteilt. Gibbons sind über weite Teile Asiens verbreitet und sind besonders durch ihren Duettgesang bekannt. Besonderes Interesse innerhalb der Gibbon-Evolution besteht in der Aufklärung der Abspaltungsfolge der vier (Unter-)gattungen und der Anzahl an Arten. Die Familie der Hominidae vereinigt schließlich alle großen Menschenaffen (Orang-Utan, Gorilla, Schimpanse, Bonobo) und den Mensch, wobei molekulare Daten meist eine Schwestergruppenbeziehung von Mensch und *Pan* (Schimpanse, Bonobo) andeuten.

1.2. Molekulare Phylogenie

Obwohl die molekulare Phylogenie als wichtigen Hauptzweig die Klärung von evolutionären Verwandtschaftsbeziehungen zum Ziel hat, dient das dabei erstellte Gerüst auch als Basis für die Erforschung evolutionärer Mechanismen. Durch die stetig wachsende Zahl von Sequenzinformation von Mensch und anderen Organismen können Veränderungen auf DNA-

Ebene vollständig ermittelt und deren Auswirkungen auf das Transkriptom und Proteom, wie alternatives Splicing, RNA-Editing oder posttranskriptionelle Modifikationen untersucht werden. Eine klar belegte Phylogenie in Kombination mit der Aufklärung dieser Prozesse wird somit auch Aufschluß über die Entstehung von zum Beispiel unterschiedlichen Phänotypen, Arten oder Sozialsystemen und, in Bezug auf den Menschen, von Krankheiten geben.

Über Jahrhunderte haben Wissenschaftler versucht, die Vielfalt der Natur zu erklären und zu beschreiben. Dieser Wissenschaftszweig wird als Systematik oder vergleichende Biologie bezeichnet. Ein Hauptziel dieser Disziplin ist die Erfassung und Beschreibung der Artenvielfalt, sowie deren Eingliederung in ein natürliches hierarchisches System. Ein grundlegendes Fundament hierfür hat Linnaeus bereits 1758 mit seiner *Systema Naturae* gelegt.

Zur Klärung von Verwandtschaftsverhältnissen und zur Eingruppierung von Taxa dienen –abhängig von der zugrunde gelegten Philosophie- Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den zu untersuchenden Taxa. In der phylogenetischen Systematik werden für diesen Zweck überwiegend gemeinsam abgeleitete (synapomorphe) Merkmale verwendet, während gemeinsame, ursprüngliche (symplesiomorphe) Merkmale nur von geringer oder keiner Bedeutung sind. Dieses Konzept der auf einen gemeinsamen Ursprung basierenden Einteilung wurde erstmals von Hennig (1950) für die Analyse von morphologischen Merkmalen formuliert. Obwohl dieses kladistische Konzept in erster Linie die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen widerspiegelt, dient es heute auch überwiegend als Grundlage für die Taxonomie (Avice & Johns, 1999; Groves, 2001; Hillis et al., 1996; Li & Graur, 1991).

Während morphologische und ethologische Merkmale seit dem Entstehen der Evolutionstheorie untersucht wurden, ist die Analyse molekularer Merkmale für systematische Fragestellungen in großem Maßstab erst in den letzten drei Jahrzehnten durch die Entwicklung geeigneter Techniken ermöglicht worden, wobei die ursprünglich verwendeten Protein- und Chromosomen-Studien heute meist durch vergleichende Analysen von DNA-Sequenzen ersetzt werden.

1.3. Sequenzanalyse mitochondrialer DNA-Abschnitte

Aufgrund der Fortschritte in der Molekularbiologie in vergangenen Jahrzehnten wurde auch die Arbeit in der vergleichenden Biologie deutlich vereinfacht. Speziell durch die Entwicklung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und den verbesserten Verfahren zur Direktsequenzierung wurden die Möglichkeiten auf diesem Gebiet revolutioniert.

Prinzipiell sind DNA-Sequenzen sehr gut zur Klärung systematischer Fragen geeignet, da diese aus zahlreichen, homologisierbaren Positionen bestehen. Jede Position stellt dabei ein eigenes Merkmal dar, das in konkreten Merkmalszuständen, den vier Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin vorliegt. Die Anzahl der analysierbaren Merkmale ist theoretisch nur durch die Genomgröße beschränkt. Somit ist es nachvollziehbar, daß die vergleichende Analyse von Sequenzdaten heute zur bevorzugten Methode in der Phylogenie geworden ist (Awise & Johns, 1999; Hillis et al., 1996; Li & Graur, 1991).

Analysen von mitochondrialen Sequenzabschnitten erwiesen sich in den letzten Jahrzehnten als hilfreiches Mittel zur Klärung phylogenetischer Fragestellungen und wurden aufgrund einiger Vorteile nukleären Datensätzen vorgezogen. Das ringförmige mitochondriale Genom der Säuger ist im Gegensatz zum nukleären Genom klein (etwa 16,600 bp) und kompakt gebaut. Es wird ausschließlich maternal vererbt und ist vermutlich frei von Rekombinationen (Cann et al., 1987). Das mitochondriale Molekül kodiert für dreizehn Proteine, die als Enzym-Untereinheiten der Atmungskette fungieren, 22 Transfer-RNAs (tRNA), sowie zwei ribosomale RNAs (rRNA). Zusätzlich enthält das mtGenom eine Kontrollregion, welche die Replikation und Transkription reguliert. Da die mitochondriale DNA – über das ganze Genom gemittelt - etwa 5-10 mal schneller evolviert als nukleäre DNA (Brown et al., 1982), kommt sie daher besonders bei der Analyse nah verwandter Taxa zum Einsatz. Ein weiterer Vorteil von Mitochondrien ist ihre hohe Kopienzahl pro Zelle (bei Säugern etwa 2000 mtGenome) (Cann et al., 1987), was speziell bei der Untersuchung von nicht-invasiv gewonnenem Probenmaterial von Nutzen ist. Problematisch bei phylogenetischen Rekonstruktionen jedoch sind mitochondriale Kernintegrationen, die im nukleären Genom als funktionslose Pseudogene vorliegen (Collura &

Stewart, 1995; Mourier et al., 2001; Zischler et al., 1995) und somit leicht zur „Kontamination“ mitochondrialer Datensätze führen können.

Aufgrund der hohen Evolutionsrate und einer damit verbundenen frühen Sättigung des Datensatzes, stark schwankenden Veränderungen der Basenzusammensetzung und einer Ungleichverteilung der evolutionären Raten über die Positionen (Gamma-Verteilung), ist mitochondriale DNA aber weniger zur Analyse tieferer Verzweigungen geeignet. Beispiel hierfür ist die falsche Positionierung der Koboldmakis und Pelzflatterer (Dermoptera) anhand von mitochondrialen Sequenzdaten. Basierend auf Transpositionseignissen ist die Schwestergruppenbeziehung von Koboldmakis und Anthropeida (Schmitz et al., 2001) sowie die Abtrennung der Pelzflatterer von den Primaten klar belegt (Schmitz et al., 2002a). Bei der Analyse von mitochondrialen Daten jedoch bildet der Koboldmaki eine Gruppe zusammen mit Halbaffen (Murphy et al., 2001; Schmitz et al., 2001b) bzw. ist vollständig aus der Ordnung der Primaten ausgegliedert (Arnason et al., 2002), wogegen Pelzflatterer immer die Schwestergruppe zu den Anthropeida darstellen (Arnason et al., 2002; Murphy et al., 2001; Schmitz et al., 2002a).

Ein weiterer Nachteil von Sequenz-basierten Phylogenien ist die notwendige mathematische Korrektur, da die beobachteten Differenzen nicht mit den evolutionären Distanzen übereinstimmen. Des weiteren ist die Merkmalspolarität ausschließlich von der gewählten Außengruppe abhängig und mögliche Unterschiede in Gen-, Positions- oder Linien-spezifischen Raten müssen mathematisch korrigiert werden. Im Laufe der vergangenen Jahrzehnte wurden deswegen eine Reihe von Algorithmen und Sequenzevolutionsmodelle entwickelt, die die tatsächliche Sequenzevolution reflektieren sollen. Die meist genutzten Algorithmen sind Distanz-Matrix-Methoden (zum Beispiel Neighbor-Joining), Parsimonie und Maximum Likelihood. Das Prinzip von Distanz-Matrix-Methoden ist, ausgehend von einer Distanz-Matrix und einem sternförmigen Baum, Paare von taxonomischen Einheiten zu finden, durch deren Zusammenfassung die Summe der Kantenlängen in jeder Runde des Verfahrens minimiert wird. Unter Berücksichtigung der Kantenlängen wird in jeder weiteren Runde die Anzahl an Gruppen verringert, bis schließlich nur noch drei Gruppen übrig bleiben. Im

Gegensatz hierzu wird bei der Parsimonie-Methode die Mindestzahl an Merkmalsveränderungen gezählt, die für alle möglichen Stammbäume erforderlich sind. Der Baum mit den wenigsten Veränderungen wird schließlich als der wahrscheinlichste angesehen. Die Maximum Likelihood-Methode wählt den Baum mit der maximalen Wahrscheinlichkeit, daß ein beobachteter Datensatz als Funktion des Baumes bei gegebenem Sequenzevolutionsmodell entstanden sein könnte. Die Zuverlässigkeit von phylogenetischen Baumrekonstruktionen kann mit einer Reihe von „Resampling-Methoden“ wie dem Bootstrap-Verfahren überprüft werden. Hierbei werden aus einem Datensatz durch zufälliges Ziehen und Zurücklegen parallele Datensätze mit gleicher Stichprobengröße erzeugt, wobei manche Positionen häufiger als andere gezogen werden. Bei jedem dieser Schritte wird ein eigener Baum konstruiert, aus denen dann schließlich ein Konsensus-Baum ermittelt wird (Hall, 2001; Hillis et al., 1996).

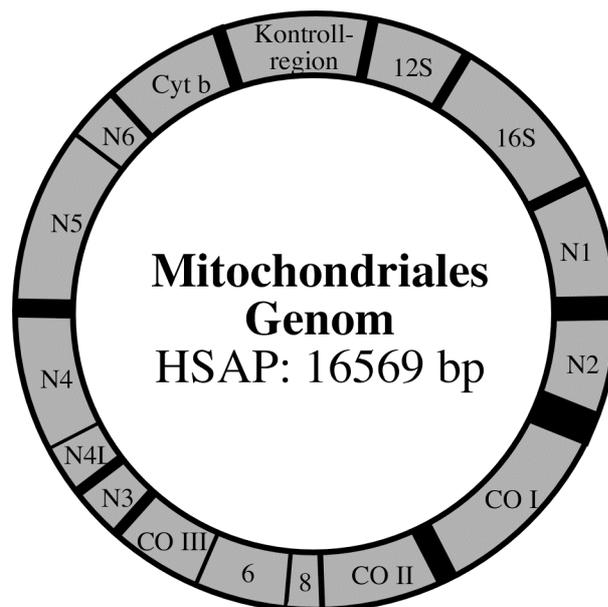


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines mitochondrialen Säugergenoms. Die schwarzen Balken geben die Lage der tRNAs an.

1.4. Transpositionereignisse als molekular-kladistische Marker

Das Primatengenom besteht aus einer Vielzahl von interspergierten repetitiven DNA-Sequenzen, die auf transposable Elemente zurückzuführen sind. Man schätzt, daß etwa 50% des

humanen Genoms aus diesen Elementen besteht (Li et al., 2001). Die Hauptgruppe dieser Sequenzen sind DNA-Transposons, lange terminale Wiederholungen (LTRs), lange interspergierte Elemente (LINEs) und kurze interspergierte Elemente (SINEs). SINEs werden weiter in tRNA und 7SL RNA abgeleitete Elemente unterteilt. Die Primaten-spezifischen Alus (etwa 300-400bp) setzen sich aus zwei 7SL RNAs zusammen, die über eine A/T-reiche Region miteinander verbunden und in einer Kopienzahl von über einer Million im menschlichen Genom nachgewiesen worden sind (Li et al., 2001). Für Galagonidae wurde zusätzlich ein tRNA-Monomer („Galago monomer“) und ein tRNA-7SL RNA-Dimer („Galago type 2 repeat“) beschrieben (Daniels & Deininger, 1985).

Die Replikation von SINEs verläuft konservativ, d.h. eine RNA-Kopie eines SINEs wird mit Hilfe einer RNA-Polymerase III erstellt, wobei das zu kopierende SINE am alten Locus verweilt. Durch eine Reverse Transkriptase wird die RNA-Kopie schließlich in eine cDNA umgeschrieben. An einem neuen Locus wird mit Hilfe einer Endonuklease die doppelsträngige DNA restringiert, wobei überhängende Enden entstehen. Die SINE-cDNA wird eingebaut und die Lücken im Doppelstrang durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt. Durch die überhängenden Enden entstehen auf beiden Seiten der Insertion kurze Abschnitte von Sequenzwiederholungen (etwa 7-25 bp), sogenannte „Direct Repeats“. Da die kurzen SINEs nur interne Promoter-Regionen (A-, B-Box) für die RNA-Polymerase III besitzen, sind sie bei der Transposition auf die Hilfe von Klasse II-Elementen, wie zum Beispiel LINEs angewiesen. Diese stellen die für die Transposition notwendigen Enzyme Reverse Transkriptase und Endonuklease zur Verfügung (Smit, 1996).

Obwohl SINEs mit Präferenz in A/T-reiche Regionen integrieren (Jurka & Klonowski, 1996; Tatout et al., 1998), ist es nahezu ausgeschlossen, daß ein bestimmtes SINE mehrmals unabhängig in unterschiedlichen Evolutionslinien an den exakt selben Locus integriert wird. Zudem konnte bisher kein exaktes Ausschneiden von Klasse I-Retrotransposons beschrieben werden, so daß man von einer stabilen, nicht-revertierbaren Integration ausgeht. Die Merkmalspolarität von SINE-Integrationen ist dadurch einfach zu definieren: Das Element kann als „vorhanden“ und somit als „abgeleiteter Zustand“ oder „nicht vorhanden“ und somit als

„ursprünglicher Zustand“ gewertet werden. SINE-Integrationen entsprechen demnach dem perfekten Bild eines kladistischen Markers nach dem Hennig'schen Prinzip (Hillis, 1999; Miyamoto, 1999).

Problematisch bei der Analyse von SINEs als molekular-kladistische Marker ist jedoch die mögliche Ungleichverteilung von ursprünglich polymorphen Merkmalen in evolutionären Folgelinien („Incomplete Lineage Sorting“). Demnach können ursprüngliche Polymorphismen rein zufällig in einigen Linien fixiert werden, in anderen dagegen verschwinden sie wieder, wodurch eine falsche Phylogenie widerspiegelt wird. Besonders kritisch ist dies bei Radiations-artigen Aufspaltungen (Hillis, 1999; Miyamoto, 1999).

Trotzdem konnten in vergangenen Jahren einige umstrittene Fragen bezüglich der Evolution von Wirbeltieren mit Hilfe von Transpositionereignissen definitiv geklärt werden. Innerhalb der Primaten bezogen sich diese Arbeiten auf die Position des Koboldmakis (Schmitz et al., 2001) und die Phylogenie innerhalb der Platyrrhini (Singer et al., 2003). Weitere Arbeiten befaßten sich mit den phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Cetacea (Nikaido et al., 2001; Shimamura et al., 1997), Cetartiodactyla (Cetacea und Artiodactyla)(Nikaido et al., 1999) sowie Salmoniformes (Murata et al., 1996).

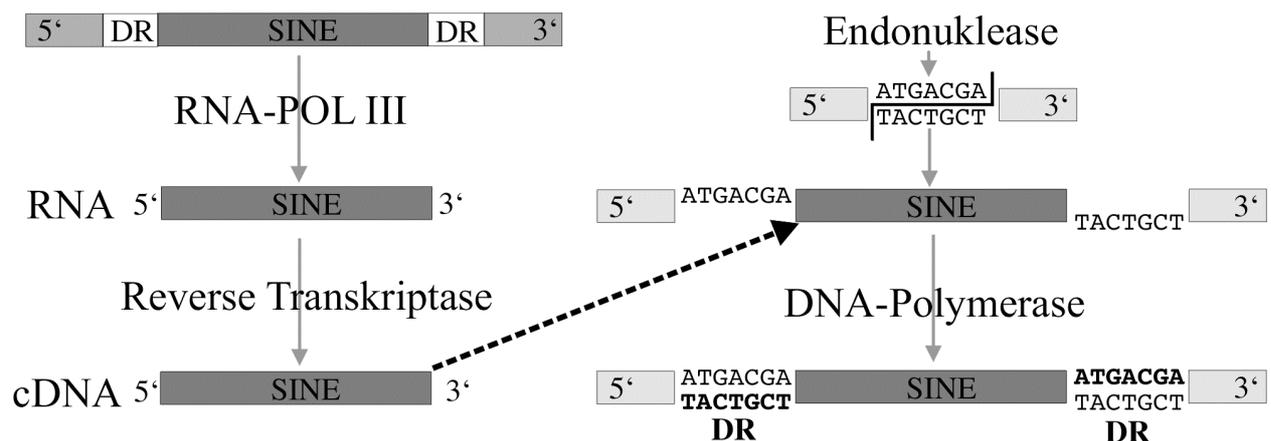


Abbildung 2: Schematischer Ablauf einer SINE-Transposition. „DR“ bezeichnet die „Direct Repeats“.

1.5. Ziele

Als die am nächsten mit uns Menschen verwandten Säuger spiegeln nicht-humane Primaten einen wichtigen Teil auch unserer Evolutionsgeschichte wider. Die Klärung von

2. Methoden

2.1. DNA-Extraktion

Da nur wenige der untersuchten Arten in Zoos gehalten werden und somit qualitativ hochwertiges Material schwer erhältlich ist, mußte für die Extraktion von DNA-Proben eine Reihe unterschiedlicher Ausgangsmaterialien verwendet werden. Für die DNA-Präparation aus Gewebe- (Frisch- sowie Museumsmaterial) und Kotproben wurde der QIAamp DNA Mini Kit bzw. QIAamp DNA Stool Mini Kit von Qiagen verwendet. Größere DNA-Mengen aus Gewebe oder EDTA-Blut wurden nach Standardverfahren extrahiert (Sambrook et al., 1989), wogegen die Präparation von DNA aus Haaren nach einer modifizierten Methode von Walsh et al. (1991) durchgeführt wurde. Dazu wurden die Haare über Nacht bei 50 °C in einer 5%-igen Chelex-100-Resin-Lösung (BioRad) inkubiert und anschließend 5 min. bei 100 °C gekocht.

2.2. Analyse mitochondrialer DNA

2.2.1. Amplifikation von mitochondrialen DNA-Fragmenten

Zur Amplifikation mitochondrialer Fragmente kam eine Reihe unterschiedlicher Primer zum Einsatz (Abb. 4, Tabelle 1). Sofern sich das gewünschte Fragment nicht in einem Stück amplifizieren ließ, zum Beispiel bei Museumsmaterial, wurden überlappende PCR-Produkte gebildet, die anschließend aligniert wurden.

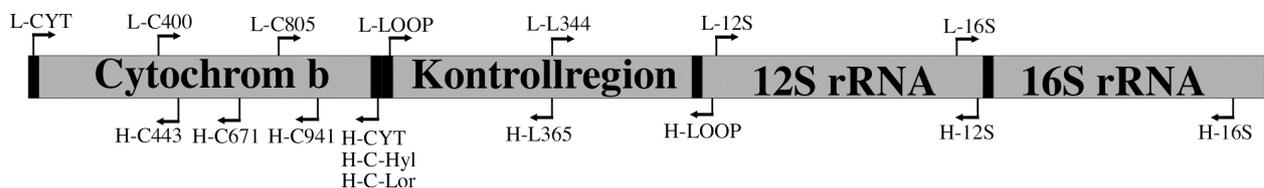


Abbildung 4: Ausschnitt aus dem mitochondrialen Genom. Bei Schlankaffen wurde das gesamte Fragment, bei Gibbons und Halbaffen nur das Cytochrom b sequenziert. Die Pfeile geben die Lage der einzelnen Primer an.

Tabelle 1: Liste der zur Amplifikation mitochondrialer Fragmente verwendeten Primer.

Name	Primer (5'-3')	Temp.	Literatur
L-CYT	AATGATATGAAAAACCATCGTTGTA	64 °C	
L-C400	CCATGAGGACAAATATCATTCTGAGG	74 °C	
L-C805	AAACCAGAATGATATTTCCCTATTTGC	68 °C	
L-LOOP	AAGGCTAGGACCAAACCT	54 °C	Roos & Geissmann, 2001
L-L344	TTTGCCAAACCCCAAAAACAAA	60 °C	
L-12S	AGATTACACATGCAAGCATCC	60 °C	
L-16S	ACACACCGCCCGTCACTC	60 °C	
H-C443	TTTGTGATTACTGTGGCGCC	60 °C	
H-C671	TAGTAGGGGTGGAAGGGGATTTTGTC	78 °C	
H-C941	CTTTGTTGTTTGGATTTGTG	54 °C	
H-CYT	AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAGAC	82 °C	Yoder et al., 1996a
H-C-Hyl	TTCATTTCCGGCTTACAAGAC	60 °C	
H-C-Lor	GTTTAAAGTAGAAGCTTAGCTTTGG	68 °C	
H-L365	TTTGTTTTTGGGGTTTGCAAA	60 °C	
H-LOOP	CCCAAAGTCAAGATTCTAA	52 °C	Roos & Geissmann, 2001
H-12S	CACCTTCCAGTACACTTACC	60 °C	
H-16S	TTTGCCGAGTTCCTTTTACTTT	60 °C	

Um möglichst optimale Amplifikationsergebnisse zu erzielen und ein unspezifisches Hybridisieren der Primer an die Ausgangs-DNA zu verhindern, wurden in dieser Arbeit ausschließlich „Hot-Start“-PCRs durchgeführt, wofür die Primer bis zum ersten Denaturierungsschritt durch eine Wachsschicht von der DNA-Polymerase und der Ausgangs-DNA getrennt waren.

Der Reaktionsansatz setzte sich aus 10 mM Tris, 4 mM HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,1% Triton-X-100, 1,2 mg/ml BSA, je 330 nM Primer, 125 μM dNTPs und 1 U Taq-Polymerase zusammen und wurde in einem Gesamtvolumen von 30 μl durchgeführt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde der Ansatz in einem separaten Raum angesetzt und die DNA (etwa 50 ng) zuletzt in einem weiteren Raum zugegeben. Die Amplifikationen wurden in einem Peltier Thermal 200 Cycler (Biozym) durchgeführt. PCR-Bedingungen variierten je nach Primerwahl und der Größe des zu erwarteten PCR-Produktes. Prinzipiell wurde mit einem 2 min. Denaturierungsschritt bei 92 °C begonnen, danach folgte eine zyklische Phase (35 x) mit 60 s Denaturierung bei 92 °C, 60 s Annealing bei variierenden Temperaturen (siehe Primer-Liste) und

einer 60-90 s Elongation bei 72 °C. Zur Terminierung der PCR-Amplifikation wurde ein 5 min. Elongationsschritt bei 72 °C angefügt.

2.2.2. Gelelektrophorese und Aufreinigung von DNA aus dem Gel

Um die Ergebnisse von PCR-Amplifikationen oder Restriktionsverdau zu überprüfen, wurden entsprechende Proben in einem Agarose-Gel (Seakem LE; Biozym) zusammen mit einem Längenstandard (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, MBI Fermentas) elektrophoretisch aufgetrennt. Die dafür verwendeten Gele waren meist 1%-ig und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte anschließend über ein digitales Bildverarbeitungssystem (Eagle Eye, Stratagene).

Entsprechende PCR- oder Restriktionsverdau-Produkte wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in 6 M NaJ bei 50 °C gelöst. Danach wurde die DNA nach beschriebenen Verfahren (Sambrook et al., 1989) an Silica-Milch gebunden, mit NaJ und 70% EtOH gewaschen und schließlich in H₂O gelöst.

2.2.3. Ligation und Klonierung von PCR-Produkten

Da eine Direktsequenzierung von PCR-Produkten meist eine schlechtere Qualität liefert und Sequenzinformation verloren geht, wurden die Produkte zuerst ligiert und kloniert. Zur Ligation der PCR-Produkte wurde der pGEM T-Vektor (Promega) verwendet. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und danach einer Phenol-Chloroform-Aufreinigung unterzogen (Sambrook et al., 1989). Die Transformation von TOP10-*E.coli*-Zellen erfolgte über Elektroporation mit einem Gene Pulser (BioRad) bei 1,6 kV, 25 µF und 200 Ω. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Platten, versetzt mit Ampicillin, IPTG und X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag konnten aufgrund der Ampicillin-Resistenz und der Blau-Weiß-Selektion entsprechende Klone auf ihre Insertgröße hin untersucht werden. Dazu wurde eine Vektor-PCR unter Standardbedingungen (siehe 2.2.1.) mit den Primern 5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3' und 5'-GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3' bei einer Annealing-Temperatur von 52 °C und für 25 Zyklen durchgeführt. Die Ergebnisse der Amplifikationen

wurden anschließend auf einem Agarose-Gel überprüft. Klone mit der richtigen Insertgröße wurden in einer Übernacht-Kultur in LB-Medium vermehrt und die Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) am folgendem Tag extrahiert.

2.2.4. Sequenzierung

Für die Sequenzierreaktion wurde der Amersham Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Neben den im Vektorbereich liegenden, Fluoreszenz-markierten Primern (IRD800-5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3' und IRD700-5'-AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT-3') wurde dem Sequenzieransatz etwa 200 ng Plasmid-DNA als Ausgangsmaterial zugegeben. Die Sequenzreaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Vordenaturierung bei 95 °C für 2 min., 30 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 95 °C, 40 s Annealing bei 60 °C und 40 s Elongation bei 72 °C.

Die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung der Sequenzierprodukte erfolgte in einem Denaturierungs-Polyacrylamid-Gel nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) auf einem LI-COR 4200-Sequencer. Die Auswertung der Sequenzen erfolgt über die entsprechende LI-COR Software sowie dem Lasergene-Paket von DNASTAR.

2.2.5. Alignierung, statistische Auswertung und Stammbaumrekonstruktion

Die ermittelten Sequenzen wurden mit Hilfe der Computerprogramme SeqPup und ClustalX (Thompson et al., 1997) aligniert und danach manuell editiert. Anschließend wurden Basenzusammensetzungen und paarweise Differenzverteilungen mit PAUP 4.0b10 (Swofford, 1999) ermittelt, sowie die Datensätze auf mögliche Unterschiede in den Linien-spezifischen Evolutionsraten mit dem relativen Ratentest (Programm RRTree, Robinson et al. 1998) überprüft. Da für die phylogenetischen Rekonstruktionen bei Strepsirrhini und Hylobatidae ausschließlich Cytochrom b-Daten verwendet wurden, konnten diese direkt weiterbearbeitet werden. Für die Colobinae wurde ein längeres Fragment analysiert, deren Alignment Insertionen

und Deletionen (Indels) aufweist. Kolumnen mit diesen wurden mit dem Programm Gblocks unter Einsatz unterschiedlich stringenter Einstellungen (Castresana, 2000) entfernt („degapped“).

Phylogenetische Stammbäume wurden mit Hilfe unterschiedlicher Algorithmen und Sequenzevolutionsmodelle rekonstruiert. Für die Maximum Parsimonie-Rekonstruktionen (MP) (Fitch, 1971) wurden die Programme PAUP 4.0b10 und DNAPARS (PHYLIP 3.573c) (Felsenstein, 1993) unter Verwendung von Standardeinstellungen benutzt. Neighbor-Joining-Bäume (NJ) (Saitou & Nei, 1987) wurden ebenfalls mit PAUP und dem PHYLIP-Paket kalkuliert. Für die in PAUP konstruierten Bäume wurde das „General time-reversible“-Modell (GTR), sowie die mit MODELTEST 3.06 (Posada & Crandall, 1998) geschätzten Werte für die Gamma-Verteilung der Raten-Heterogenität variabler Positionen (α) und den Anteil der invariablen Positionen (P_inv) verwendet. Weitere NJ-Bäume wurden mit den Programmen DNADIST und NEIGHBOR aus dem PHYLIP-Paket mit geschätzten Transitions-Transversions-Verhältnissen und der Maximum Likelihood-Distanzkorrektur-Option ermittelt. Phylogenetische Baumrekonstruktionen, basierend auf dem Maximum Likelihood (ML) Algorithmus, wurden mit dem Programm PUZZLE 5.0 (Strimmer & von Haeseler, 1996) unter Verwendung der Sequenzevolutionsmodelle TN (Tamura & Nei, 1993) und HKY (Hasegawa et al., 1985) durchgeführt.

Die Zuverlässigkeit der errechneten NJ- und MP-Baumtopologien wurde mit dem Bootstrap-Verfahren (1000 Replikationen), bzw. der „Quartet puzzling“-Option (1000 bzw. 50000 Puzzling Schritte) für ML-Bäume bestimmt. 50%-Konsensus-Bäume für die in PHYLIP generierten Bäume wurden mit dem Programm CONSENSE ermittelt. Die bildliche Darstellung der Bäume erfolgte schließlich mit dem Programm TreeView.

Um einzelne Aufspaltungszeiten zu bestimmen, wurde für alle ML-Rekonstruktionen getestet, ob die Sequenzen des vorliegenden Datensatzes nach dem Prinzip einer molekularen Uhr evolvieren. Dazu wurden in PUZZLE die Log Likelihoods unter der Annahme und Nicht-Annahme einer molekularen Uhr für vorgegebene Baumtopologien verglichen. Als Ausgangspunkt für sämtliche Datierungen wurden Fossilfunde oder aus genetischen Studien abgeleitete Aufspaltungszeiten als Referenzwerte verwendet (Arnason et al., 1998; Goodman,

1999; Goodman et al., 1998; Martin, 2003; Page & Goodman, 2001; Stewart & Disotell, 1998; Tavaré et al., 2002; Yoder et al., 1996b).

2.3. Analyse von SINE-Integrationen

2.3.1. Datenbank-Suchstrategien

Grundlegende Voraussetzung für die Suche und Analyse von SINE-Integrationen war die offiziell zugängliche Datenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dienten bereits publizierte und in der Datenbank hinterlegte Sequenzdaten von zwei Halbaffen-spezifischen SINE-Elementen. Es handelte sich hierbei um ein tRNA-abgeleitetes Monomer, welches für *Otolemur* und *Galago* beschrieben war (Daniels & Deininger, 1985), sowie um ein Alu-Dimer mit einer Strepsirrhini-spezifischen 2bp-Deletion (Zietkiewicz et al., 1998).

Des Weiteren wurden alle generierten sowie bereits publizierten Sequenzdaten mit dem Repeat Masker (<http://repeatmasker.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>), einem Programm zum Auffinden von repetitiven Elementen, auf die Familienzugehörigkeit der SINE-Integrationen hin überprüft und anschließend die direkten Wiederholungssequenzen manuell ermittelt.

Um Primer in möglichst konservierte Bereiche zu legen, wurde mit NCBI-BLAST und NCBI-BLAST 2 Sequences versucht, orthologe Sequenzabschnitte bei anderen Arten zu finden. War dies nicht möglich, mußten die Primer willkürlich gewählt werden.

2.3.2. Southern-Blot- und Hybridisierungstechniken

Basierend auf den Informationen aus der Datenbank wurden die beiden für Halbaffen beschriebenen Elemente weiteren labortechnischen Untersuchungen unterzogen, wobei zuerst die Repräsentanz der Elemente in weiteren Primatengruppen mit Southern-Blot- und Hybridisierungstechniken überprüft wurde.

Dazu wurde etwa 5 µg genomische DNA von *Galago*, *Otolemur*, *Perodicticus*, *Loris*, *Nycticebus*, *Propithecus*, *Microcebus*, *Lemur*, *Cheirogaleus*, *Daubentonia*, *Callithrix* und

Colobus mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (BioLabs) nach Angaben des Herstellers restringiert, anschließend auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und über Nacht auf eine Hybond-N+ Nylon Transfer Membran (Amersham) nach Standard-Southern-Blot-Techniken übertragen. Anschließend wurde die Membran getrocknet und die DNA mit UV-Licht fixiert (UV-Stratalinker 2400, Stratagene).

Für die nachfolgende Hybridisierung wurden unterschiedlich lange Oligonukleotide (MWG) als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Sonden verwendet, so daß zwei unterschiedliche Markierungsmethoden zum Einsatz kamen:

Die Alu-Probe (5'-GAC CAG CCT GAG CAA GA**G-3'; ** bezeichnet die Strepsirrhini typische 2bp-Deletion) wurde mit Hilfe einer T4-Polynukleotidkinase (BioLabs) und unter Zugabe von γ -³²P ATP (50 μ Ci) von Amersham am 5'-Ende nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) radioaktiv markiert. Anschließend wurde der Ansatz über einen Ionentauscher (DE52-Säule, Whatman) aufgereinigt und 10⁶ cpm/ml in die Hybridisierung (1 h bei 53 °C, Stringenz: 70%) eingesetzt. Nach zwei Waschschritten mit 6x SSC, 1% SDS wurde die Membran mit einem Röntgenfilm (X-Omat, Kodak) für zwei Stunden exponiert und dieser anschließend entwickelt.

Die Markierung der tRNA-Probe (5'-GGC CCC GTA TGC CAG AGG TGG TGG GTT CAA ACC CAG CCC TGG CC-3') dagegen erfolgte über einen Einbau von α -³²PCTP unter Verwendung des Megaprime DNA Labelling Systems (Amersham) und der Zugabe von 50 μ Ci α -³²PCTP. Bevor 10⁶ cpm/ml der markierten Probe in die Hybridisierung eingesetzt wurde, wurde diese noch über eine MicroSpin™ S-300HR (Amersham) aufgereinigt. Die Hybridisierungstemperatur (68 °C) wurde so gewählt, daß die Probe an Sequenzen mit mindestens 90% Ähnlichkeit bindet. Nach zwei Waschschritten mit 2x SSC wurden die Ergebnisse wie beschrieben ausgewertet.

2.3.3. Konstruktion genomischer Banken und deren Weiterbearbeitung

Um weitere Loci mit entsprechenden SINE-Elementen aufzuspüren, wurden Fragmentlängen-angereicherte, genomische Banken von *Lemur catta*, *Propithecus verreauxi*, *Daubentonia madagascariensis*, *Loris tardigradus* und *Perodicticus potto* erstellt.

Dazu wurde etwa 5 μg genomische DNA der entsprechenden Arten mit Sau3AI geschnitten und anschließend auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Da kleine Fragmente für weitere Untersuchungen nicht geeignet waren, wurden Fragmentgrößen von 0,5 bis 2,5 kb aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

Als Klonierungsvektor wurde der pUC18-Vektor der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Der Vektor wurde mit BamHI geschnitten und mit „Shrimp“ alkalischer Phosphatase (Amersham) dephosphoryliert. Die Ligation der DNA-Fragmente erfolgte mit T4-DNA-Ligase und Zugabe von 500 μM ATP über Nacht bei 16 °C. Nach einer Phenol-Chloroform-Aufreinigung wurden die Ligationsansätze, wie unter 2.2.3. beschrieben, transformiert und ausplattiert.

Die Klone wurden auf eine Membran (Sartolon Blotting Membran, Sartorius) übertragen und mit entsprechenden Sonden hybridisiert (siehe 2.3.2.). Positive Klone wurden mit einer Vektor-PCR (siehe 2.2.3.) auf ihre Insertgröße hin überprüft und die dabei entstandenen Agarose-Gele zu Kontrollzwecken geblottet und nochmals hybridisiert. Doppeltpositive Klone wurden sequenziert (siehe 2.2.4.) und anschließend, wie unter 2.3.1. beschrieben, nach SINEs und „Direct Repeats“ abgesucht.

2.3.4. Spezies-übergreifende SINE-PCRs

Da Transpositionereignisse nur als informative Marker Verwendung finden, wenn die An- bzw. Abwesenheit des SINEs an einem bestimmten Locus in unterschiedlichen Taxa nachgewiesen werden kann, wurde für jeden zu untersuchenden Locus ein PCR-System entwickelt. Um diesen An- bzw. Abwesenheitsbeweis zu erbringen, wurden die dafür verwendeten Primer in SINE-flankierende Bereiche gelegt, so daß auf jeden Fall PCR-Produkte amplifiziert wurden – unabhängig von der Anwesenheit eines SINEs.

Weiterhin war vor allem die Wahl von möglichst konservierten Primern von Bedeutung, da ansonsten die entsprechenden Loci nicht Spezies-übergreifend amplifiziert werden konnten. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, wurde mit NCBI-BLAST versucht, orthologe Sequenzabschnitte in anderen Arten für die jeweiligen Loci zu finden. Wurden diese ermittelt, konnten konservierte Bereiche für die Lage der Primer ausgewählt werden. War dies nicht möglich, mußten die Primer willkürlich gelegt werden.

Die PCR-Amplifikationen wurden nach beschriebenen Bedingungen (siehe 2.2.1.) durchgeführt, wobei die Annealing-Temperatur je nach Bedarf variiert wurde (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Primer-Liste der analysierten Loci

Lokus	Primer 1 (5'-3')	Primer 2 (5'-3')	Temp.
Str1	TGGTGTGGATCACTACAAGG	CCATCTCAACTAATATTCCCC	58°C
Str2	GGAAAATGATTAGGTTCTCAAC	GGAAAATTAGTAACATAAGAAATG	58°C
Str3	AGAAAGTTAASTGCCAMGTAATAGAAGATAA	TCTCTAGGAGAAGKGTGGTTAGAAGAGAC	58°C
Mad1	TGATGTATTTTAGGTGATGCTC	TTTGTTTTGTTAGTATACATAAGC	58°C
Mad2	GTTTCACCATGAATTCCTTACT	AAAGGGATTAAAGGAATTTACAC	58°C
LI1	CATGGGAGGTAGAATAATGAAT	TGGCATTCTGTAAACTCCACT	58°C
Lem1	GAGGCCAAAGAGCAGAAATGT	CAGTGATGGTGTGTAACATGT	58°C
Lem2	AAGATATCAACAAGGTATCACC	TATTAGCTAGGCCTCTCAATAG	58°C
Lem3	GTTTCTTTACCTGTGTTATCTC	GCCTTTCAGGAAGGCAAGG	58°C
Lem4	AAGAAYGATTTTRIGTTTTGGAGTACC	AAAAACAGTMATGAATGGACTASTGTGG	58°C
HLE1	GCCCAGACYCAAATATTYGTCTTCTAA	CCCATSAAGTCATTTTCAATRGCC	58°C
HL1	CCACTTCCTGCCTGGTTTC	ATTTAGAGCAACTTTTATTCTTTTC	58°C
HL2	CCGAAGTAAGYGCTGAAAAYGAGG	CCGAAGGGATAYAGAGATTACCTGAAG	58°C
HL3	CCTAAGAAYRAGRATCACAAACTAAAT	AATWGTTTTGACTTAATAAGGCATG	58°C
Ind1	GGTGGAGCTGTTTCCATGC	GAGAACATACAGTGCAGGAA	58°C
Ind2	AGGTCAAATAAGGCATAGTCC	ATGGAATAGCTCTGAAGAAGG	58°C
Ind3	GTCTGGTGGAGGTTGGCTTT	CCTCCATACTCAGAAGTCCT	58°C
MM1	CATAAGCACAGACTACCATATA	GAAGTACATTTAAAGCTCCAAG	58°C
LoF1	TCTGTTGTGAGCCCTTCCAC	AGTTGGTCCCAGGCACTC	56°C
LoF2	TGTAATAGTGACCAGGTAGATGACAC	GAACCATGGGAGGGATGCTGACT	60°C
LoF3	CAAAGACTTCCATGACAAAAG	TCCTCAACCTAAATAAGATTTTG	58°C
Lor1	CAGACACAGTGAAGGAATTCT	TGGTTGCTGCATTTGAAACCA	58°C
Lor2	ACTCACTTTCATTGAGTAATC	CCATTGTCAACAAGGTAATC	54°C
Lor3	CACATCTCTAAATAACAGGCC	TTTGACCCTGTTTATTATCGTT	58°C
LN1	TATATATACAAACATTATGTATATGT	GACACACTGCACCCTGCTT	58°C
LN2	GATCAAGTAATTTTTATTACTC	TTTATCAAAAAGACAACCTGAAATA	54°C
LN3	GATCTACAAATCATGAGAATTA	CAAATACATCTGATTAACCATC	54°C
LN4	GTTCCATAGATACACATTTTATC	CCCAAAGATAAAGGAAATAGTG	58°C
PA1	CATATTCAGTCAAGAAGCTTTCAA	TCACTCTTTGGTGGCGCTCCAA	54°C
PA2	GGGGCTTCATATGAGAGATTT	ATCTGATTAAGGGATTATCTG	54°C
Gal1	AGAGGTATCAGGTGGCATCA	GCAACATACTAAGTAGACTATTA	58°C

Lokus	Primer 1 (5'-3')	Primer 2 (5'-3')	Temp.
Gal2	CTAAGTTAATCCTCATAATCCTA	TCAGCAATTTAGCCAGCCAAAA	58°C
Gal3	ACCTATTATTAACAAGGGAGGA	TCTAAGGGATAACTTGAAGTATT	58°C
Gal4	ACATGCAATGGATGATGAGCA	TGCTCAGACTCTGTGCTTTAA	58°C
Gal5	ACTAATTTTCATAATTCATTGAGC	TGATGATCTGAATCTAATAAGTC	58°C

2.3.5. Weiterbearbeitung und Auswertung von SINE-PCRs

Sofern entsprechende PCR-Produkte für die einzelnen Loci amplifiziert werden konnten, wurden diese wie unter 2.2.2.-2.2.4. beschrieben weiterbearbeitet. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit NCBI Blast 2 Sequences und den Programmen SeqPup und ClustalX (Thompson et al., 1997). Aufgrund der einfachen Merkmalspolarität der Marker (An- bzw. Abwesenheit des SINEs) waren keine weiteren statistischen Auswertungen und Korrekturen der Sequenzen notwendig. Um aber mögliche Ungleichverteilungen von ursprünglich polymorphen Markern in Folgelinien („Incomplete Lineage Sorting“) ausschließen zu können, wurde versucht, die einzelnen Kanten im Baum durch mehrere SINE-Integrationen zu belegen.

3. Kapitel 1: Molekulare Phylogenie der Halbaffen (Strepsirrhini)

3.1. Einleitung

Die Halb- oder Feuchtnasenaffen (Strepsirrhini) stellen eine der beiden Teilordnungen der Primaten dar. Wie bereits ihr Name verrät, stellen sie das Zwischenglied zwischen den eigentlichen Affen (Anthropoidea) und anderen Säugerordnungen dar und weisen daher noch eine Reihe von ursprünglichen Merkmalen auf, die sie mit anderen Säugerordnungen, nicht aber mit höheren Primaten teilen. Besonders bezeichnend ist das Vorhandensein eines Tapetum lucidum, das den überwiegend nachtaktiven Halbaffen ein verbessertes Sehen bei Dunkelheit ermöglicht, welches bei den beiden einzigen nachtaktiven Haplorrhini-Gattungen *Tarsius* und *Aotus* fehlt. Ein weiteres Merkmal der Halbaffen ist der Orbitaring, der bei höheren Primaten durch eine Orbitahöhle ersetzt wurde, ebenso wie der charakteristische Zahnkamm, das Vorhandensein von mindestens vier Brustwarzen, sowie eines feuchten Nasenspiegels, welcher auch namensgebend war (Feuchtnasenaffen) (Geissmann, 2002a).

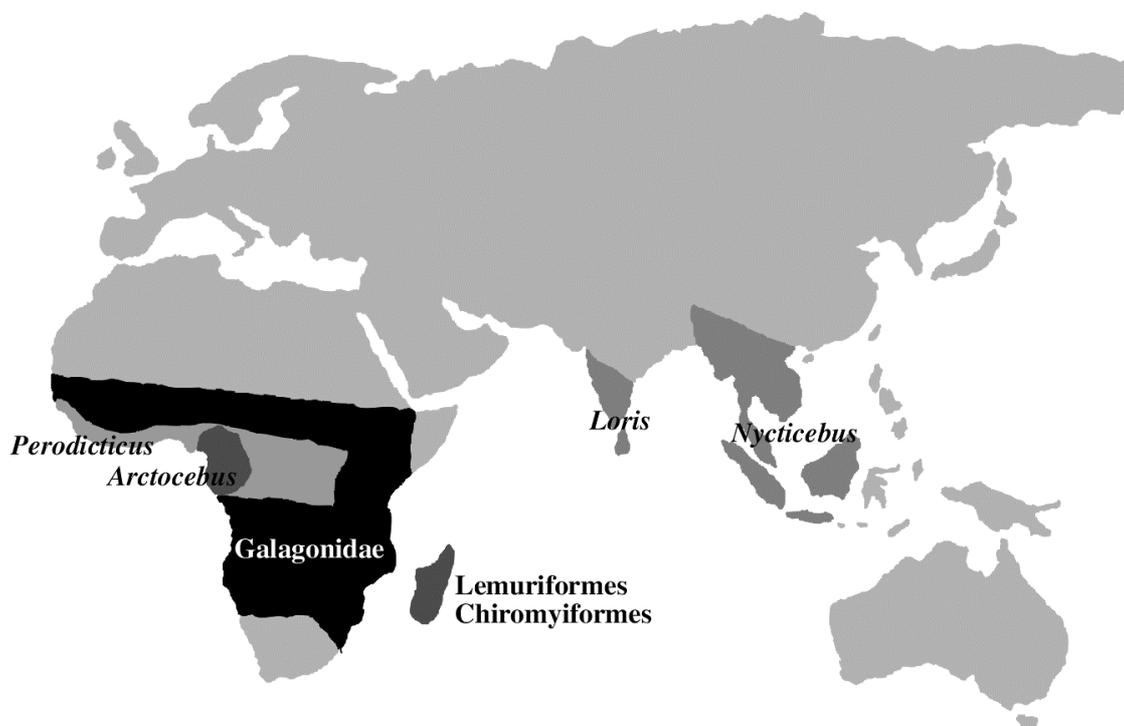


Abbildung 5: Verbreitung der Halbaffen.

Halbaffen besiedeln weite Teile Asiens und Afrikas sowie die Insel Madagaskar (Abb. 5). Aufgrund ihrer weitreichenden Ausdehnung und langen unabhängigen Evolution sind eine Vielzahl von sehr unterschiedlichen Formen entstanden. Ihr Spektrum reicht von Maus- (Mausmakis) bis hin zu Bärengröße (*Megaladapis*, Subfossil), ebenso gibt es Tag- (*Lemuridae*, *Indri*, *Propithecus*) wie Nachtaktivität (alle anderen Gattungen und Familien), oder schnelle (*Galagonidae*) bzw. langsame (*Loridae*) Fortbewegungsmuster. Derzeit werden 89 Arten in sieben Familien und zwei Infraordnungen anerkannt (Geissmann, 2002a), wobei erst in den letzten Jahren einige neue Arten hinzu kamen (Groves, 2000; Honess, 1996, 1997; Kappeler et al., in Präp; Rasoloarison et al., 2000; Thalmann & Geissmann, 2000).

Neben der prinzipiellen Frage nach der Artenvielfalt sind vor allem die evolutionsbiologischen Zusammenhänge von Interesse. Ein wichtiges Problem innerhalb der Halbaffen-Evolution stellt die bisher unzureichend geklärte phylogenetische Position des Fingertieres (*Daubentonia*) und die damit verbundene Besiedelungsgeschichte Madagaskars dar. Aufgrund seiner bizarren Erscheinung und Spezialisierungen wurde das Fingertier (*Daubentonia*) ursprünglich in die Ordnung der Rodentia eingegliedert (Linnaeus, 1789), jedoch später in die Nähe der Primaten gerückt. Je nach Autor wurde das Fingertier als Schwestergruppe aller Primaten (Oxnard, 1981), der Halbaffen (Adkins & Honeycutt, 1994; Arnason et al., 1998; Groves, 1974), der Lemuriformes (Dene et al., 1976; Dutrillaux, 1988; Porter et al., 1995, 1997; Rumpler et al., 1988; Yoder, 1994; Yoder et al., 1996a,b) oder gar der Indriidae (Schwartz, 1986; Schwartz et al., 1978; Szalay & Delson, 1979) angesehen. Obwohl genetische Daten meist Hinweise auf eine Schwestergruppenbeziehung von *Daubentonia* und Lemuriformes liefern, konnte bisher noch kein definitiver Beweis für diese Konstellation erbracht werden (Dene et al., 1976; Dutrillaux, 1988; Porter et al., 1995, 1997; Rumpler et al., 1988; Yoder, 1994; Yoder et al., 1996a,b). Aufgrund dieser unsicheren phylogenetischen Position und der deutlichen morphologischen Unterschiede zu anderen Halbaffen-Formen wurde das Fingertier als eigene Infraordnung Chiromyiformes abgetrennt (Groves, 2001). In Bezug auf die zweite madagassische Infraordnung, die Lemuriformes sind vor allem Fragen von Bedeutung, die die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den vier Familien Lemuridae, Indriidae, Lepilemuridae

und Cheirogaleidae, sowie die Abspaltungsfolge innerhalb der einzelnen Familien betreffen (Yoder, 1997).

Die Loriformes können dagegen in zwei phänotypisch klar unterscheidbare Familien Galagonidae und Loridae unterteilt werden, wobei Galagonidae ausschließlich in Afrika und Loridae in Afrika sowie Asien vorkommen. Aufgrund dieses Verbreitungsmusters sind bisher eine Vielzahl an Fragen bezüglich der Besiedelungsgeschichte beider Kontinente unbeantwortet geblieben. Obwohl eine eindeutige morphologische Unterscheidung zwischen beiden Familien möglich ist, kann diese mit Hilfe molekulargenetischer Methoden, welche Hinweise auf eine Schwestergruppenbeziehung von asiatischen Loridae und Galagonidae (Dene et al., 1976) oder einen gemeinsamen Ursprung der afrikanischen Vertreter (Galagonidae und *Perodicticus*) zum Ausschluß der asiatischen Gattungen (Yoder et al., 2001) lieferten, nicht nachvollzogen werden. Neben diesen generellen Fragestellungen der Loriformes-Evolution, sind auch die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der beiden Familien von besonderer Bedeutung. Innerhalb der Loridae betrifft dies vor allem die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den vier Gattungen *Arctocebus*, *Perodicticus* (beide Afrika) und *Loris*, *Nycticebus* (beide Asien). Da auf beiden Kontinenten eine robuste (*Nycticebus*, *Perodicticus*) sowie eine grazile Form (*Loris*, *Arctocebus*) vertreten ist, gestaltet sich die Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse als schwierig und führte zu einer Reihe von unterschiedlichen phylogenetischen Konstellationen (Dene et al., 1976; Dutrillaux, 1988; Groves, 1971; Groves, 2001; Hill, 1947; Schwartz, 1992; Yoder, 1989; Yoder et al., 2001). Mit der Beschreibung einer weiteren Gattung (*Pseudopotto*) (Schwartz, 1996) wurde die Beantwortung der phylogenetischen Fragen innerhalb der Loridae nochmals erschwert. Da die Herkunft der Typusexemplare nur vage bekannt ist und das einzige bekannte lebende Tier sich in seiner äußeren Morphologie kaum von *Perodicticus* unterschied, wird in der vorliegenden Arbeit die Taxonomie von Geissmann (2002a) verwendet und *Pseudopotto* nicht anerkannt. Innerhalb der Galagonidae beziehen sich die Fragen vor allem auf die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Gattungen und die Gattungszugehörigkeit einzelner Spezies-Gruppen, wie zum Beispiel der *G. alleni*- oder *G. zanzibaricus*-Gruppe (Nash et al., 1989).

Trotz einer stetig wachsenden Zahl von phylogenetischen Studien im Bereich der Halbaffen, sind bis heute eine Reihe von herausragenden Fragen ihrer Evolution und der damit verbundenen Besiedelungsgeschichte der Kontinente Afrika und Asien sowie der Insel Madagaskar durch diese Primatengruppe unbeantwortet geblieben.

Um einige dieser Fragen zu klären, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche molekulargenetische Methoden kombiniert. Mit Hilfe vollständiger Sequenzen des mitochondrialen Cytochrom b Gens sollten Verwandtschaftsverhältnisse vor allem zwischen nah verwandten Taxa wie Arten und Gattungen geklärt werden. Des Weiteren dienten die Sequenzdaten auch der Datierung von phylogenetischen Aufspaltungsereignissen und der Erstellung einer vorläufigen Hypothese der Halbaffen-Evolution auf tieferliegenderer Ebene, die dann mit der zweiten Methode, der Analyse von SINE-Transpositionen überprüft werden sollte. Dazu wurde die Verteilung von SINE-Elementen innerhalb der Primaten untersucht, wobei vor allem Halbaffen-spezifische Alus (Zietkiewicz et al., 1998) und tRNA-abgeleitete Elemente (Daniels & Deininger, 1985) zum Einsatz kamen. Durch den An- bzw. Abwesenheitsbeweis entsprechender Elemente auf Mono- und Multi-Lokus-Ebene sollten somit bestimmte phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen untermauert werden.

3.2. Material und Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 145 Halbaffen-Proben gesammelt und analysiert. Da von einigen Taxa keine Proben erhältlich waren, wurden 35 bereits publizierte Sequenzen des mitochondrialen Cytochrom b Gens mit in den Datensatz aufgenommen. So konnte mit 81 Taxa aus 22 Gattungen das Spektrum der Halbaffen weitreichend abgedeckt werden. Weiterhin wurden Vertreter anderer Primatenunterordnungen untersucht, die als Außengruppen dienen. Details zu den analysierten Proben und Methoden sind aus „10. Anhang“ und „2. Methoden“ ersichtlich.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Sequenzanalyse des mitochondrialen Cytochrom b Gens

Von allen zur Verfügung stehenden Proben konnten erfolgreich vollständige Cytochrom b Sequenzen ermittelt werden.

Das Gen hat bei allen Individuen eine Länge von 1140 bp und wird überwiegend durch „AGA“ terminiert. In Ausnahmefällen erfolgt die Terminierung auch über „AGG“ (*P. furcifer*, *G. d. murinus*), „TAA“ (*M. ravelobensis*) oder „TAG“ (einige *Propithecus* sp.).

Basenzusammensetzung

Die Analyse der Basenzusammensetzung zeigt eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Gattungen, wobei nicht nur sehr distante Taxa unterschiedliche Muster aufweisen, sondern dies auch zwischen Schwester-Gattungen zum Teil erkennbar ist (Abb. 6). Besonders auffallend ist dies bei den beiden asiatischen Loridae-Vertretern, *Loris* (33,0% A, 28,3% C, 11,6% G, 27,1% T) und *Nycticebus* (28,6% A, 29,1% C, 13,5% G, 28,2% T). Ebenso weist *Phaner* (30,1% A, 28,1% C, 12,3% G, 29,6% T) deutliche Unterschiede zu anderen Cheirogaleidae-Gattungen (29,7-31,3% A, 26,6-28,0% C, 12,1-13,1% G, 28,8-30,6%T) auf.

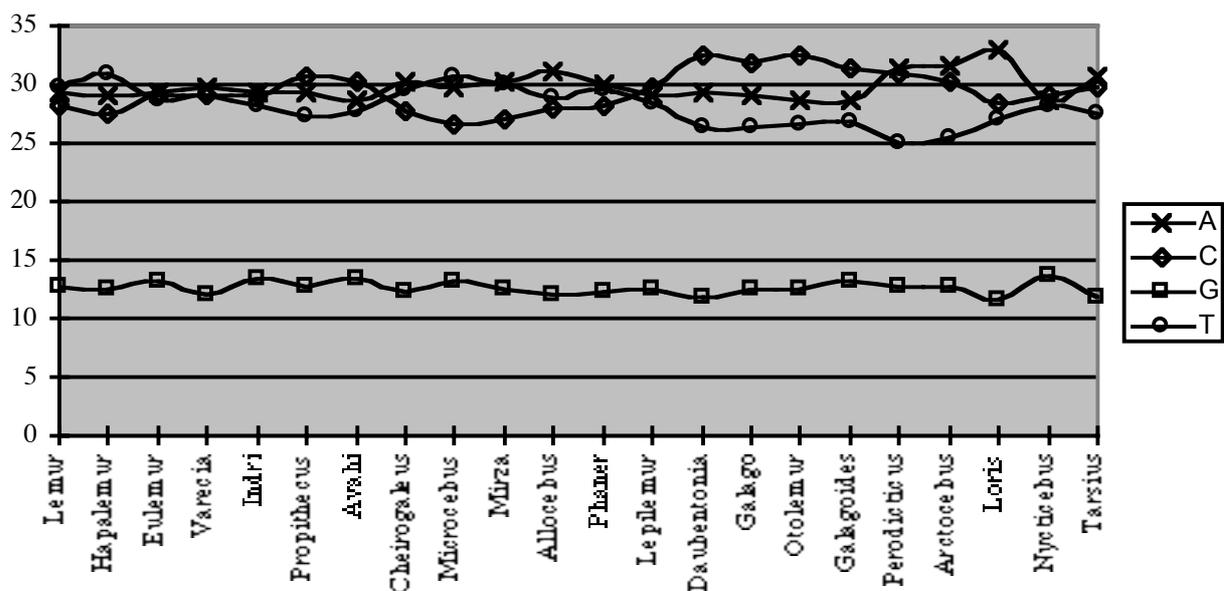


Abbildung 6: Durchschnittliche Basenzusammensetzung (in%) der einzelnen Halbaffen-Gattungen und der verwendeten Außengruppe *Tarsius*

Innerhalb der Galagonidae (*Galago*, *Otolemur*, *Galagoides*), afrikanischen Loridae (*Perodicticus*, *Arctocebus*), Cheirogaleidae (*Microcebus*, *Mirza*, *Allocebus*, *Cheirogaleus*) sowie zwischen Lemuridae (*Lemur*, *Hapalemur*, *Eulemur*, *Varecia*) und Indriidae (*Indri*, *Propithecus*, *Avahi*) lassen sich dagegen Ähnlichkeiten in der Basenzusammensetzungen erkennen.

Paarweise Differenzverteilung

Die beobachteten Differenzen zwischen anerkannten Arten liegen bei 2,72-14,45%, wobei die zwischen *Lemur* und *Hapalemur* mit 11,05-12,81% ebenfalls in diesen Bereich fällt. Paarweise Vergleiche zwischen Gattungen zeigen eine steigende Tendenz mit bis zu 19,56%. Ausgenommen aus dieser Kategorie ist die Differenz zwischen *Phaner* und den anderen Cheirogaleidae-Gattungen mit 19,12-21,23%, welche mit dem genetischen Abstand zwischen Familien (14,56-23,25%) vergleichbar ist. Die Unterschiede zwischen den Infraordnungen liegen dagegen bei 19,91-25,88%.

Insgesamt ist eine Klassifizierung in Arten, Gattungen, Familien oder Infraordnungen mit den ermittelten Differenzen nur bedingt möglich, da nur eine Tendenz zu einem Anstieg der Differenzen je tiefer die Verzweigungen fallen erkennbar und keine klare Untergliederung in Kategorien möglich ist. Weitere Details zu paarweisen Differenzverteilungen sind in Abb. 7 graphisch dargestellt.

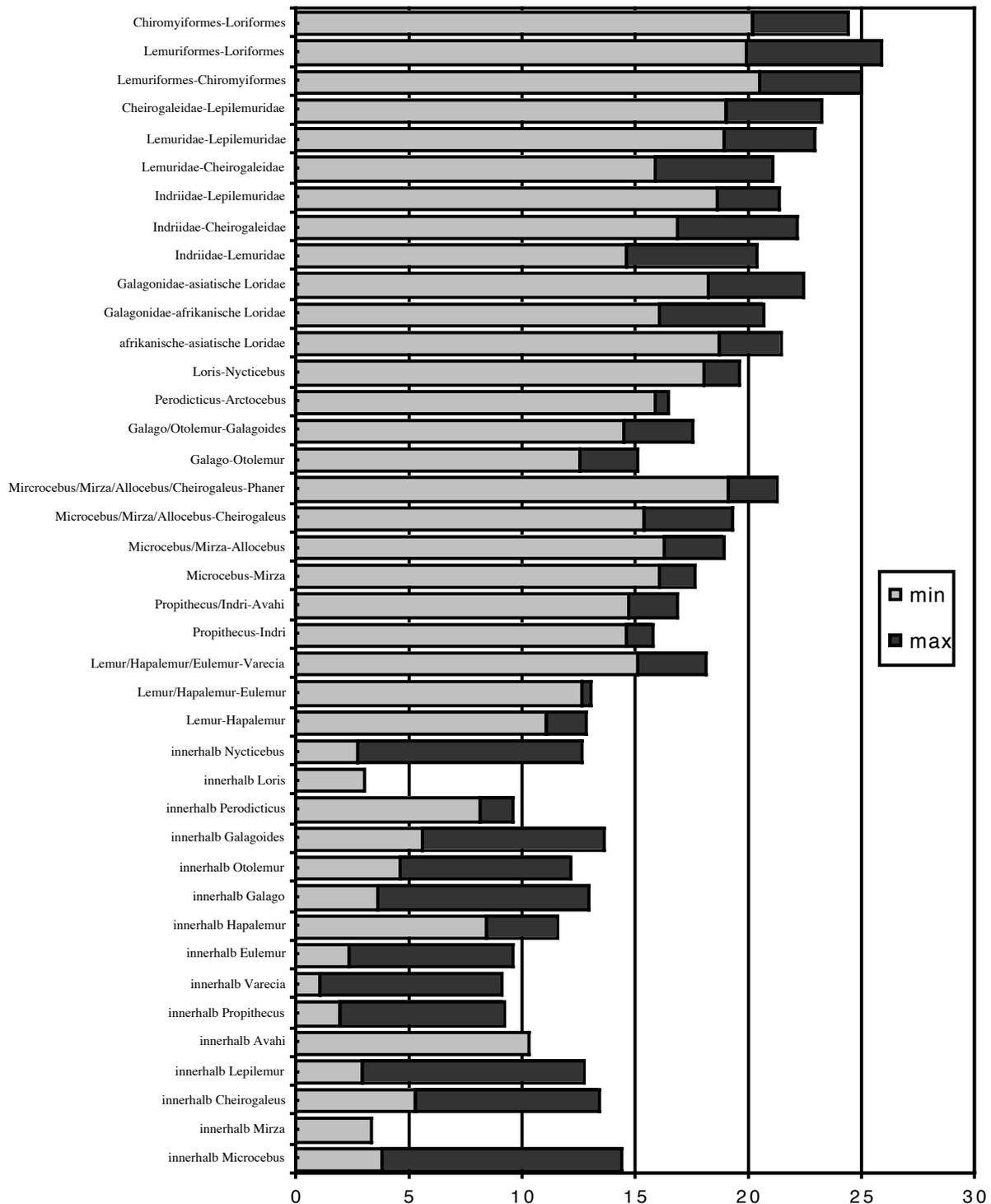


Abbildung 7: Beobachtete paarweise Differenzverteilungen in% innerhalb der Halbaffen.

Phylogenetische Rekonstruktionen

Stammbaumrekonstruktionen wurden mit den drei Algorithmen Maximum-Parsimony, Neighbor-Joining und Maximum-Likelihood und unter Einbeziehung unterschiedlicher Sequenzevolutionsmodelle erstellt. Um die langen Kalkulationszeiten zu verkürzen, verblieb im

finalen Datensatz nur noch jeweils ein Vertreter pro Taxon. In allen Rekonstruktionen wurde die homologe Sequenz von *Tarsius bancanus* (AF378365) als Außengruppe gewählt wurde, da aufgrund der ähnlichen Basenzusammensetzung von *Tarsius* und Strepsirrhini eine mögliche Fehlinterpretation der Daten ausgeschlossen werden kann.

Die Baumrekonstruktionen wurden wie unter 2.2.5. beschrieben durchgeführt. Für die NJ-Kalkulation in PHYLIP wurde dazu das in PUZZLE ermittelte Transitions-Transversions-Verhältnis von 4,13 und die ML-Distanzkorrektur verwendet. NJ-Bäume in PAUP wurden unter Annahme des „General time-reversal“-Modells und den in MODELTEST geschätzten Werten für die Gamma-Verteilung der Raten-Heterogenität ($\alpha = 0,908348$) und den Anteil invariabler Positionen ($P_{inv} = 0,420378$) berechnet.

Die aus den Rekonstruktionen abgeleiteten Baumtopologien zeigen überwiegend identische Verwandtschaftsverhältnisse und unterscheiden sich nur durch variierende Bootstrap- bzw. Quartet Puzzling-Werte (Abb. 9).

Phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen

In sämtlichen abgeleiteten Baumtopologien ist eine Gliederung in die drei Infraordnungen Loriformes, Chiromyiformes und Lemuriformes klar erkennbar und deren jeweilige Monophylie gut belegt (88-100%). Die Beziehungen der drei Infraordnungen zueinander können aber mit dem vorliegenden Datensatz nicht mit Sicherheit aufgelöst werden. Obwohl eine Schwestergruppenbeziehung der beiden madagassischen Infraordnungen angedeutet wird, ist die statistische Unterstützung für diese Konstellation nur in ML-Rekonstruktionen ausreichend hoch (94%), wogegen die NJ- und MP-Algorithmen niedrige bzw. gar keine Unterstützung liefern. Des weiteren zeigt der Maximum Likelihood Ratio Test (Kishino & Hasegawa, 1989) in PUZZLE keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier möglichen Gruppierungen an, wodurch keine der Konstellationen statistisch abgelehnt werden kann (5%-Signifikanz-Level) (Abb. 8).

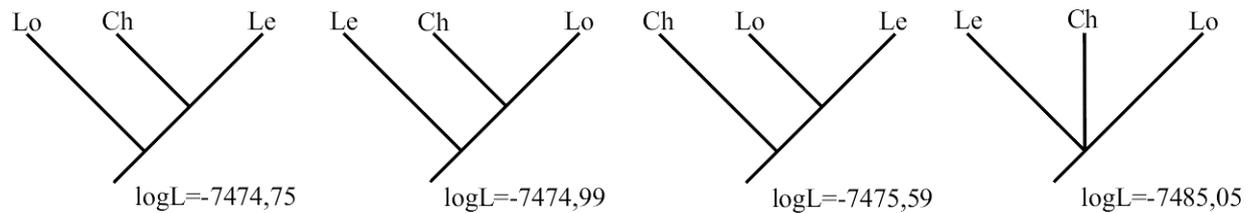


Abbildung 8: Log Likelihood-Werte der vier möglichen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Infraordnungen (Lo: Loriformes, Ch: Chiromyiformes, Le: Lemuriformes).

Innerhalb der Lemuriformes sind die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Familien ebenfalls kaum aufgelöst, weiterhin gibt es keine Unterstützung für eine Schwestergruppenbeziehung von *Phaner* und anderen Cheirogaleidae-Gattungen, so daß *Phaner* neben den vier Familien eine fünfte Hauptgruppe bildet. Im Gegensatz dazu liefert aber der Datensatz schwache Hinweise auf eine Verwandtschaft der Indriidae und Lemuridae. Die Monophylie und Abspaltungsfolge innerhalb der einzelnen Familien dagegen ist klar aufgegliedert und meist gut statistisch belegt.

Der gemeinsame Ursprung der Lemuridae ist durch Bootstrap- bzw. Quartet Puzzling-Werte von 69-96% untermauert. Innerhalb der Lemuridae stellt *Varecia* die erste Abspaltung dar, gefolgt von *Eulemur*, wobei *Hapalemur* und *Lemur* die jüngste Aufspaltung bilden. Die beschriebenen Verwandtschaftsbeziehungen und auch die Monophylie der einzelnen Gattungen sind mit Ausnahme der ML-Rekonstruktionen, die keine Auflösung zwischen *Lemur/Hapalemur*, *Eulemur* und *Varecia* zulassen, überwiegend gut belegt (85-100%). Die Abzweigung der Gattung *Hapalemur* von *Lemur* dagegen wird bei allen Algorithmen nur durch 52-57% gestützt. Die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb von *Hapalemur* und *Varecia* können mit hoher Wahrscheinlichkeit aufgeklärt werden. So trennt sich innerhalb der Gattung *Hapalemur* zuerst *H. simus* ab, später dann *H. aureus* und zuletzt erst *H. griseus* von *H. meridionalis*. Bei *Varecia* wurden vier sehr unterschiedliche Haplotypen untersucht, die eine Paraphylie der schwarz-weißen Varis (*Varecia variegata variegata*, *V. v. subcincta*) aufdecken. Basierend auf der rekonstruierten Phylogenie stellt die nördlichste schwarz-weiße Form (*V. v. subcincta*) somit den nächsten Verwandten von *V. v. rubra* dar und die beiden weiteren schwarz-

weißen Formen die Schwestergruppen dazu. Die Verhältnisse zwischen den fünf *Eulemur*-Arten dagegen können kaum aufgelöst werden. Jedoch ist es zumindest möglich, die Monophylie von *Eulemur macaco* und *Eulemur fulvus* zu belegen, wobei in letzterer Art zwei sehr distante, paraphyletische Gruppen von *E. f. rufus* entdeckt wurden.

Innerhalb der Indriidae können die Verzweigungen zwischen den drei Gattungen nicht aufgeschlüsselt, die jeweilige Monophylie von *Avahi* und *Propithecus* jedoch klar bewiesen werden (98-100%). Die Gattung *Propithecus* kann zudem in die zwei unterschiedlichen Artgruppen *P. diadema* und *P. verreauxi/P. tattersalli* unterteilt werden. *P. verreauxi* bildet eine paraphyletische Art, in dem *P. v. coquereli* die Schwestergruppe zu *P. tattersalli* darstellt.

Innerhalb der Cheirogaleidae (ohne *Phaner*) spaltet sich *Cheirogaleus* als erstes ab, gefolgt von *Allocebus*, wobei die Trennung von *Mirza* und *Microcebus* zuletzt erfolgt. Obwohl die Monophylie der jeweiligen Gattungen gut belegt ist (88-100%), sind die Beziehungen zueinander nicht besonders stark untermauert. So ist der gemeinsame Ursprung von *Allocebus*, *Mirza* und *Microcebus* zum Ausschluß von *Cheirogaleus* nur durch Bootstrap- oder Quartet Puzzling-Werte von 50-69% gestützt. Ähnliches gilt für die Schwestergruppenbeziehung von *Mirza* und *Microcebus*: in NJ- und MP-Rekonstruktionen findet diese Konstellation nur 55-68% Unterstützung, wogegen in ML-Bäumen die Verhältnisse zwischen beiden Gattungen und *Allocebus* gar nicht aufgelöst werden. Innerhalb von *Cheirogaleus* wurden vier unterschiedliche Formen untersucht. Im Gegensatz zur eindeutig bewiesenen Monophylie von *C. medius* und einer noch unbeschriebenen Art (92-100%), können die Beziehungen zwischen dieser Gruppe, *C. major* und *C. crosselyi* nicht mit Sicherheit geklärt werden. Die Gattung *Microcebus* unterteilt sich in zwei sehr unterschiedliche Hauptgruppen, die jeweils gut unterstützt sind (91-100%). Eine davon beinhaltet *M. murinus* und *M. griseorufus*, die andere alle weiteren Arten. Innerhalb dieser zweiten Gruppe bildet *M. ravelobensis* die tiefste Abspaltung, gefolgt von *M. tavaratra*. Die letzte Verzweigung erfolgt schließlich zwischen zwei weiteren Untergruppen, bestehend einerseits aus *M. sambiranensis* und *M. rufus* von Tampo und andererseits aus *M. berthae*, *M.*

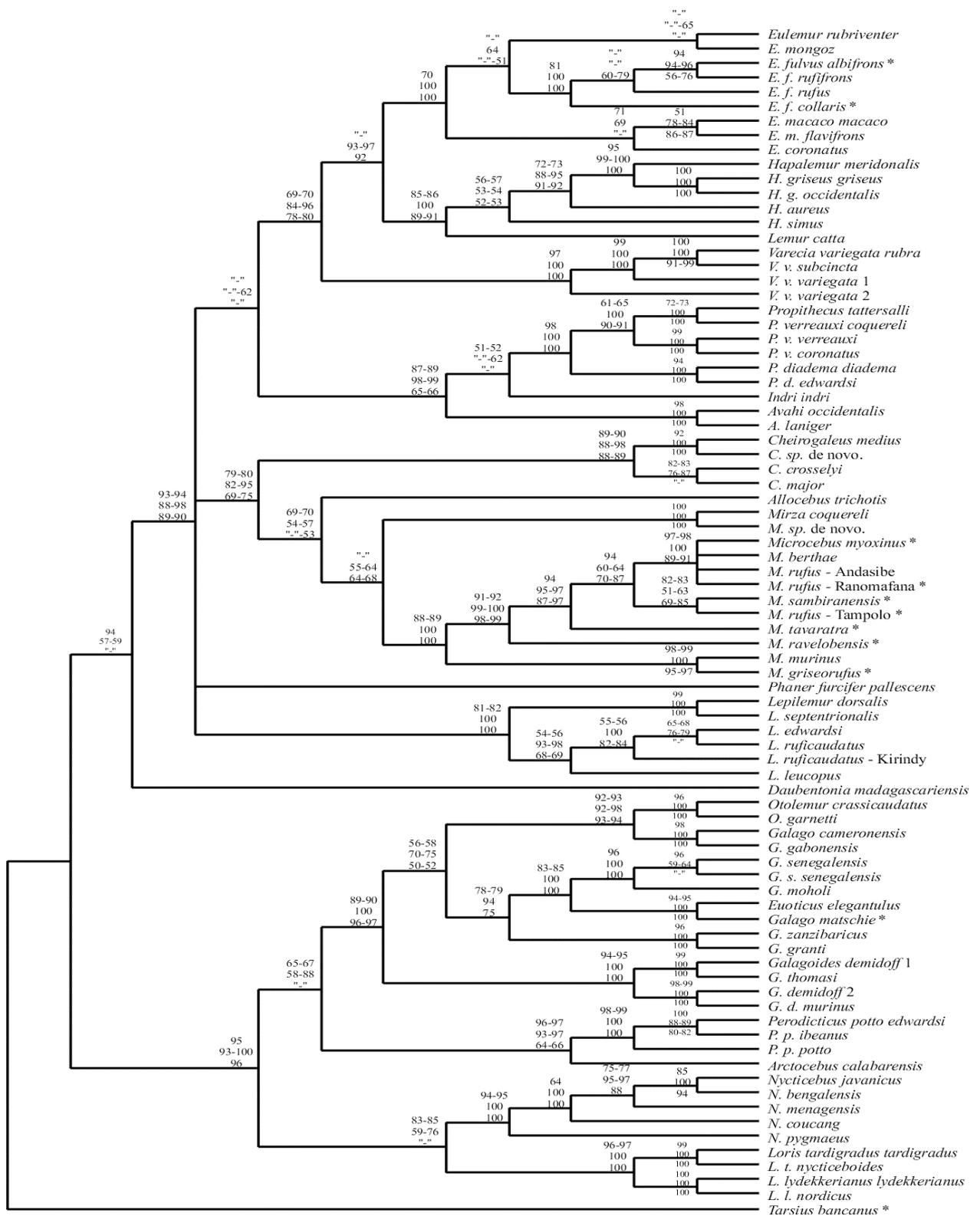


Abbildung 9: 50%-Mehrheitsregel-Konsensus-Baum basierend auf ML-, NJ- und MP-Rekonstruktionen. Zahlen im Baum geben Quartet Puzzling- bzw. Bootstrap-Werte in% an (oben: ML; Mitte: NJ, unten: MP). “-“ bezeichnet Werte unter 50%. Die mit * markierten Arten sind durch bereits publizierte Sequenzen repräsentiert (siehe Anhang).

myoxinus sowie *M. rufus* von Ranomafana und Andasibe. Die Beziehungen zwischen letzteren Formen wird aber mit den zur Verfügung stehenden Sequenzdaten nicht aufgelöst.

Die fünf untersuchten *Lepilemur*-Arten können in zwei Gruppen untergliedert werden. Die beiden nördlichsten Arten (*L. septentrionalis*, *L. dorsalis*) bilden dabei die Schwestergruppe zu den restlichen Formen, von denen sich *L. leucopus* als erstes abspaltet. Die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den übrigen Taxa deuten eine Paraphylie von *L. ruficaudatus* an, indem ein Vertreter aus Kirindy die Schwestergruppe zu *L. edwardsi* und einem zweiten *L. ruficaudatus* mit unbekannter Herkunft bildet.

Die Loriformes gliedern sich in die drei Hauptgruppen Galagonidae, afrikanische und asiatische Loridae auf. Die Verwandtschaftsbeziehungen der Gruppen zueinander sind aber durch den vorliegenden Datensatzes nur schwach angedeutet. So ist die Schwestergruppenbeziehung von afrikanischen Loridae und Galagonidae zum Ausschluß der asiatischen Loridae durch Werte von 58-88% (NJ, ML) gering bzw. gar nicht (MP) untermauert. Die Monophylie der jeweiligen Gruppen dagegen ist mit Ausnahme der MP-Bäume, die keinen gemeinsamen Ursprung von *Loris* und *Nycticebus* belegen, meist gut unterstützt (59-100%).

Die asiatischen Loridae sind weiterhin in die beiden monophyletischen Gattungen *Loris* und *Nycticebus* unterteilt. Die statistische Unterstützung hierfür und für die Konstellationen innerhalb der Gattungen liegen zwischen 64 und 100%. Innerhalb von *Nycticebus* spaltet sich zuerst *N. pygmaeus* ab, später dann *N. coucang*, gefolgt von *N. menagensis*; als letztes trennen sich *N. javanicus* und *N. bengalensis*.

Die afrikanischen Loridae setzen sich ebenfalls aus zwei Gattungen zusammen, deren gemeinsamer Ursprung in ML- und NJ-Rekonstruktionen eindeutig belegt ist. Innerhalb von *Perodicticus* spaltet sich die westlichste Unterart, *P. p. potto* als erstes ab, wobei die östlichste Unterart (*P. p. ibeanus*) und die aus dem westlichen Zentralbereich (*P. p. edwardsi*) die rezenteste Verzweigung bilden.

Die 15 untersuchten Taxa der Familie der Galagonidae können in drei Spezies-Gruppen oder Gattungen unterteilt werden. Obwohl die Monophylie der Familie gut untermauert ist (89-100%), ist die Schwestergruppenbeziehung von *Galagoides* zu *Galago/Otolemur* nur schwach

belegt (50-75%). Dagegen sind die Verhältnisse innerhalb der drei Gattungen statistisch gut unterstützt. Innerhalb von *Galago* spaltet sich zuerst die *G. zanzibaricus*-Gruppe (*G. zanzibaricus*, *G. granti*) ab, später dann eine Gruppe mit *Euoticus elegantulus* und *G. matschie*. Die Aufspaltung von *G. moholi*, *G. senegalensis* und *G. s. senegalensis* stellt schließlich die rezenteste dar. Die Schwestergruppe zu *Galago* bilden die Vertreter von *Otolemur* und der *G. alleni*-Gruppe (*G. cameronensis*, *G. gabonensis*), deren gemeinsamer Ursprung eindeutig untermauert ist (92-98%). Von der Gattung *Galagoides* wurden vier sehr unterschiedliche Taxa bearbeitet, wobei drei davon *G. demidoff* angehören. Basierend auf den phylogenetischen Rekonstruktionen stellt *G. demidoff* 1 die Schwesterart von *G. thomasi* und *G. demidoff* 2 die von *G. d. murinus* dar.

3.3.2. SINE-Transpositionen als molekular-kladistische Marker

Als Ausgangspunkt für die Analyse von Transpositionereignissen wurden zwei bereits beschriebene SINE-Elemente gewählt. Es handelt sich dabei um ein tRNA-abgeleitetes Monomer, welches für *Otolemur* und *Galago* beschrieben war (Daniels & Deininger, 1985) und ein Halbaffen-spezifisches Alu, gekennzeichnet durch eine 2 bp-Deletion (Zietkiewicz et al., 1998). Um die Repräsentanz dieser Elemente innerhalb der Ordnung der Primaten zu testen, wurden Southern-Blot-Analysen und anschließende Hybridisierungsversuche mit den spezifischen tRNA- und Alu-Sonden durchgeführt. Die dabei erzielten Ergebnisse zeigen, daß das Monomer nicht nur in den beiden Galagonidae-Gattungen, sondern in allen Loriformes und das Alu-Element in allen Halbaffen vorhanden ist (Abb. 10).

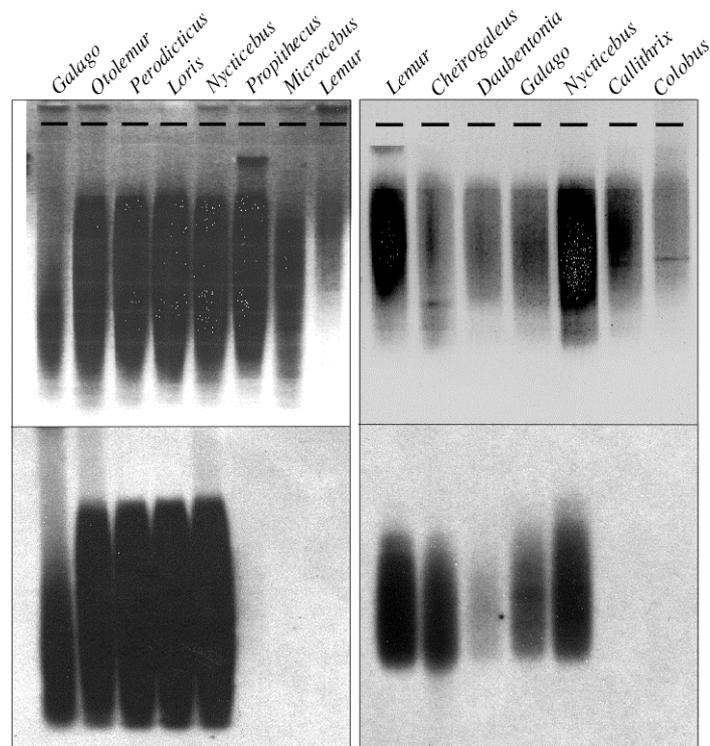


Abbildung 10: Southern-Blot-Analysen. Obere Bilder zeigen die Sau3AI geschnittene und im Agarose-Gel (mit Ethidiumbromid) aufgetrennte DNA der untersuchten Primaten-Gattungen. Untere Bilder zeigen die Ergebnisse der Hybridisierung. Links: tRNA-Probe mit einer erwarteten Stringenz von etwa 90%; rechts: Alu-Probe mit einer erwarteten Stringenz von etwa 70%.

Basierend auf den Ergebnissen der Hybridisierungsversuche wurden genomische Banken von fünf Halbaffen-Arten erstellt. Anschließend wurden die beiden Banken der Loriformes-Vertreter *Loris* und *Perodicticus* mit der Monomer-Probe und die drei Banken der Lemuriformes-Vertreter *Lemur*, *Propithecus* und *Daubentonia* mit der Alu-Probe nach entsprechenden Elementen abgesucht. Nach Überprüfung der Fragmentgrößen und erneuter Hybridisierung der positiven Klonen, wurden doppelt-positive sequenziert. Die dabei erzielten Sequenzinformationen wurden mit Hilfe des RepeatMasker-Programms nach SINE-Integrationen und den flankierenden direkten Wiederholungen hin abgesucht. Um die Primer-Konstruktion zu erleichtern, wurde mit der BLAST-Option in NCBI versucht, homologe Information für entsprechende Sequenzen zu finden. Da dies aber meist nicht möglich war, wurde die Primer-Wahl willkürlich getroffen. Auf diese Weise konnten 22 PCR-Systeme für

Propithecus, 14 für *Lemur*, 13 für *Daubentonia*, 18 für *Loris* und 22 für *Perodicticus* erstellt werden.

Neben den auf eigenen Sequenzdaten basierenden PCR-Systemen, wurden weitere für bereits publizierte Daten konstruiert. Die dazu verwendeten Sequenzen stammen von *Lemur catta* (AC123542, AC123543, AC123544, AC123970, AC123971, AC124160, AC124161, AC133072, AC133073, AC133928, AC134315, AC134316), sowie von *Galago* und *Otolemur* (U60902, X03335, X55914, X55921). Auf diesem Weg konnten 49 weitere Systeme für *Lemur* und fünf für *Galago/Otolemur* erstellt werden.

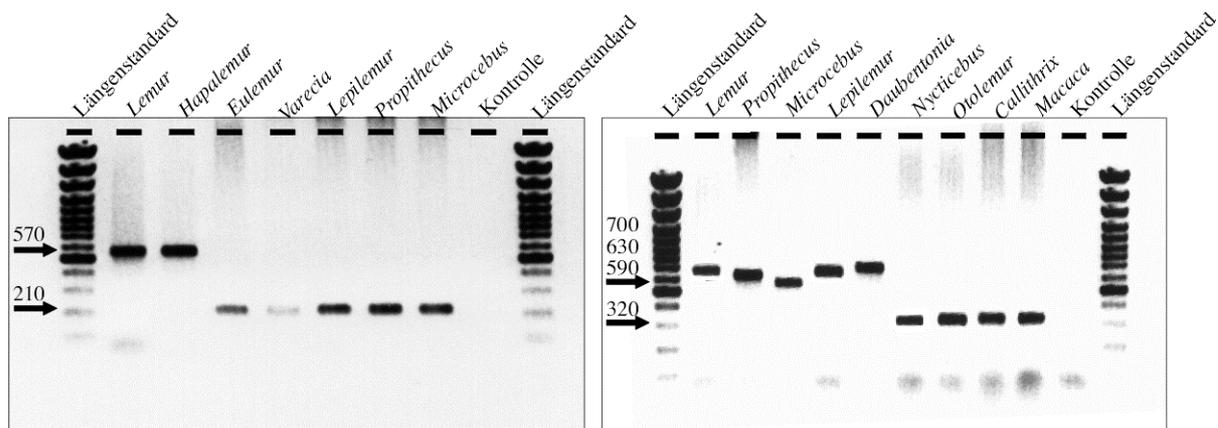


Abbildung 11: Beispiele für zwei Spezies-übergreifende PCR-Amplifikationen (HL1, links) und (Mad2, rechts). HL1: *Lemur* und *Hapalemur* haben eine Alu-Integration, alle anderen untersuchten Gattungen dagegen besitzen am orthologen Locus diese nicht. Mad2: Die fünf madagassischen Formen besitzen an diesem Locus eine Alu-Integration, die bei Loriformes und höheren Primaten nicht vorhanden ist. Die variierenden Fragmentlängen innerhalb der madagassischen Taxa werden durch unterschiedlich lange Deletionen hervorgerufen.

Um einen klaren An- bzw. Abwesenheitsbeweis für die jeweiligen SINE-Integrationen zu erhalten, wurden die 143 Loci Spezies-übergreifend auf Integrationen hin überprüft. Die dafür verwendeten Taxa wurden für jeden Locus möglichst repräsentativ gewählt, so daß sie einen klaren Beleg für einen gemeinsamen Ursprung zweier oder mehrerer Taxa zum Ausschluß des nächst verwandten Taxons ergaben (Abb. 11).

Von den 143 untersuchten Loci konnte nur für 35 dieser eindeutige An- bzw. Abwesenheits-Beweis erbracht werden; in allen anderen Fällen gelang zwar meist die

Amplifikation der Integrations-enthaltenden PCR-Produkte, jedoch nicht die der Außengruppen. Möglicher Grund hierfür ist die frühe Aufspaltung der Halbaffen und die damit verbundene lange unabhängige Evolution einzelner Linien, so daß häufig nicht ausreichend konservierte Regionen für die Primer-Wahl gefunden werden konnten.

Die 35 Loci, die auf PCR-Ebene eine Definition von Verwandtschaftsverhältnissen erlaubten, wurden anschließend sequenziert, um somit die Ergebnisse auch auf Sequenz-Ebene verifizieren zu können. Dabei wurden bei einigen Loci neben den bereits bekannten Elementen weitere SINE-Integrationen gefunden, wovon einige ebenfalls als kladistische Marker Verwendung fanden. Insgesamt konnten so 49 unterschiedliche SINE-Integrationen entdeckt werden, wobei es sich mit Ausnahme der zufällig gefundenen Integration im Locus MM1 ausschließlich um Alus oder tRNA-abgeleitete Elemente handelt. Der MM1-Lokus dagegen besitzt eine kurze Integration von nur 37 bp. Sequenzvergleiche mit bekannten transposablen Elementen haben ergeben, daß das Fragment eine 40%-ige Übereinstimmung mit einer der beiden internen Promotoren (A-Box) von Alus aufweist.

Für die Monophylie der Strepsirrhini wurden drei Marker (Str1-3) gefunden, wobei in Str1 zwei weitere Elemente entdeckt wurden: eines davon ist in allen Lemuriformes, das zweite nur in Cheirogaleidae (mit *Phaner*) vorhanden. Der gemeinsame Ursprung der beiden madagassischen Infraordnungen Chiromyiformes und Lemuriformes ist durch zwei Marker belegt (Mad1-2). Zusätzlich zu dem Madagaskar-Monophylie-Marker in Mad1 konnte eine weitere Integration in allen Galagonidae-Gattungen beschrieben werden. Innerhalb der Lemuriformes konnten die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Familien kaum aufgelöst werden, zumindest fand sich aber ein Marker (LI1), der Hinweise auf eine Schwestergruppenbeziehung von Lemuridae und Indriidae liefert. Die Monophylie der Familien Lemuridae und Indriidae ist jeweils durch vier Integrationen (Lem1-4, Ind1-3) eindeutig bewiesen. Innerhalb der Lemuridae wurden vier weitere SINEs gefunden, die einerseits die Monophylie von *Hapalemur* und *Lemur* (HL1-3) und andererseits die von *Lemur/Hapalemur* und *Eulemur* zum Ausschluß von *Varecia* (HLE1) belegen. Innerhalb der Cheirogaleidae fand sich ein Marker (MM1), der Hinweise auf eine Schwestergruppenbeziehung von *Mirza* und

Microcebus liefert. Der gemeinsame Ursprung der Loriformes konnte durch drei Marker (LoF1-3) bewiesen werden. Zusätzlich wurde in LoF3 eine Integration bei *Loris* und *Nycticebus* gefunden. Innerhalb der Loriformes belegen eine Vielzahl von SINE-Elementen die Monophylie der beiden traditionell anerkannten Familien Galagonidae und Loridae. Für die Loridae wurden drei (Lor1-3) und für die Galagonidae sechs Marker (Gal1-5, Mad1) gefunden, wodurch die Monophylie der beiden Familien klar belegt ist. Zusätzlich wurden weitere Integrationen in Lor3 bei *Arctocebus* und Lor2 bei *Loris* und *Nycticebus* gefunden. Der gemeinsame Ursprung der beiden asiatischen Gattungen *Loris* und *Nycticebus* konnte zusätzlich zu den beiden bereits genannten Marker noch durch vier weitere untermauert werden (LN1-4). Neben den Monophylie-Markern in LN1-4 wurde bei *Arctocebus* eine zusätzliche Integration in LN1 und LN4, bei *Nycticebus* in LN1 und LN2 und bei *Galago moholi* und *G. senegalensis* in LN2 gefunden. Der gemeinsame Ursprung der beiden afrikanischen Loridae *Arctocebus* und *Perodicticus* konnte durch Integrationen an zwei Loci belegt werden (PA1-2), wobei in PA2 zwei unabhängige Transpositionereignisse stattfanden. Des Weiteren wurde in PA2 eine zusätzliche Integration bei *Loris* entdeckt. Weitere Details zu den einzelnen Loci und Integrationen und deren phylogenetische Position sind in Tab. 3 und Abb. 12 aufgeführt.

Tabelle 3: Liste der 49 untersuchten Integrationen und ihre Verteilung innerhalb der getesteten Primaten (aufgeteilt nach Marker-Gruppen).

Strepsirrhini-Monophylie

Lokus	Mic	Che	Pha	Lep	Pro	Lem	Dau	Nyc	Per	Gal	Oto	Cal	Pap	Mac	Pan	Hom
Str1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		-				-
Str2						+	+				+			-	-	
Str3						+	+				+		-		-	-

Madagaskar-Monophylie

Lokus	Mic	Che	Lep	Pro	Lem	Dau	Nyc	Per	Gal	Oto	Ges	Cal	Hom
Mad1		+	+	+	+	+		-	-	-	-	-	-
Mad2	+		+	+	+	+	-			-			-

Lokus	Mic	Mir	All	Che	Pha	Lep	Pro	Ava	Lem	Hap	Eul	Var	Dau	Nyc	Per	Gal	Cal	Pap	Mac	Pan	Hom		
Ind3	-					-	+	+	-													-	
Lem1	-					-	-		+	+	+	+											
Lem2	-					-	-		+	+	+	+											-
Lem3	-					-	-		+	+	+	+											-
Lem4	-					-	-		+	+	+	+											-
HLE1									+	+	+	-											
HL1									+	+	-	-											-
HL2									+	+	-	-											
HL3									+	+	-	-											-

Anwesenheit von Integrationen ist durch „+“ gekennzeichnet; Abwesenheit dagegen mit „-“.

Abkürzungen bezeichnen untersuchte Gattungen: Mic: *Microcebus*, Mir: *Mirza*, All: *Allocebus*, Che: *Cheirogaleus*, Pha: *Phaner*, Lep: *Lepilemur*, Pro: *Propithecus*, Ava: *Avahi*, Lem: *Lemur*, Hap: *Hapalemur*, Eul: *Eulemur*, Var: *Varecia*, Dau: *Daubentonia*, Nyc: *Nycticebus*, Lor: *Loris*, Per: *Perodicticus*, Arc: *Arctocebus*, GM: *Galago moholi*, GS: *Galago senegalensis*, GZ: *Galago zanzibaricus*, Gal: *Galago*, Oto: *Otolemur*, Ges: *Galagoides*, Cal: *Callithrix*, Pap: *Papio*, Mac: *Macaca*, Pan: *Pan*, Hom: *Homo*

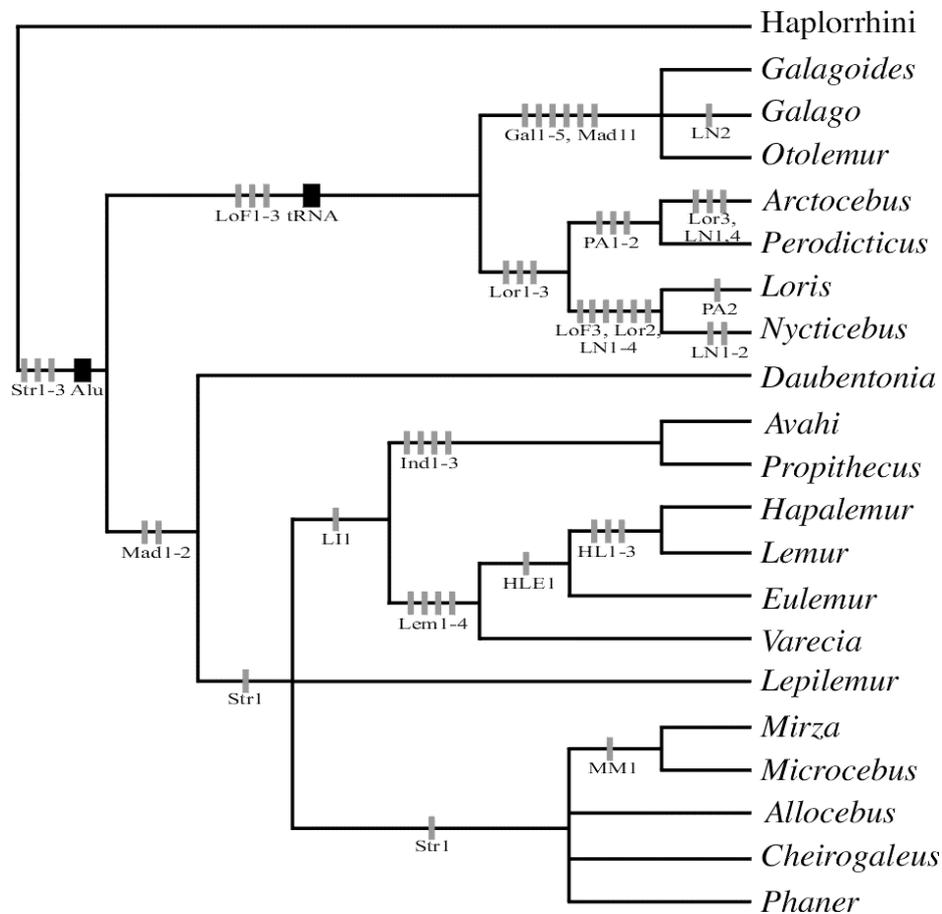


Abbildung 12: Phylogenetische Position der Marker. Schwarze Blöcke bezeichnen Multi- (Southern Blot-Analysen), die grauen Balken dagegen die Mono-Lokus-Marker (siehe Tab. 3).

3.3.3. Berechnung von Aufspaltungszeiten

Die Basis für die Datierung von Aufspaltungsereignissen stellte ein verkleinerter Datensatz mit 34 Taxa dar. Um mögliche Unterschiede in der Sequenzevolution des vorliegenden Datensatzes zu erkennen, wurde der relative Raten-Test in RRTree sowie für alle ML-Rekonstruktionen der Molecular Clock Likelihood Ratio Test in PUZZLE durchgeführt. Da die ersten beiden Positionen der Kodons meist selektioniert sind und zudem der relative Raten-Test teilweise signifikante Unterschiede in den Raten ($P < 0,05$) einzelner Linien aufzeigte, wurden für die Datierung ausschließlich dritte Positionen verwendet. Weiterhin ergaben die in PUZZLE durchgeführten Tests, daß die Sequenzevolution der dritten Positionen einer molekularen Uhr entspricht (Annahme molekulare Uhr: $\log L -9360,69$; Annahme keine molekulare Uhr: $\log L -9339,19$) und somit der Datensatz zur Datierung geeignet ist. Die dafür verwendeten Kantenlängen wurden in PUZZLE unter Vorgabe der aus mitochondrialen und retropositionellen Daten ermittelten Baumtopologie und des HKY-Modells berechnet und die Aufspaltungszeiten anschließend manuell kalkuliert.

Da kaum Fossilfunde den Ursprung der Primaten bzw. der Halbaffen belegen, gibt es keine klaren Referenzpunkte, die einen Ausgangspunkt für Datierungen liefern könnten. In bisherigen Arbeiten wurde eine Verzweigung von Loriformes und madagassischen Formen auf etwa 61 Millionen Jahre (Mio) geschätzt (Yoder et al., 1996b). Basierend auf den wenigen Fossilfunden und statistischen Berechnungen geht man jedoch heute davon aus, daß der letzte gemeinsame Vorfahr der Halbaffen bereits vor etwa 80 Millionen Jahre gelebt haben muß (Martin, 2003; Tavaré et al., 2002). Da keine eindeutigen Referenzpunkte vorhanden sind, wurden die Bäume in dieser Arbeit mit 50, 61 und 80 Mio kalibriert. Nimmt man diese Zeiten für die Aufspaltung von Loriformes und madagassischen Formen an, ergibt sich für die dritten Positionen des Cytochrom b Gens eine Evolutionsrate von $24,12 \times 10^{-9}$, $19,77 \times 10^{-9}$ und $15,08 \times 10^{-9}$ Substitutionen/Position/Jahr.

Demnach kann es nach der Trennung von Loriformes und den beiden anderen Infraordnungen vor etwa 61 (50-80) Millionen Jahren (Mio) zu einer ersten Verzweigung auf Madagaskar vor 53 (44-70) Mio in die zwei Infraordnungen Lemuriformes und Chiromyiformes

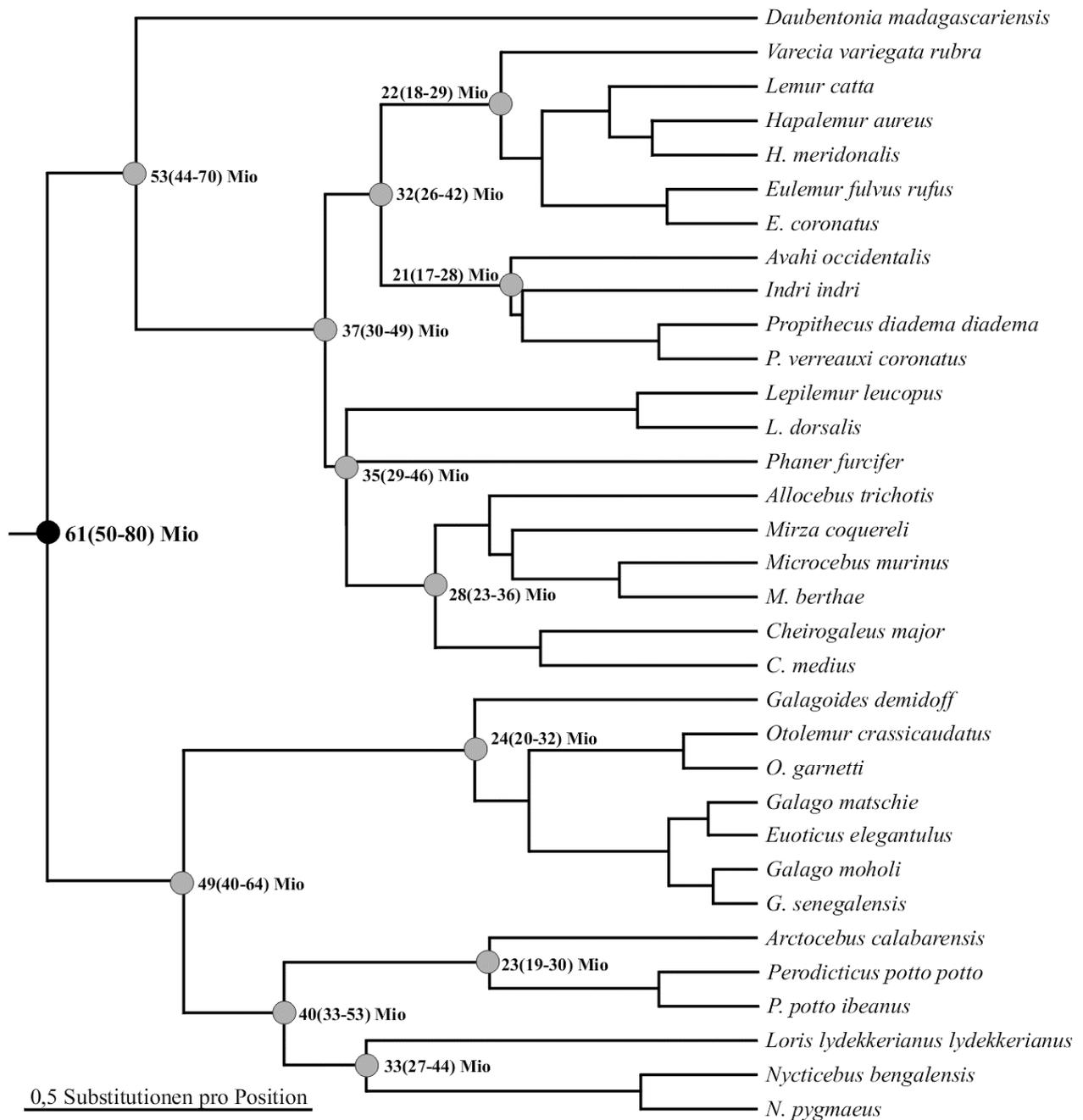


Abbildung 13: Aufspaltungszeiten errechnet anhand eines ML-Baumes. Der schwarze Kreis gibt die Referenzwerte; die grauen Kreise die ermittelten Zeitpunkte für die jeweiligen letzten gemeinsamen Vorfahren an.

(Abb. 13). Die Lemuriformes teilten sich dann vor etwa 37 (30-49) Mio in die zwei Gruppen Lepilemuridae/Cheirogaleidae und Indriidae/Lemuridae auf. Die Aufspaltung in die einzelnen Familien fand kurz danach vor etwa 35 (29-46) Mio bzw. 32 (26-42) Mio statt. Innerhalb der Cheirogaleidae muß es zu einer sehr baldigen Abspaltung der Gattung *Phaner* gekommen sein, da die Trichotomie zwischen *Phaner*, allen anderen Cheirogaleidae und *Lepilemur* nicht

aufgelöst ist. Der letzte gemeinsame Vorfahr der übrigen Cheiroglaeidae-Gattungen lebte dagegen erst vor etwa 28 (23-26) Mio; vergleichbar mit denen der Lemuridae (22 (18-29) Mio) und Indriidae (21 (17-28) Mio). Innerhalb der Loriformes kam es vor etwa 49 (40-64) Mio zu einer Verzweigung in die beiden Familien Galagonidae und Loridae. Die letzten gemeinsamen Vorfahren der jeweiligen Familien lebten vor 24 (20-32) Mio und 40 (33-53) Mio. Die asiatischen Vertreter unterteilten sich schließlich vor etwa 33 (27-44) Mio in die beiden Gattungen *Loris* und *Nycticebus* und somit deutlich früher als die beiden afrikanischen Gattungen (23 (19-30) Mio).

3.4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals alle anerkannten Gattungen und eine Vielzahl an Halbaffen-Arten molekulargenetisch untersucht. Die beiden kombinierten Methoden erbrachten überwiegend identische und eindeutige Ergebnisse, so daß einige wichtige Fragen ihrer Evolutionsgeschichte geklärt werden konnten.

Mit den mitochondrialen Daten von 145 Individuen wurden phylogenetische Stammbäume errechnet. Die auf unterschiedlichen Algorithmen und Sequenzevolutionsmodellen basierenden Rekonstruktionen zeigten identische Baumtopologien und konnten die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen mit überwiegend hoher statistischer Unterstützung auflösen. Ins besondere traf dies auf Verwandtschaftsverhältnisse zwischen nah verwandten Taxa zu, wogegen die der tieferliegenden Verzweigungen meist nur schwach unterstützt wurden oder gar zu fraglichen Konstellationen, wie die zwischen Galagonidae, afrikanischen und asiatischen Loridae führten. Ein möglicher Grund hierfür könnten die vermuteten Radiations-artigen Aufspaltungen einiger Gruppen sein (Yoder, 1997), die mit den vorliegenden Daten nur schwer aufgelöst werden können. Weiterhin ist zu beachten, daß die zwischen Gattungen stark variierende Basenzusammensetzungen des Cytochrom b Gens, die auf einen Mitochondrien-spezifischen, gerichteten Mutationsdruck zurück zuführen ist, einen möglichen Einfluß auf Stammbaumrekonstruktionen ausübt, wodurch es zu artifiziellen Gruppierungen von phylogenetisch nicht verwandten Taxa aufgrund ähnlicher

Basenzusammensetzungen kommen kann (Schmitz et al., 2002b; Tarrío et al., 2001). Da aber nur geringe Unterschiede in der Basenzusammensetzung innerhalb von Gattungen entdeckt wurden, dürften diese kaum Auswirkungen auf die erstellten Phylogenien nah verwandter Taxa haben.

Die auf den mitochondrialen Sequenzdaten basierenden Stammbaumrekonstruktionen wurden somit überwiegend zur Klärung phylogenetisch jüngerer Verzweigungen eingesetzt. Zudem dienten sie der Datierung von Aufspaltungszeiträumen und der Erstellung einer vorläufigen Hypothese für tiefer liegende Verzweigungen. Mit der Analyse von Transpositionseignissen, die Spezies-übergreifend auf ihre Repräsentanz innerhalb der Primaten hin getestet wurden, sollten die auf mitochondrialen Daten basierenden Phylogenien überprüft werden. Aufgrund des rein zufälligen und nicht revertierbaren Integrationsverhaltens und der damit verbundenen eindeutigen Merkmalspolarität, wurden die durch SINE-Transpositionen belegten Verwandtschaftsverhältnisse als wahre Phylogenie gewertet und somit von ihrer Aussagekraft her über die durch mitochondriale Daten ermittelten Verwandtschaftsbeziehungen gestellt. Zudem wurden keine Ungleichverteilungen von ursprünglich polymorphen Markern in Folgelinien („Incomplete Lineage Sorting“) aufgedeckt, so daß mit diesem Markersystem keine widersprüchlichen Phylogenien erzielt wurden.

Phylogenie und Taxonomie der Strepsirrhini

Der gemeinsame Ursprung der Halbaffen konnte klar anhand von vier Markern belegt werden. Obwohl die Monophylie der Lemuriformes und Loriformes durch Sequenzinformation und SINE-Transpositionen ebenfalls bewiesen ist, konnten die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den drei Infraordnungen durch mitochondriale Daten nur angedeutet werden. Die dabei erhaltenen Hinweise auf eine Schwestergruppenbeziehung der beiden madagassischen Gruppen Chiromyiformes und Lemuriformes wurden aber durch zwei kladistische Marker eindeutig belegt und konnten somit die vermutete Phylogenie bestätigen (Dene et al., 1976; Dutrillaux, 1988; Martin, 2000; Porter et al., 1995; Yoder et al., 1996a,b).

Die Klärung der Aufspaltungsfolge innerhalb der Lemuriformes war aber, wie in bisherigen Arbeiten auch, mit keiner der beiden Methoden möglich. Lediglich ein Marker, der eine enge Verwandtschaft von Lemuridae und Indriidae belegt, konnte ermittelt werden. Da bisher nur wenige Indizien für einen gemeinsamen Ursprung der beiden einzigen rein solitären und zumindest teilweise tagaktiven (mit Ausnahme von *Avahi*) Halbaffen-Familien beschrieben sind (DelPero et al., 2001; Dene et al., 1976), stellt der hier gefundene Marker eine wichtige Basis für die Untersuchung der Entstehungsgeschichte von Sozialität und Tagaktivität innerhalb der Halbaffen dar.

Die Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Familien und Gattungen konnten mit den beiden Methoden meist gut aufgelöst werden und stimmten überwiegend mit bereits publizierten Daten überein (DelPero et al., 2001; Dutrillaux, 1988; Fausser et al., 2002; Pastorini et al., 2000; Pastorini et al., 2001a,b; Pastorini et al., 2002; Pastorini et al., 2003; Rumpler, 2000; Rumpler et al., 1994; Wyner et al., 2000; Yoder, 1994; Yoder & Irwin, 1999; Yoder et al., 1996a,b; Yoder et al., 2000).

Die Familie Lemuridae unterteilt sich in vier Gattungen, wobei *Varecia* die tiefste Verzweigung darstellt und die Trennung von *Hapalemur* und *Lemur* zu letzt stattfand (DelPero et al., 2001; Pastorini et al., 2002, 2003; Wyner et al., 2000; Yoder, 1994; Yoder et al., 1996a,b). Die Monophylie von *Hapalemur* ist nur schwach unterstützt und bestätigt somit frühere Ergebnisse (Pastorini et al., 2002, 2003). Möglicherweise haben sich die drei Linien, *Lemur*, *H. simus* und alle anderen *Hapalemur* sp. innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne voneinander getrennt, so daß die genauen Verwandtschaftsverhältnisse nicht nachvollzogen werden können. Nach der frühen Abspaltung von *H. simus*, stellt *H. aureus* die nächste Abzweigung innerhalb von *Hapalemur* dar. Die restlichen Formen, die ursprünglich alle als Unterarten von *H. griseus* anerkannt wurden (Warter et al., 1987), unterteilen sich weiterhin in die monotypische Art *H. meridionalis* und *H. griseus*, in der alle weiteren Unterarten vereint sind (Fausser et al., 2002). Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den fünf *Eulemur*-Arten konnten in dieser Studie nicht geklärt werden. Im Gegensatz dazu ergab der Datensatz aber zumindest klare Hinweise auf die Abspaltungsfolge der *E. fulvus*-Unterarten, die sich in vier Hauptgruppen (*collaris*, *rufus* 1,

rufus 2, *albifrons*) unterteilen. Die dabei beobachtete Paraphylie von *E. f. rufus* wird durch publizierte Daten bestätigt (Pastorini et al., 2000, 2003) und aufgrund einiger Unterschiede in Fellfärbung zwischen den Formen wird vorgeschlagen, die südlichen *E. f. rufus* als *E. f. rufifrons* (Bennett, 1833) abzutrennen (Roos & Ostner, in Präp.). Die untersuchten Haplotypen von *Varecia* ergaben eine unerwartete Paraphylie der schwarz-weißen Form, wobei die nördlichste davon (*V. v. subcincta*) und *V. v. rubra* die rezenteste Verzweigung bilden und alle anderen schwarz-weißen Vertreter Schwestergruppen dazu darstellen.

In der Familie Indriidae sind drei Gattungen anerkannt, deren phylogenetische Beziehungen auch in dieser Arbeit nicht mit Sicherheit geklärt werden konnten. Obwohl eine angezeigte Schwestergruppenbeziehung von *Indri* und *Propithecus* Ergebnisse aus Chromosomenanalysen (Dutrillaux, 1988) bestätigen, ist die statistische Unterstützung für diese Konstellationen gering oder gar nicht vorhanden. Die Verhältnisse zwischen den *Propithecus*-Arten sind dagegen eindeutig belegt. So spaltet sich die Gattung in zwei sehr unterschiedliche Gruppen *P. diadema* und *P. verreauxi/P. tattersalli* auf, wobei *P. verreauxi* paraphyletisch ist und *P. v. coquereli* die Schwestergruppe zu *P. tattersalli* bildet. Da diese Konstellation auch durch weitere mitochondriale Daten bestätigt wird (Pastorini et al., 2000a, 2003), können Artefakte ausgeschlossen werden. Bereits in der Beschreibung von *P. tattersalli* wird darauf hingewiesen, daß diese Art Merkmale von *P. verreauxi* und *P. diadema* zeigt und es sich somit um eine mögliche Hybridform handeln könnte (Simons, 1988). Da bisher ausschließlich maternal vererbte Marker untersucht wurden, konnte diese Hypothese aber bisher nicht überprüft werden.

Eine der artenreichsten Familien der Halbaffen stellen die Cheirogaleidae dar, die traditionell in fünf Gattungen unterteilt werden (Groves, 2001). Trotz der teilweise schlechten Auflösung durch die jeweiligen Methoden ergaben beide in Kombination ein klares Bild der Cheirogaleidae-Evolution, welches mit bereits publizierten Phylogenien übereinstimmt (Pastorini et al., 2001b; Rumpler et al., 1994). Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen hat sich demnach zuerst *Phaner* abgetrennt. Später spaltete sich *Cheirogaleus* und *Allocebus* ab, wobei *Mirza* und *Microcebus* sich zuletzt voneinander trennten. Aufgrund der großen

genetischen Distanz zwischen *Phaner* und anderen Cheirogaleidae-Gattungen (19,12-21,23%) und den unterschiedlichen Chromosomenzahlen (*Phaner*: $2n=46$; alle anderen Gattungen: $2n=66$) (Rumpler & Albignac, 1973) wird vorgeschlagen, *Phaner* als eigene Familie Phaneridae von anderen Cheirogaleidae-Gattungen abzutrennen (Roos et al., in Präp.). Die phylogenetischen Konstellationen innerhalb der Gattungen konnten überwiegend aufgelöst werden und bestätigten größtenteils die publizierten Daten (Pastorini et al., 2001b, 2003; Yoder et al., 2000). So wurden in der vorliegenden Studie erstmals vier unterschiedliche Formen von *Cheirogaleus* untersucht, deren Verwandtschaftsverhältnisse nur bedingt gelöst werden konnten. Die genetischen Distanzen zeigen aber, daß die Vielfalt von *Cheirogaleus* nicht nur durch zwei (Tattersall, 1982), sondern durch mehrere Arten repräsentiert wird (Groves, 2000). Ähnliches gilt für die Gattungen *Mirza* (Kappeler et al., in Präp) und *Microcebus* (Yoder et al., 2000), welche traditionell in zwei Arten (*M. rufus*, *M. murinus*) unterteilt wurde. Durch detaillierte Studien in den letzten Jahren wurde aber *Microcebus* um sechs Arten erweitert (Rasoloarison et al., 2000; Schmid & Kappeler, 1994; Zimmermann et al., 1998). Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den acht Arten können mit vorliegendem Datensatz überwiegend gut aufgelöst werden. So spaltet sich die Gattung in eine Gruppe mit *M. murinus* und *M. griseorufus* und einer weiteren, in der alle anderen Arten vereinigt sind, auf. Nach Separierung von *M. ravelobensis* und *M. tavaratra*, verzweigt sich die letztere Gruppe in zwei weitere Teilbereiche mit einerseits *M. sambiranensis* und *M. rufus* aus Tampolo und andererseits mit *M. rufus* aus Ranomafana und Andasibe, *M. berthae* und *M. myoxinus*.

Die Familie Lepilemuridae mit der einzigen Gattung *Lepilemur* ist bis heute wenig erforscht und die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Arten nur ansatzweise bekannt. In dieser Studie konnten fünf der sieben derzeit anerkannten Arten untersucht und ihre phylogenetischen Verhältnisse zueinander klar aufgelöst werden. Die ermittelten Ergebnisse liefern Hinweise auf eine erste Aufspaltung in die nördlichen (*L. septentrionalis*, *L. dorsalis*) und westlichen/südlichen Formen (*L. edwardsi*, *L. ruficaudatus*, *L. leucopus*), sowie eine basale Position von *L. leucopus* innerhalb letzter Gruppe. Die so dargestellte Phylogenie erscheint zwar

aus biogeographischer Sicht sinnvoll, kann aber die auf Chromosomen-Analysen basierenden Verhältnisse nicht bestätigen (Rumpler, 2000).

Innerhalb der Loriformes konnten die Verwandtschaftsbeziehungen mit Sequenzdaten und kladistischen Markern sehr gut aufgeschlüsselt werden. Trotz der klaren morphologischen (Rasmussen & Nekaris, 1998) und chromosomalen (Dutrillaux & Rumpler, 1995) Unterschiede zwischen Loridae und Galagonidae konnten bisherige molekulare Studien (Dene et al., 1976; Goodman et al., 1998; Yoder et al., 2001) die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Galagonidae, asiatischen und afrikanischen Loridae nicht auflösen. Ebenso war lange Zeit unklar, welche Rolle Morphologie und Biogeographie innerhalb der Loridae-Evolution spielt. Basierend auf den unterschiedlichen Morphotypen gruppierte Hill (1947) und Schwartz (1992) die beiden robusten (*Perodicticus*, Afrika; *Nycticebus*, Asien) und grazilen Formen (*Arctocebus*, Afrika; *Loris*, Asien), wogegen Groves (1971) die Vertreter der jeweiligen Kontinente zusammenfaßte, was durch bisherige molekulargenetische Arbeiten nachvollzogen werden konnte (Dene et al., 1976; Goodman et al., 1998; Yoder et al., 2001). Obwohl die hier verwendeten mitochondrialen Sequenzen eine Schwestergruppenbeziehung von afrikanischen Loridae-Vertretern und Galagonidae zum Ausschluß asiatischer Loridae andeuten, konnte mit Hilfe von drei SINE-Integrationen eindeutig die Monophylie der Loridae bewiesen werden. Innerhalb der Loridae fanden sich weitere kladistische Marker, die die jeweiligen Schwestergruppenbeziehungen von afrikanischen und asiatischen Vertreter eindeutig belegen. Die analysierten Loridae repräsentieren alle wichtigen geographischen Formen von *Loris*, *Nycticebus* und *Perodicticus*. Die Plumploris-Vertreter spalten sich in fünf sehr unterschiedliche Gruppen auf, deren phylogenetische Beziehungen zueinander statistisch gut gestützt sind. Als erste Form spaltet sich demnach der Zwerg-Plumploris *N. pygmaeus* ab, gefolgt von *N. coucang* und *N. menagensis*, wogegen die rezenteste Aufspaltung zwischen *N. javanicus* und *N. bengalensis* stattfand. Bei den Schlankloris ist eine klare Unterteilung in die zwei Arten *L. tardigradus* und *L. lydekkerianus* zu erkennen. Bemerkenswert ist jedoch die geringe Variabilität innerhalb der Arten, so daß eine Unterscheidung von beschriebenen Unterarten nicht möglich ist. Die untersuchten Pottos sind in dieser Studie durch alle drei Unterarten (Groves, 2001) vertreten,

von denen die westliche Form *P. p. potto* die Schwestergruppe zu den zentralafrikanischen *P. p. edwardsi* und *P. p. ibeanus* darstellt.

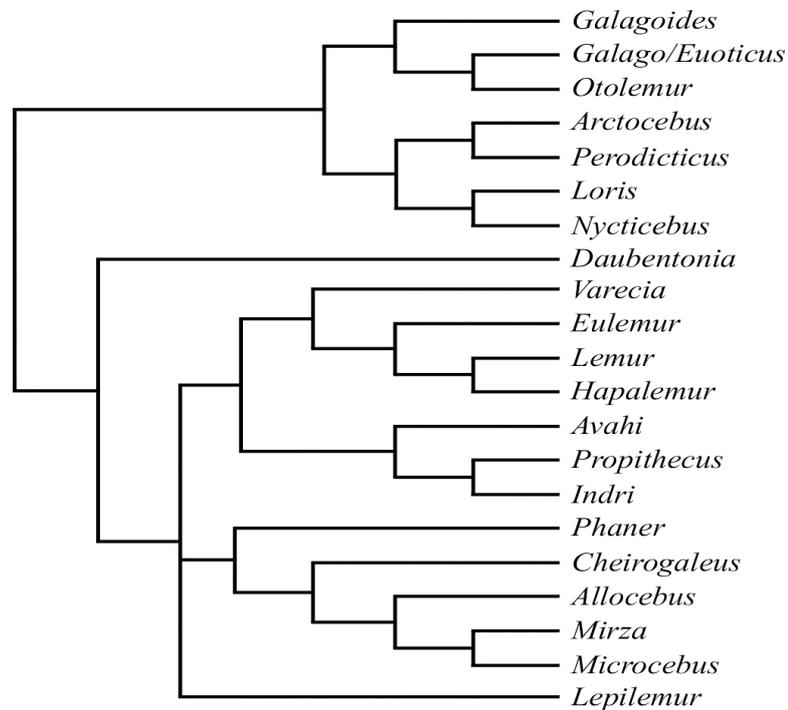


Abbildung 14: Ermittelte phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Strepsirrhini-Gattungen.

Die zweite Familie der Loriformes bilden die Galagonidae, deren Monophylie überwiegend anerkannt ist und auch in dieser Arbeit durch Sequenzdaten und sechs molekular-kladistische Marker belegt wurde. Die Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Galagonidae und ihre Systematik sind aber bis heute nahezu ungeklärt und werden durch Beschreibungen einiger neuer Arten immer undurchsichtiger (Honest, 1996, 1997). Bisherige Studien aus unterschiedlichsten Forschungsdisziplinen brachten eine Reihe von Phylogenien hervor (Crovella et al., 1994; de Boer, 1973; DelPero et al., 2000; Eaglen, 1980; Groves, 2001; Masters et al., 1994; Nash et al., 1989; Olson, 1979; Yoder et al., 2001; Zimmermann, 1990), die sich häufig in ihren Ergebnissen unterschieden und somit kaum zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse beitrugen. Mit der Analyse von 15 Taxa konnte in dieser Arbeit aber erstmals ein statistisch gut unterstütztes Grundgerüst für weitere Studien erstellt werden. Die untersuchten Arten trennen sich in drei Spezies-Gruppen oder Gattungen auf. Als erste davon spaltete sich *Galagoides* ab, in der vier sehr unterschiedliche Taxa untersucht wurden. Da

nur von zwei Individuen die Herkunft bekannt ist, sind Aussagen über weitere Verwandtschaftsverhältnisse aber kaum möglich. In der zweiten Gruppe vereinigen sich zwei jeweils monophyletische Gruppen mit einerseits *O. garnetti* und *O. crassicaudatus* und andererseits mit den Vertretern der *G. alleni*-Gruppe *G. cameronensis* und *G. gabonensis*. Die letzte Gruppe enthält alle übrigen Taxa, die sich in weitere drei Untergruppen unterteilen. Die erste, die sich von den anderen abtrennt, enthält *G. zanzibaricus* und *G. granti*, wobei die anderen beiden aus *G. matschie* und *Euoticus elegantulus* und aus *G. senegalensis* und *G. moholi* bestehen.

Ursprung und Biogeographie der Strepsirrhini

Durch die Kombination der beiden verwendeten Methoden konnten erstmals die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Halbaffen eindeutig geklärt und somit ein grundlegendes Fundament für die Analyse von biogeographischen Zusammenhängen innerhalb der Strepsirrhini geschaffen werden.

Um aber die erstellten Phylogenien und daraus abgeleiteten Verbreitungsmuster in Zusammenhang mit geologischen und klimatischen Veränderungen zu bringen, müssen ebenfalls die Aufspaltungszeiten zwischen den zu analysierenden Gruppen bekannt sein. In Bezug auf die Halbaffen gestaltet sich dies als schwierig, da es kaum Fossilfunde gibt, die einen sinnvollen Referenzwert zur Kalibrierung molekularer Uhren abgeben könnten. Mit Ausnahme einiger Subfossilien (z.B: *Megaladapis*, *Pachylemur*) wurden auf Madagaskar bisher keine Primaten-Fossilien gefunden. Bei den Loriformes gibt es zwar einige, jedoch stammen diese überwiegend aus dem Miozän (McCrossin, 1992; Philips & Walker, 2002; Simpson, 1967). Durch die Entdeckung zweier etwa 37-41 Millionen Jahre alter Fossilien (*Karanisia*, *Saharagalago*) in Ägypten geht man heute von einem älteren Ursprung der Loriformes aus (Seiffert et al., 2003). Ursprünglich schätzte man das Alter des letzten gemeinsamen Vorfahr aller Primaten auf 55-63 Mio (Gingerich & Uhen, 1994; Kay et al., 1997; Shoshani et al., 1996), ein Zeitraum, der häufig zur Kalibrierung molekularer Phylogenien verwendet wurde (Goodman et al., 1998; Porter et al., 1995, 1997; Schneider et al., 1993, 1996; Yoder, 1997). Aufgrund der wenigen Fossilfunde ist

jedoch anzunehmen, daß dieser sehr viel weiter zurückliegt (Martin, 2000; Martin, 2003). Mit einer vergleichenden Analyse mitochondrialer Daten von Primaten und anderen Säugern und einer Kalibrierung mit den Aufspaltungszeiten zwischen Artiodactyla/Cetacea (60 Mio) und Rhinocerotidae/Equidae (50 Mio) wurde die Trennung von Strepsirrhini und Haplorrhini auf etwa 80 Mio geschätzt (Arnason et al., 1996, 1998). Weitere Daten, die auf nukleären Genen basierten, zeigten, daß die Abspaltung der Primaten von anderen Säugerordnungen vor etwa 90 Mio stattfand (Hedges et al., 1996; Kumar & Hedges, 1998). Zudem wurde mit statistischen Methoden errechnet, daß erst etwa 7% aller jemals gelebten Primaten von Fossilien her bekannt sind und daß der letzte gemeinsame Vorfahr der beiden Primaten-Unterordnungen vor 81,5 Mio gelebt haben muß (Tavaré et al., 2002). Aufgrund der großen Unklarheiten bezüglich des Ursprungs der Primaten wurde in dieser Studie der traditionell angenommene Zeitpunkt von 61 Mio (Yoder et al., 1996b), sowie der minimale (50 Mio) und maximale (80 Mio) Zeitpunkt für die Aufspaltung von Lemuriformes und Loriformes als Kalibrierungswert verwendet (Martin, 2003).

Dem zu Folge kam es nach der Aufspaltung von madagassischen Formen und Loriformes vor etwa 61 (50-80) Mio auf Madagaskar zu einer frühen Abtrennung des Fingertieres (*Daubentonia*, Chiromyiformes) von den Lemuriformes vor etwa 53 (44-70) Mio. Die Infraordnung der Lemuriformes untergliederte sich schließlich vor 37 (30-49) Mio in die beiden Linien Cheirogaleidae/Lepilemuridae und Lemuridae/Indriidae, die sich dann vor 35 (29-46) Mio bzw. 32 (26-42) Mio in die jeweiligen Familien aufspalteten. Da die Verhältnisse zwischen *Phaner*, anderen Cheirogaleidae und *Lepilemur* nicht aufgelöst werden können, hat sich *Phaner* vermutlich sehr früh von den anderen Cheirogaleidae abgetrennt. Der letzte gemeinsame Vorfahr der restlichen Cheirogaleidae-Gattungen dagegen lebte noch vor etwa 28 (23-36) Mio; vergleichbar mit denen der Lemuridae (22 (18-29) Mio) und Indriidae (21 (17-28) Mio). Die Loriformes unterteilten sich vor etwa 49 (40-64) Mio in die beiden Familien Galagonidae und Loridae. Die Aufspaltung der Familien fand vor etwa 24 (20-32) Mio (Galagonidae) und 40 (33-53) Mio (Loridae) statt. Schließlich verzweigten sich die afrikanischen Gattungen der Loridae vor etwa 23 (19-30) Mio, also deutlich später als die asiatischen Gattungen (33 (27-44) Mio). Da

die hier errechneten Aufspaltungszeiten überwiegend mit denen aus anderen Arbeiten (Porter et al., 1997; Yoder et al., 1996a,b; Yoder, 1997) übereinstimmen, kann davon ausgegangen werden, daß die vorliegenden Daten ein reales Bild der Evolutionsgeschichte widerspiegeln. Ausgenommen jedoch sind die sehr unterschiedlichen Datierungen für den letzten gemeinsamen Vorfahr von Galagonidae und Loridae, der auf 23 Mio (Porter et al., 1997) oder 50-55 Mio (Yoder, 1997) geschätzt wird. Insgesamt sollten aber alle errechneten Zeiten nur als grober Anhaltspunkt gewertet werden, da aufgrund der Unklarheiten bezüglich des Ursprungs der Primaten bereits eine Kalibrierung kaum möglich ist.

Prinzipiell kommen als Ursprungsgebiete der Halbaffen die beiden Kontinente Afrika und Asien sowie die Insel Madagaskar in Frage. Nach dem Minimalprinzip scheidet jedoch Asien aus, da die Besiedelung der anderen beiden Landmassen nur durch drei Auswanderungen erklärt werden kann. So hätte zuerst Madagaskar besiedelt werden müssen, später dann Afrika durch einen Vorfahr der Galagonidae und kurze Zeit darauf nochmals durch *Arctocebus/Perodicticus*. Ebenso unwahrscheinlich ist Madagaskar als Ursprungsgebiet der Strepsirrhini, da es keine Hinweise darauf gibt, daß außer Halbaffen und Menschen jemals andere Primaten auf dieser Insel vorkamen (Yoder, 1997). Außerdem gibt es auf Madagaskar insgesamt nur vier Säugetierordnungen (Carnivora, Primates, Rodentia und Insectivora), wobei für die madagassischen Carnivora bereits ein gemeinsamer Ursprung und eine afrikanische Abstammung nachgewiesen werden konnte (Yoder et al., 2003). Somit erscheint eine Kolonialisierung Madagaskars von außerhalb her auch für Primaten am wahrscheinlichsten. Als dritte Möglichkeit kommt Afrika in Frage. Die Besiedlungen der anderen beiden Landmassen von Afrika aus können durch zwei Auswanderungswellen erklärt werden. Eine erste hätte dabei die Kolonialisierung Madagaskars, die zweite die Asiens zum Ziel gehabt. Nach dem Minimalprinzip erscheint diese Option als die plausibelste.

Obwohl die prinzipielle Frage nach dem Ursprung der Halbaffen somit geklärt ist, bleibt offen, wie die Besiedelung der beiden anderen Landmassen ermöglicht wurde. Da die Halbaffen vor etwa 61 (50-80) bis 53 (44-70) Mio auf Madagaskar eintrafen und die Insel bereits seit dem Auseinanderbrechen von Gondwanaland vor 165 Mio (Rabinowitz et al., 1983) von Afrika

getrennt war und auch vor etwa 78 Mio die Verbindung mit dem indischen Subkontinent (Storey et al., 1995) verlor, kann eine Invasion Madagaskars noch während eine Kontinentalverbindung bestand, ausgeschlossen werden. Die Überquerung der mehr als 400 km breiten und meist 2000 m tiefen Straße von Mozambique mußte somit auf anderem Wege gemeistert werden. Möglicherweise besiedelten die Halbaffen Madagaskar, indem sie sich während einer Meeresabsenkung von Insel zu Insel fortbewegten (Tattersall, 1982) oder gar trockenen Fußes über eine bestehende Landbrücke vor 26-45 Mio wanderten (McCall, 1997). Da man im Falle einer existierenden Landbrücke eine sehr viel höhere Artenvielfalt auf Madagaskar erwarten würde (Yoder et al., 2003) und zudem keine eindeutigen geologischen Beweise für die Existenz dieser Landbrücke vorliegen, gilt dieses Szenario als eher unwahrscheinlich (Kappeler, 2000; Krause et al., 1997). Eine weitere Möglichkeit der Kolonialisierung Madagaskars wird in der „Rafting“-Theorie beschrieben, wonach Halbaffen auf schwimmenden Vegetationsinseln in Richtung Madagaskar gedriftet wären (Jolly, 1980; Warren & Crompton, 1996). Gestützt wird diese Theorie durch einige Eigenheiten der Halbaffen, insbesondere der Cheirogaleidae, die von ihrem Verhalten und physiologischen Besonderheiten her dem Vorfahr aller Halbaffen vermutlich am nächsten stehen (Kappeler, 2000). So verfallen Maus- und Katzenmakis in einen monatelangen Winterschlaf, wobei sich bis zu 15 Individuen in einem Baumloch versammeln (Fietz, 1999; Radespiel et al., 1998). Weiterhin besitzen die Cheirogaleidae ein ähnliches Blutversorgungssystem des Großhirns (Arteria pharyngea) wie die Loriformes (Charles-Dominique & Martin, 1970; Martin, 1990), was ebenfalls für die Ursprünglichkeit dieser Familie spricht. Basierend auf diesen Besonderheiten ist es durchaus denkbar, daß Cheirogaleidae-ähnliche Primaten während ihres Winterschlafes auf einer schwimmenden Vegetationsinsel nach Madagaskar gedriftet sind.

Die zweite Auswanderung aus Afrika führte zu einer erfolgreichen Besiedelung Asiens vor mindestens 33 (27-44) Mio und maximal 40 (33-53) Mio durch einen Vorfahr von *Loris* und *Nycticebus*. Die kürzlich entdeckten Fossilien *Saharagalago* und *Karanisia* (Seiffert et al., 2003) lassen vermuten, daß die Auswanderung aus Afrika vor etwa 38 Mio stattfand; eine Schätzung die nur gering von den in dieser Arbeit ermittelten Werten abweicht. Da zwischen den beiden

Kontinenten keine großen Wasserbarrieren lagen, war der Weg nach Asien über Land meist möglich. Das größte Hindernis stellte dabei vermutlich das Tethysmeer dar, welches Afrika und Eurasien voneinander trennte. Möglicherweise wurde diese Barriere wie bei den madagassischen Vertretern ebenfalls auf driftenden Vegetationsinseln überquert (Kappeler, 2000). Die Verzweigung der asiatischen Loridae in die beiden Gattungen *Loris* und *Nycticebus* vollzog sich schließlich vor etwa 33 (27-44) Mio, wobei *Loris* nach Südindien und Sri Lanka wanderte und *Nycticebus* den gesamten südost-asiatischen Raum besiedelte. Die auf maximal 44 Mio geschätzte Aufspaltung der beiden Gattungen wäre somit etwa zeitgleich mit der Kollision des indischen Subkontinents mit Asien geschehen (etwa 42 Mio) (Patriat & Segoufin, 1988).

3.5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals alle Gattungen und ein weitreichendes Artenspektrum der Halbaffen molekulargenetisch untersucht. Mit dem Ziel phylogenetische Fragen innerhalb dieser Primaten-Unterordnung zu klären, wurden vollständige Sequenzen des mitochondrialen Cytochrom b Gens von 145 Individuen und 51 SINE-Integrationen analysiert. Die mit diesen beiden Methoden ermittelten Ergebnisse waren meist übereinstimmend und konnten eine Reihe von bisher unbeantworteten evolutionsbiologischen Fragen innerhalb der Halbaffen eindeutig beantworten. Ins besondere betrifft dies die nachgewiesene Schwestergruppenbeziehung von Chiromyiformes und Lemuriformes und der damit verbundenen Besiedelungsgeschichte Madagaskars, sowie die belegte Monophylie der Loridae und der jeweiligen Schwestergruppenbeziehung von afrikanischen und asiatischen Loridae-Vertretern. Basierend auf den rekonstruierten Phylogenien ist anzunehmen, daß der Ursprung der Halbaffen in Afrika lag und Asien und Madagaskar durch zwei Auswanderungsbewegungen von dort aus besiedelt wurden. Die erste davon, die die erfolgreiche Besiedelung Madagaskars zur Folge hatte, geschah vor 61-53 (44-80) Millionen Jahren (Mio); die zweite Auswanderung fand schließlich vor 33-40 (27-53) Mio statt und führte nach Asien.

4. Kapitel 2: Molekulare Phylogenie der Schlankaffen (Colobinae)

4.1. Einleitung

Die Schlankaffen stellen eine der beiden Unterfamilien der geschwänzten Altweltaffen (Cercopithecoidea) dar; sind aber durch eine Reihe anatomischer Merkmale deutlich von ihrer Schwestergruppe, den Cercopithecinaen getrennt. Die Hauptunterschiede zwischen den beiden Unterfamilien liegen in ihrer Ernährung und den damit verbundenen anatomischen Anpassungen. So besitzen Colobinae Molaren mit hohen, scharfen Scherkanten und einen mehrkammerigen Magen, der es ihnen erlaubt, Blätter, unreife Früchte oder Gräser zu verwerten. In ihrer äußeren Anatomie sind Schlankaffen vor allem durch ihre relativ langen Beine und Schwänze sowie verkürzte oder völlig fehlende Daumen gekennzeichnet; Merkmale die sich von der arborealen Lebensweise ableiten lassen (Geissmann, 2002a).

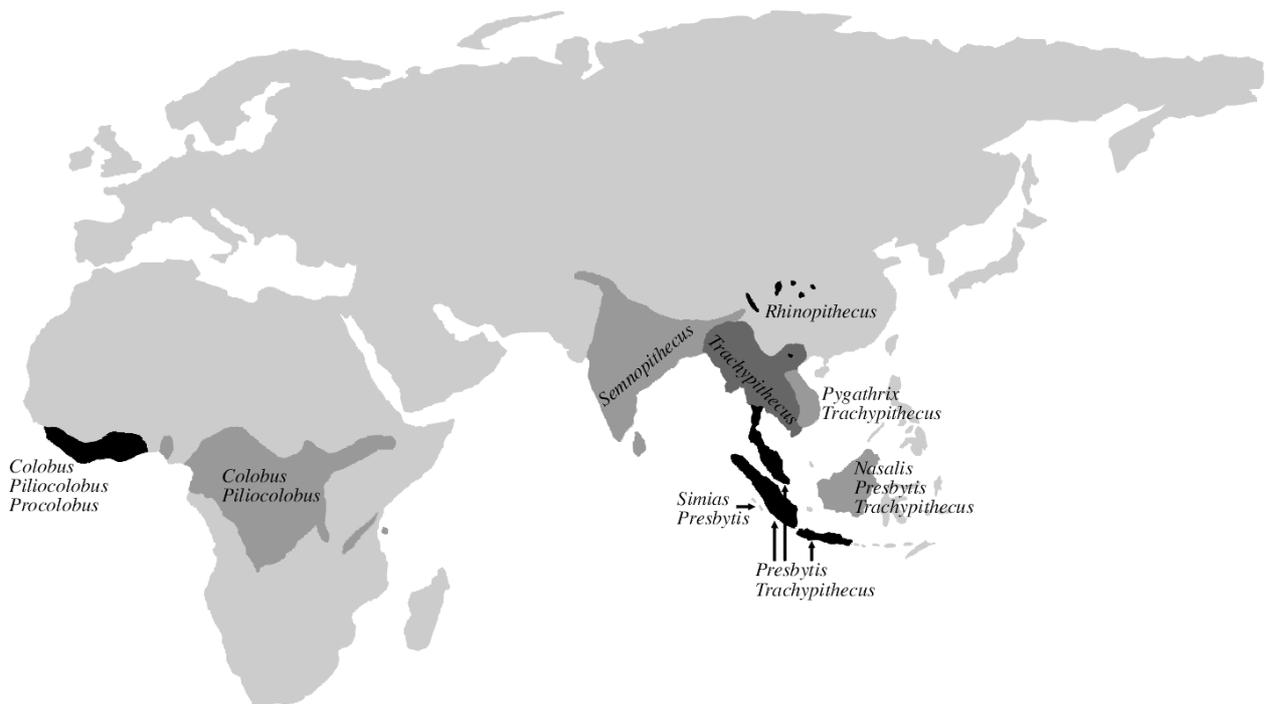


Abbildung 15: Verbreitung der Colobinae-Gattungen.

Die Colobinae sind über weite Teile Afrikas und Asiens verbreitet und werden in 38 (Rowe, 1996) bis 60 Arten (Geissmann, 2002a) unterteilt. Obwohl die Monophylie der Gruppe

weithin akzeptiert ist, gibt es innerhalb der Unterfamilie eine Reihe von unbeantworteten Fragen bezüglich ihrer Evolutionsgeschichte und Systematik. So werden die Schlankaffen zwar gewöhnlich in die asiatischen Presbytini oder Semnopithecini und die afrikanischen Colobini unterteilt (Napier, 1970; Oates et al., 1994; Szalay & Delson, 1979), jedoch gibt es auch Auffassungen, die *Nasalis* (Groves, 1989) oder *Procolobus* (Jablonski, 1998, 1999) als Schwestergruppe aller anderen Gattungen sehen und somit eine Paraphylie der asiatischen bzw. afrikanischen Vertreter zur Folge hätten.

Die asiatischen Colobinae (Presbytini) untergliedert man weiterhin in drei bis acht Gattungen, deren phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse und systematische Hierarchien unterschiedlich diskutiert werden. Prinzipiell können die Presbytini in zwei morphologisch sehr unterschiedliche Gruppen unterteilt werden. Eine davon umfaßt vier Gattungen (*Rhinopithecus*, *Pygathrix*, *Nasalis*, *Simias*), die durch besonders ungewöhnliche Nasenformen gekennzeichnet sind und deshalb im Englischen als „odd-nosed monkeys“ bezeichnet werden. Die phylogenetischen Verhältnisse zwischen den vier Gattungen und deren systematische Klassifizierung ist aber nicht eindeutig geklärt. So ist zwar die Schwestergruppenbeziehung von *Pygathrix* und *Rhinopithecus* sowie von *Simias* und *Nasalis* durch morphologische Merkmale belegt (Brandon-Jones, 1984), jedoch gibt es molekulare Daten, die auf eine enge Verwandtschaft von *Rhinopithecus* und *Nasalis* hindeuten (Zhang & Ryder, 1998). Neben den rein phylogenetischen Fragen ist auch die Taxonomie der vier Gattungen umstritten. Napier & Napier (1967) klassifizierten alle vier als Gattungen. Groves (1970) dagegen stufte *Rhinopithecus* und *Simias* als Untergattungen von *Pygathrix* und *Nasalis* ein. Je nach Autor wurde dann dieses System zumindest teilweise übernommen (Brandon-Jones, 1984; Oates et al., 1994; Rowe, 1996). Die zweite Gruppe der asiatischen Colobinae umfaßt vier Spezies-Gruppen, die traditionell in der einen Gattung *Presbytis* vereint wurden (Napier & Napier, 1967). Aufgrund größerer morphologischer Unterschiede wurden die vier Gruppen *Presbytis*, *Semnopithecus*, *Trachypithecus* und *Kasi* jedoch auch als Untergattungen (Reichenbach, 1862) oder gar Gattungen (Hill, 1934; Pocock, 1935) eingestuft, deren phylogenetische Beziehungen aber weiterhin ungeklärt blieben. Erste molekulare Studien lieferten Hinweise auf eine enge

Verwandtschaft von *Kasi* und *Semnopithecus* (Roos, 2003; Zhang & Ryder, 1998) und auf eine Schwestergruppenbeziehung von *Semnopithecus* und „odd-nosed monkeys“ zum Ausschluß von *Trachypithecus* (Zhang & Ryder, 1998), so daß die Monophylie der vier Spezies-Gruppen angezweifelt werden muß.

Die afrikanischen Colobinae werden in drei Untergattungen oder Gattungen (*Colobus*, *Procolobus*, *Piliocolobus*) unterteilt und gelten als monophyletisch (Geissmann, 2002a; Groves, 2001; Morales et al., 1999; Napier & Napier, 1967; Oates et al., 1994). Anhand morphologischer Daten jedoch vermutet Jablonski (1998, 1999) eine Schwestergruppenbeziehung von *Procolobus* zu allen anderen Schlankaffen und somit eine Paraphylie der afrikanischen Vertreter.

Obwohl eine Reihe von phylogenetischen Fragen innerhalb der Gattungen mit molekularen Studien gelöst werden konnten (Geissmann et al., 2003; Nadler & Roos, 2002a,b; Roos, 2000, 2003; Roos & Nadler, 2001; Roos et al., 2001; Rosenblum et al., 1997; Wang et al., 1997; Zhang & Ryder, 1998), gibt es bisher kaum molekulare Hinweise für die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Gattungen, so daß von einer Radiations-artigen Verzweigung auszugehen ist.

Um die phylogenetischen Beziehungen zwischen den Gattungen zu klären, wurden in der vorliegenden Arbeit neun der zehn Colobinae-Gattungen molekulargenetisch untersucht. Unter Berücksichtigung einer vermuteten Radiations-artigen Aufspaltung der Gattungen wurde für die Analyse ein etwa 4,3kb langes Fragment des mitochondrialen Genoms gewählt, welches schnell und langsamer evolvierende Abschnitte enthält, so daß eine Auflösung der Abspaltungsfolge ermöglicht werden sollte.

4.2. Material und Methoden

Als Ausgangspunkt für die Rekonstruktion der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Colobinae diente ein Datensatz von 12 Sequenzen mit einer Länge von jeweils etwa 4,3 kb. Da bereits publizierte Information von Vertretern (*Macaca sylvanus*, *Papio hamadryas*) der Schwestergruppe Cercopithecinae und den Hominoidea (*Homo sapiens* diente als Außengruppe) vorhanden war, mußten nur die Sequenzen der Colobinae-

Gattungen selbst ermittelt werden. Die Amplifikation und Sequenzierung des Gesamtfragmentes war jedoch nicht möglich, so daß mehrere überlappende Teilsequenzen generiert und anschließend aneinander gefügt wurden. Weitere Details zur labortechnischen Vorgehensweise und statistischen Auswertung sind in 2.1. und 2.2. beschrieben.

4.3. Ergebnisse

4.3.1. Sequenzanalyse mitochondrialer DNA-Abschnitte

Es wurden von allen neun untersuchten Colobinae-Gattungen vollständige Sequenzen generiert. Das erstellte Alignment hat eine Länge von 4419 bp und beinhaltet das Cytochrom b Gen, die Kontrollregion (D-loop), die 12S rRNA und Teile der 16S rRNA, sowie die dazwischen liegenden tRNAs für Threonin (Thr), Prolin (Pro), Phenylalanin (Phe) und Valin (Val).

Tabelle 4: Längenangaben in bp der untersuchten Fragmentabschnitte.

	Cyt b	tRNA-Thr	tRNA-Pro	Kontrollreg.	tRNA-Phe	12S rRNA	tRNA-Val	16S rRNA
<i>Homo</i>	1140	75	68	1122	71	954	69	810
<i>Papio</i>	1140	72	68	1076	72	947	68	817
<i>Macaca</i>	1140	73	68	1095	72	946	69	804
<i>Procolobus</i>	1140	76	67	1133	71	950	69	814
<i>Piliocolobus</i>	1140	76	67	1131	69	948	69	807
<i>Colobus</i>	1140	72	67	1153	69	948	69	816
<i>Semnopithecus</i>	1140	75	67	1075	71	947	69	809
<i>Trachypithecus</i>	1140	75	67	1094	71	947	69	812
<i>Presbytis</i>	1140	75	67	1086	71	949	69	814
<i>Nasalis</i>	1140	74	67	1099	71	949	69	819
<i>Pygathrix</i>	1140	74	67	1092	71	948	69	808
<i>Rhinopithecus</i>	1140	74	67	1095	71	949	69	814

Mit Ausnahme des 1140 bp langen Cytochrom b Gens, dessen Terminierung über ein Polyadenylierungssignal (T) erfolgt, sind in allen weiteren Abschnitten Insertionen bzw. Deletionen zu finden. Die größte Variabilität zeigt dabei die Kontrollregion mit Längen von 1075 bp bis 1153 bp. Innerhalb der 12S und der partiellen 16s rRNA gibt es nur geringe Abweichungen von 7 bzw. 13 bp. Die tRNAs sind alle etwa 70 bp lang und besitzen ebenfalls kaum Längenpolymorphismen (Tab. 4).

Basenzusammensetzung

Die Basenzusammensetzung wurde für den gesamten Abschnitt sowie nur für das Cytochrom b Gen ermittelt. Da die Zusammensetzungen zwischen den beiden Fragmenten kaum variiert, wurden zu Vergleichszwecken nur die der Cytochrom b Daten näher untersucht. So ergab die Analyse eine besonders auffallende Verschiebung des T (Thymin)- und C (Cytosin)-Gehalts zwischen Colobinae und *Homo/Cercopithecinae*. Das Gen besteht bei Colobinae zu 27,19-30,26% aus Thymin und zu 28,16-31,75% aus Cytosin. Bei *Homo* und den Cercopithecinae-Vertretern fällt der Anteil von Thymin auf 24,65-25,26% ab und der für Cytosin nimmt stark zu (33,68-34,21%). Der Gehalt der anderen beiden Basen dagegen bleibt überwiegend konstant (Adenin: 28,60-30,61%; Guanin: 11,14-12,46%).

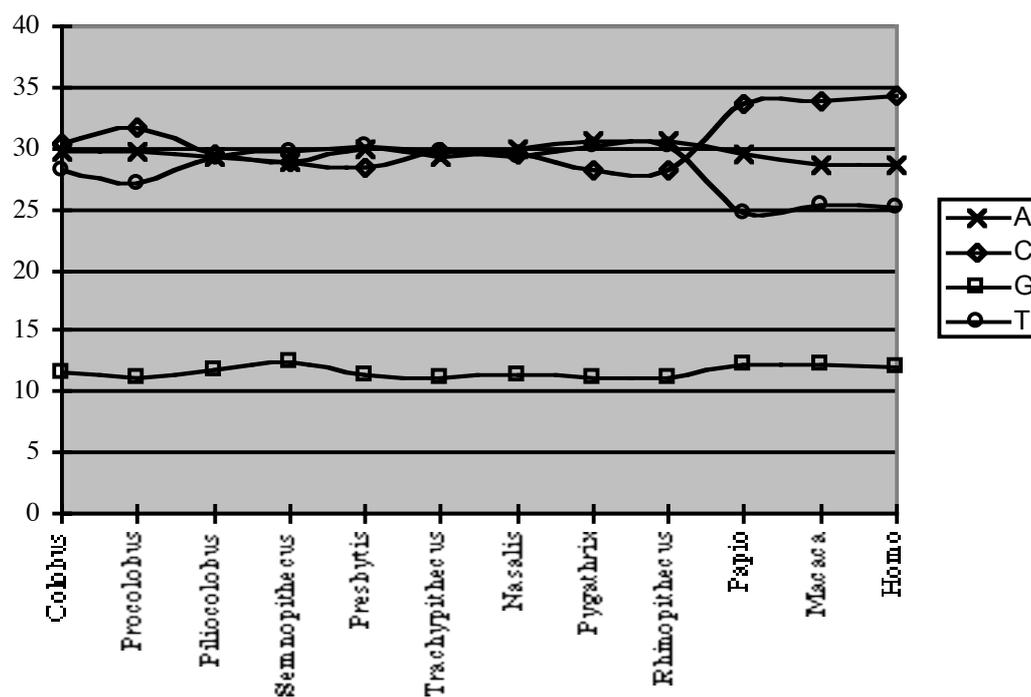


Abbildung 16: Basenzusammensetzung des Cytochrom b Gens (in%) der untersuchten Gattungen.

Paarweise Differenzverteilung

Die beobachteten Differenz zwischen den untersuchten Gattungen im Cytochrom b Gen liegen bei 12,34-17,12%, wobei die größten zwischen den afrikanischen und asiatischen

Vertretern gefunden werden (15,72-17,12%). Im Gegensatz hierzu unterscheiden sich die Gattungen der jeweiligen Kontinente nur in 12,34-15,69% (Asien) bzw. 13,68-15,50% (Afrika). Die paarweisen Vergleiche zwischen den beiden Unterfamilien Colobinae und Cercopithecinae zeigen mit 18,30-20,06% weiterhin eine steigende Tendenz, die schließlich mit den ermittelten Differenzen zwischen der Außengruppe *Homo* und den Cercopithecoidea ihr Maximum mit 21,99-24,12% erreicht.

Da die ermittelten paarweisen Differenzen in Kategorien unterteilt werden können, können diese auch zur Klassifizierung verwendet werden. So würde man Taxa, die sich in 12,0-15,7% unterscheiden als Gattungen klassifizieren, die die sich in 15,7-18,0% unterscheiden als Stämme und die sich in 18,3-20,0% unterscheiden als Unterfamilien.

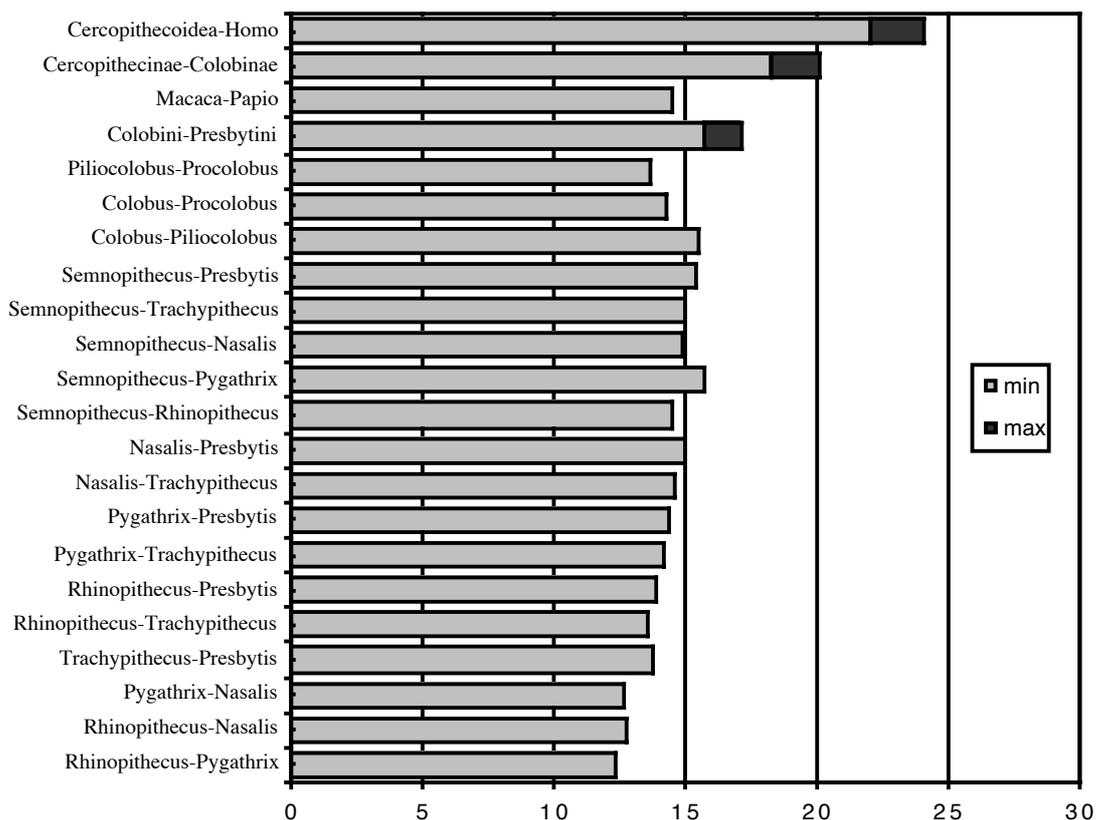


Abbildung 17: Beobachtete paarweise Differenzverteilungen in% zwischen den untersuchten Gattungen.

Phylogenetische Rekonstruktionen

Als Ausgangspunkt für die Stammbaumrekonstruktionen diente ein Datensatz mit 12 Sequenzen, in dem neun Gattungen der Colobinae, zwei Gattungen der Cercopithecinae und

Homo sapiens als Außengruppe vertreten waren. Da der Datensatz Deletionen und Insertionen aufweist, wurden diese vor weiteren Untersuchungen mit dem Programm Gblocks mit unterschiedlich stringenten Einstellungen entfernt. Die dabei generierten Alignments hatten danach eine Länge von 3829 und 3971 bp.

Die Baum-Berechnungen wurden wie unter 2.2.5. beschrieben mit den drei Algorithmen Maximum-Parsimonie, Neighbor-Joining und Maximum Likelihood erstellt. Für die NJ-Rekonstruktionen in PHYLIP wurde dazu das in PUZZLE geschätzte Transitions-Transversions-Verhältnis von 3,07 und die ML-Distanzkorrektur verwendet. NJ-Bäume in PAUP dagegen wurden unter der Annahme des „General time-reversal“-Modells und den in MODELTEST geschätzten Werten für die Gamma-Verteilung der Raten-Heterogenität ($\alpha = 0,761399$) und den Anteil invariabler Positionen ($P_{inv} = 0,373648$) berechnet.

Die aus den Rekonstruktionen abgeleiteten Topologien zeigten identische Verwandtschaftsverhältnisse und unterschieden sich nur durch variierende Bootstrap- bzw. Quartet Puzzling-Werte (Abb. 18).

Phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen

Die erstellten Phylogenien untergliedern die untersuchten Gattungen in die zwei anerkannten Unterfamilien Cercopithecinae und Colobinae und beweisen eindeutig deren Monophylie durch eine statistische Unterstützung von jeweils 100%.

Innerhalb der Colobinae kommt es zu einer weiteren Aufspaltung in eine afrikanische und asiatische Linie. Die Monophylie der afrikanischen Gattungen *Procolobus*, *Piliocolobus* und *Colobus* ist zumindest in ML- und NJ-Rekonstruktionen mit 95-100% sehr gut belegt. Innerhalb der Colobini trennt sich *Colobus* als erste Linie ab. Die rezenteste Verzweigung bilden schließlich *Piliocolobus* und *Procolobus*, deren Monophylie durch Bootstrap- bzw. Quartet Puzzling-Wert von 74-99% bestätigt wird.

Obwohl die Monophylie der asiatischen Vertreter ebenfalls klar bewiesen ist (86-100%), sind deren Verwandtschaftsverhältnisse zueinander nur angedeutet. Nach den ermittelten Phylogenien stellt *Semnopithecus* die erste Abspaltung innerhalb der asiatischen Gattungen dar und wird in ML- und NJ-Bäumen durch 85-92% gestützt, wogegen der MP-Algorithmus diese Abzweigung nicht bestätigt. Die restlichen Gattungen unterteilen sich in zwei weitere Gruppen mit einerseits *Trachypithecus/Presbytis* und andererseits mit *Pygathrix/Rhinopithecus/Nasalis*. Die Monophylie letzterer Gruppe ist eindeutig bestätigt (99-100%), deren Verwandtschaftsverhältnisse zueinander können aber nicht aufgelöst werden. Der gemeinsame Ursprung von *Trachypithecus* und *Presbytis* wird nur in ML- und NJ-Rekonstruktionen durch 55-64% angedeutet bzw. gar nicht gestützt (MP).

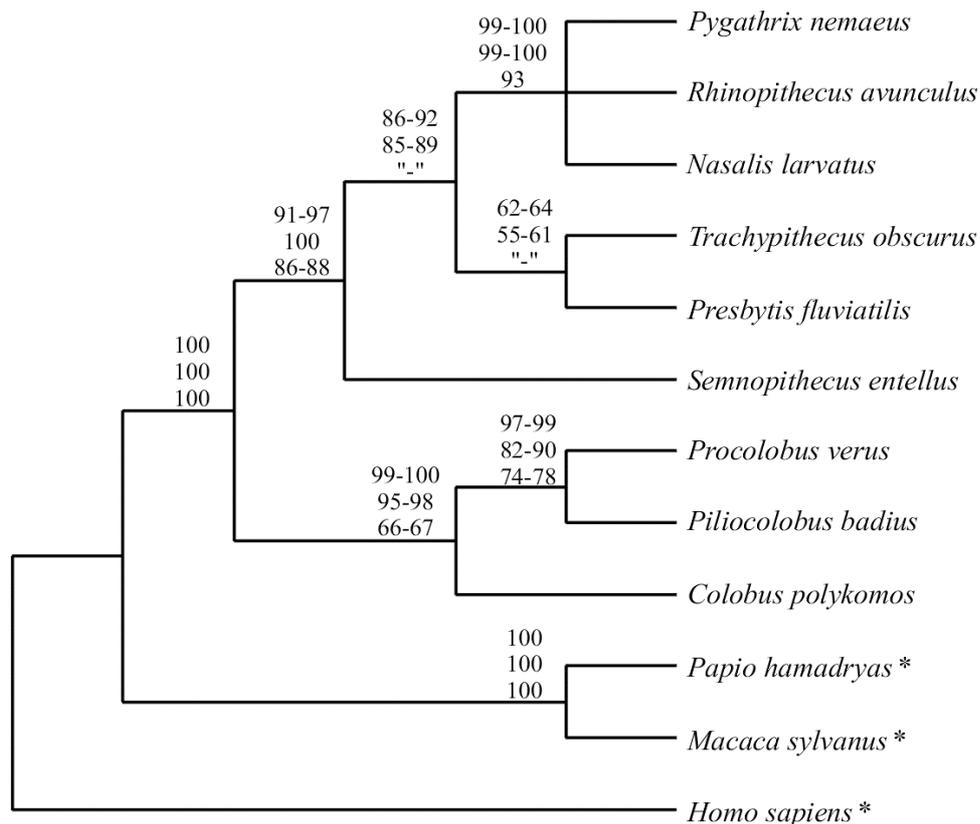


Abbildung 18: 50%-Mehrheitsregel-Konsensus-Baum basierend auf ML-, NJ- und MP-Rekonstruktionen. Zahlen geben Quartet Puzzling- bzw. Bootstrap-Werte in % an (oben: ML, Mitte: NJ, unten: MP). Die mit * markierten Arten sind durch bereits publizierte Sequenzen repräsentiert (siehe Anhang).

4.3.2. Berechnung von Aufspaltungszeiten

Als Basis für die Kalkulationen diente das längere der beiden mit Gblocks generierten Alignments. Da der relative Ratentest signifikante ($P < 0,05$) Unterschiede zwischen *Macaca* und den Colobinae-Linien anzeigte, wurde *Macaca sylvanus* für die weiteren Berechnungen aus dem Datensatz entfernt. Mit dem verkleinerten Datensatz wurden weiterhin Molecular Clock Likelihood Ratio Tests in PUZZLE durchgeführt, die keine signifikanten Unterschiede anzeigten (Annahme keine molekulare Uhr: $\log L -20503,65$; Annahme molekulare Uhr: $\log L -20508,27$) und somit eine Datierung ermöglichten. Die Berechnung der Kantenlängen erfolgte schließlich in PUZZLE unter Vorgabe einer Baumtopologie, die mit Ausnahme einer angenommenen *Pygathrix-Rhinopithecus*-Schwestergruppenbeziehung der erstellten Phylogenie entsprach.

Für die Kalibrierung der molekularen Uhr wurden zwei Referenzwerte verwendet, die den diskutierten Zeitraum für die Aufspaltung von Cercopithecinae und Colobinae umspannen. Der jüngere Zeitpunkt von 14 Mio ist direkt von dem Fossil *Victoriapithecus* abgeleitet, welches vor etwa 15-17 Mio in Afrika lebte und Merkmale beider Unterfamilien aufweist (Goodman et al., 1998; Stewart & Disotell, 1998). Der zweite Referenzpunkt von 30 Mio basiert ausschließlich auf molekularen Berechnungen (Arnason et al., 1998), bestätigt aber Vermutungen, daß der Ursprung der Primaten deutlich weiter zurückliegt als es Fossilfunde anzeigen (Martin, 2003; Tavaré et al., 2002).

Geht man von einer Verzweigung der beiden Familien vor etwa 14 und 30 Mio aus, ergibt sich für den gesamten untersuchten Abschnitt somit eine Evolutionsrate von $14,68 \times 10^{-9}$ bzw. $6,85 \times 10^{-9}$ Substitutionen/Position/Jahr.

Nach der Trennung der beiden Unterfamilien Cercopithecinae und Colobinae kam es innerhalb letzterer Gruppe vor etwa 9,9-21,2 Mio zu einer weiteren Aufspaltung in eine asiatische und afrikanische Linie, die sich dann jeweils weiter untergliederten. Die afrikanischen Vertreter unterteilten sich dabei vor 7,7-16,5 bzw. 6,6-14,1 Mio in die drei Gattungen *Colobus*, *Piliocolobus* und *Procolobus*. Die Verzweigungen innerhalb der asiatischen Gattungen vollzogen sich ebenfalls in einem sehr kurzen Zeitraum. Als erste Gattung trennte sich dabei *Semnopithecus* vor etwa 8,6-18,3 Mio von der Stammlinie ab. Die restlichen Gattungen

unterteilten sich vor etwa 7,7-16,5 Mio in zwei weitere Gruppen mit einerseits *Nasalis*, *Pygathrix* und *Rhinopithecus* und andererseits mit *Trachypithecus* und *Presbytis*. Letztere Gruppe verzweigte sich schließlich vor etwa 6,9-14,7 Mio in die beiden Gattungen. Innerhalb der „odd-nosed monkeys“ (*Nasalis*, *Pygathrix*, *Rhinopithecus*) spaltete sich *Nasalis* vor etwa 6,2-13,2 Mio als erstes ab. Nur kurze Zeit später (0,5-1,0 Mio) trennten sich aber auch *Pygathrix* und *Rhinopithecus* voneinander.

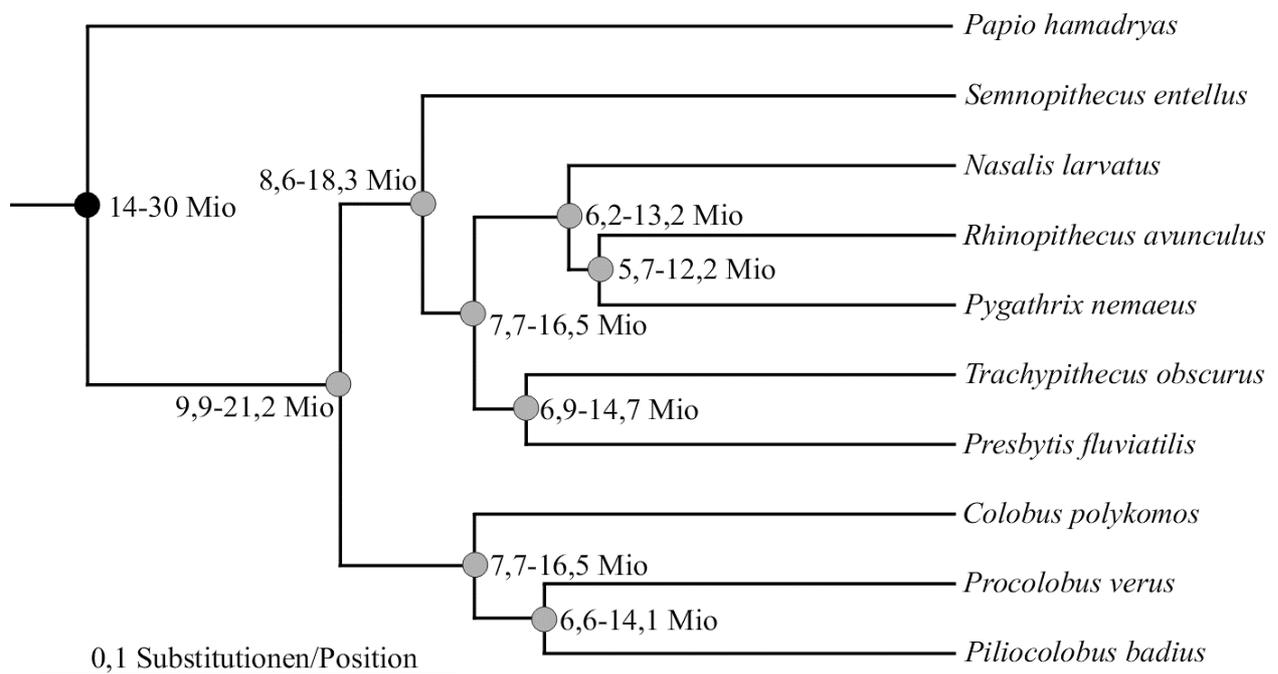


Abbildung 19: Aufspaltungszeiten errechnet anhand eines ML-Baumes. Der schwarze Kreis gibt die Kalibrierungszeiten; die grauen Kreise die ermittelten Zeiten für die jeweiligen letzten gemeinsamen Vorfahren an.

4.4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden mit Ausnahme von *Simias* alle anerkannten Colobinae-Gattungen molekulargenetisch untersucht. Die dabei erzielten Ergebnisse erbrachten erstmals klare Hinweise auf die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Gattungen und lieferten somit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der evolutionären Zusammenhänge in dieser Primatengruppe.

Mit den etwa 4,3 kb langen Sequenzen des mitochondrialen Genoms wurden phylogenetische Stammbäume mit unterschiedlichen Algorithmen und auf Basis

unterschiedlicher Sequenzevolutionsmodelle errechnet. Die dabei ermittelten Baumtopologien waren in allen Fällen identisch und unterschieden sich nur in ihrer statistischen Unterstützung. Weiterhin wurden innerhalb der Colobinae keine signifikanten Unterschiede in der Basenzusammensetzung gefunden, so daß davon auszugehen ist, daß die ermittelte Phylogenie die tatsächlichen Verwandtschaftsbeziehungen widerspiegelt.

Phylogenie und Taxonomie der Colobinae

Die untersuchten Gattungen unterteilen sich in die beiden monophyletischen Unterfamilien Cercopithecinae und Colobinae und bestätigen somit die allgemein gültige Systematik (Geissmann, 2002a). Die beiden analysierten Vertreter der Cercopithecinae *Macaca* und *Papio* repräsentieren die beiden Hauptzweige der Papionini. Die genetische Differenz zwischen den beiden Gattungen liegt bei 14,7%, wodurch ein Gattungsstatus gerechtfertigt wird. Die Colobinae verzweigen sich weiterhin in eine asiatische und afrikanische Gruppe. Obwohl die Differenzen von 15,72-17,12% zwischen den Gruppen kaum größer sind als die zwischen den Gattungen (12,34-15,69%), erscheint eine Unterteilung der Colobinae in die zwei Stämme Presbytini oder Semnopithecini (Asien) und Colobini (Afrika) aus geographischer Sicht sinnvoll (Geissmann, 2002a; Napier, 1970; Szalay & Delson, 1979). Innerhalb der afrikanischen Vertreter stellt *Colobus* die erste Abzweigung dar, so daß *Procolobus* und *Piliocolobus* Schwestergruppen bilden und somit die traditionell angenommenen Verwandtschaftsverhältnisse bestätigt werden (Groves, 1989; Kuhn, 1967; Oates et al., 1994). Die asiatischen Colobinae dagegen brachten mit sieben Gattungen eine sehr viel größere Diversität hervor. Besonders interessant ist dabei die entdeckte Schwestergruppenbeziehung von *Semnopithecus* zu allen anderen asiatischen Vertretern, wodurch die ursprünglich in *Presbytis* vereinigten Spezies-Gruppen *Kasi*, *Trachypithecus*, *Semnopithecus* und *Presbytis* (Napier & Napier, 1967) als paraphyletisch dargestellt werden. Nach der Abspaltung von *Semnopithecus* unterteilten sich die restlichen Gattungen in zwei weitere Hauptgruppen. Eine davon beinhaltet *Trachypithecus* und *Presbytis*, so daß die traditionell angenommene enge Verwandtschaft von *Semnopithecus* und *Trachypithecus* (Brandon-Jones, 1984) nicht bestätigt wurde. Die zweite Gruppe umfaßt die

„odd-nosed monkeys“ *Nasalis*, *Pygathrix* und *Rhinopithecus*, deren Verwandtschaftsverhältnisse zueinander aber nicht aufgelöst werden konnten. Morphologische Daten dagegen sprechen klar für eine Schwestergruppenbeziehung von *Nasalis* und *Simias* bzw. von *Pygathrix* und *Rhinopithecus* (Groves, 1970; Oates et al., 1994). Da weitere genetische Daten (Zhang & Ryder, 1998) ebenfalls kaum Aufschluß über die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den drei Gattungen geben, kann von einer Radiations-artigen Verzweigung ausgegangen werden. Um jedoch ein vollständiges Bild der phylogenetischen Beziehungen innerhalb der „odd-nosed monkeys“ zu erhalten, muß in zukünftigen molekularen Studien auch die Gattung *Simias* miteinbezogen werden.

Biogeographie der Colobinae

Durch die Analyse nahezu aller Colobinae-Gattungen konnten in der vorliegenden Studie klare Hinweise auf deren phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen gefunden werden. Um die ermittelte Phylogenie und die daraus abgeleiteten Verbreitungsmuster in Verbindung mit geologischen und klimatischen Veränderungen zu bringen, müssen jedoch auch die Aufspaltungszeiten der einzelnen Taxa bekannt sein. Aufgrund der wenigen und schwer klassifizierbaren Fossilien gestaltet sich eine Datierung von Aufspaltungsereignissen jedoch als schwierig. Die anhand molekularer Daten geschätzte Trennung von Cercopithecinae und Colobinae vor etwa 30 Mio (Arnason et al., 1998) bestätigt zwar die heutige Ansicht eines älteren Ursprungs der Primaten (Martin, 2003; Tavaré et al., 2002), widerspricht aber Fossilienfunden, die Anhaltspunkte auf eine Aufspaltung der beiden Unterfamilien vor etwa 14 Mio geben (Goodman et al., 1998; Stewart & Disotell, 1998). Da keine Einigkeit über die Aufspaltungszeiten innerhalb der Primaten besteht, wurden folglich die beiden Referenzwerte von 14 und 30 Mio zur Kalibrierung der molekularen Uhr eingesetzt.

Da nahezu alle Arten der Cercopithecinae und einige Vertreter der Colobinae in Afrika beheimatet sind, ist von einem afrikanischen Ursprung der Cercopithecidae auszugehen (Stewart & Disotell, 1998). Demnach kam es auf dem afrikanischen Kontinent zu einer Verzweigung der Cercopithecidae in die beiden Unterfamilien vor etwa 14-30 Mio. Später, vor etwa 9,9-21,2 Mio

spalteten sich die Colobinae in die beiden Stämme Presbytini und Colobini auf, die sich vor etwa 6,6-7,7 bzw. 14,1-16,5 Mio in die heutigen afrikanischen Gattungen weiter unterteilten. Die Presbytini dagegen wanderten aus Afrika aus und besiedelten Europa und Asien. Da vor etwa 10 bzw. 20 Mio keine großen Barrieren mögliche Wanderungsbewegungen behinderten (Whybrow, 1984, 1992), konnten die neuen Gebiete ohne Schwierigkeiten besiedelt werden. Auf dem eurasischen Gebiet kam es dann möglicherweise zu einer weiteren Aufspaltung in eine östliche Form, dem Vorfahr der heutigen Presbytini-Gattungen und eine westliche Form (*Mesopithecus*), die Europa und Vorderasien besiedelte und vor etwa 6-8,5 Mio lebte (Delson, 1994). Die östliche Form dagegen wanderte in Richtung Süd-Ost-Asien. Als erste Linie spaltete sich *Semnopithecus* vor etwa 8,6-18,3 Mio ab und besiedelte den indischen Subkontinent. Ein Vorfahr der restlichen Gattungen zog weiter in Richtung Osten und spaltete sich vor etwa 7,7-16,5 Mio in die beiden Linien *Trachypithecus/Presbytis* und *Nasalis/Pygathrix/Rhinopithecus* („odd-nosed monkeys“) auf. *Trachypithecus* besiedelte dann weite Teile Süd-Ost-Asiens, wogegen *Presbytis* sich nur auf den südlichen Raum beschränkte. Die zweite Linie („odd-nosed monkeys“) hat ihren Ursprung vermutlich im heutigen Indochina und wurde durch den Mekong-Fluß von *Trachypithecus/Presbytis* geographisch abgetrennt. Die Einwanderung von *Trachypithecus*-Vertretern (*T. francoisi*-Gruppe, *T. crepusculus*, *T. germaini*) in den Raum östlich des Mekongs dagegen vollzog sich vermutlich erst während des Plio- und Pleistozäns. Innerhalb der „odd-nosed monkeys“ trennte sich *Nasalis* vor etwa 6,2-13,2 Mio von *Pygathrix/Rhinopithecus* ab und wanderte über bestehende Landbrücken (Hall, 1998, 2001) in Richtung Borneo aus. Die Trennung der beiden in Indochina verbliebenen Gattungen *Pygathrix* und *Rhinopithecus* vor etwa 5,7-12,2 Mio dagegen wurde möglicherweise durch den Fluß Yangtze vollzogen, der bis ins späte Miozän im Delta des Roten Flusses (Nord-Vietnam) mündete und erst später seinen heutigen östlichen Verlauf einnahm (Kottelat, 1989). Da eine enge Verwandtschaft von *Simias* und *Nasalis* vermutet wird, bleibt jedoch fraglich, wie die Mentawai-Inseln durch *Simias* besiedelt wurden. Die westlich von Sumatra gelegenen Inseln entstanden möglicherweise erst vor etwa 5 Mio (Hall, 1998), so daß die Aufspaltung der beiden Gattungen frühestens zu diesem Zeitpunkt geschehen konnte. Zudem wurde für eine weitere Primatengattung der Mentawai-

Inseln (*Macaca*) gezeigt, daß die Inseln zweimal besiedelt wurden (Roos et al., 2003), so daß die Suche nach Erklärungen für eine Besiedelung durch *Simias* weiterhin erschwert wird. Da in bisherigen molekularen Studien kein Vertreter von *Simias* analysiert wurde, bleibt somit auch die Frage nach der Kolonisierung der Mentwai-Inseln vorerst unbeantwortet.

4.5. Zusammenfassung

Um die evolutionären Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Colobinae-Gattungen zu klären, wurde in der vorliegenden Studie ein etwa 4,3kb langer Abschnitt des mitochondrialen Genoms von neun der zehn Gattungen sequenziert und phylogenetisch untersucht. Die dabei erzielten Ergebnisse konnten die jeweilige Monophylie der asiatischen und afrikanischen Gattungen eindeutig belegen, wogegen die Verhältnisse innerhalb der beiden Gruppen meist nur angedeutet wurden. Demnach repräsentiert *Semnopithecus* die Schwesterlinie zu den restlichen asiatischen Gattungen, die sich weiter in *Trachypithecus/Presbytis* und *Nasalis/Pygathrix/Rhinopithecus* unterteilen. Die afrikanischen Vertreter verzweigten sich in drei Gattungen, von denen *Colobus* die Schwestergruppe zu *Piliocolobus* und *Procolobus* bildet. Aufgrund der hohen genetischen Differenzen zwischen den untersuchten Taxa wird für alle ein Gattungsstatus vorgeschlagen.

5. Kapitel 3: Molekulare Phylogenie der Gibbons (Hylobatidae)

5.1. Einleitung

Die in Süd-Ost-Asien (Abb. 20) verbreiteten Gibbons (Hylobatidae) repräsentieren eine der beiden Hominoidea-Familien und stellen somit die nächsten Verwandten der großen Menschenaffen und Menschen dar (Geissmann, 2002a). Ebenso wie die Hominidae besitzen Gibbons neben anderen Merkmalen keinen Schwanz und sind daher klar von den geschwänzten Altweltaffen (Cercopithecidae) abgetrennt. Gibbons sind überwiegend Baumbewohner und zeigen eine Reihe von Anpassungen an diese Lebensweise. Besonders kennzeichnend hierfür sind die, relativ zur Körpergröße, langen Arme und Beine und die langen, gekrümmten Finger und Zehen, die eine schnelle Fortbewegung von Ast zu Ast ermöglichen.

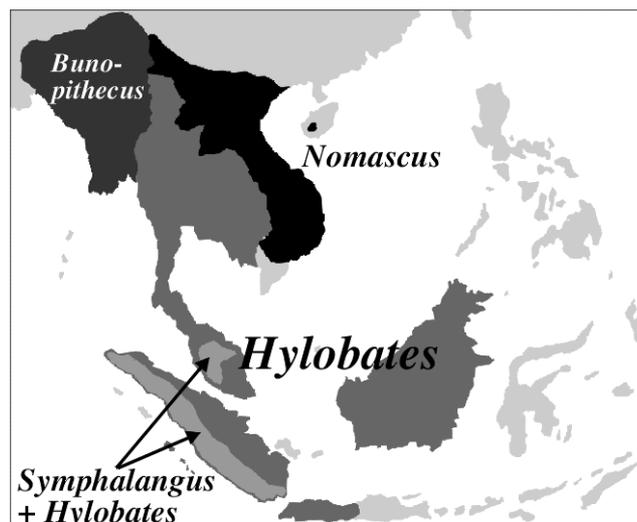


Abbildung 20: Verbreitung der vier Gibbon-Gattungen. Das größte Verbreitungsgebiet hat *Hylobates*.

Obwohl die Monophylie der Gibbons weithin akzeptiert ist, gibt es innerhalb der Familie eine Reihe von unbeantworteten Fragen bezüglich ihrer Evolutionsgeschichte. In frühen Untersuchungen wurden die Gibbons in die zwei Gattungen *Symphalangus* und *Hylobates* unterteilt, wobei letzterer auch *Nomascus* und *Bunopithecus* zugeordnet wurden (Napier & Napier, 1967; Schultz, 1933; Simonetta, 1957). Nach detaillierten Studien wurde aber deutlich, daß die Gibbons nicht nur durch zwei, sondern vier unterschiedliche Hauptgruppen repräsentiert

sind, die sich zudem in ihrer Chromosomenzahl (*Bunopithecus*: $2n=38$; *Hylobates*: $2n=44$; *Symphalangus*: $2n=50$; *Nomascus*: $2n=52$) unterscheiden (Geissmann, 1994, 1995, 2002a; Marshall & Sugardjito, 1986; Nowak, 1999; Prouty et al., 1983; Rowe, 1996; Wienberg & Stanyon, 1987). Die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den vier Gruppen und deren systematischer Status sind aber umstritten und konnten auch nicht durch Studien unterschiedlichster Forschungsrichtungen (Morphologie, Vokalisation, Proteinanalysen, Karyotypisierung) geklärt werden (Bruce & Ayala, 1979; Creel & Preuschoft, 1984; Geissmann, 1993, 2002b; Groves, 1972; Haimoff et al., 1982; Liu et al., 1987; Shafer, 1986). Auch die anhand von DNA-Sequenzen (überwiegend mitochondriale DNA) erstellten Phylogenien erbrachten meist keine Lösung (Hall et al., 1998; Zehr, 1999; Zhang, 1997) und enthielten auch nur selten Vertreter von *Bunopithecus* (Garza & Woodruff, 1992; Hayashi et al., 1995), so daß ein unvollständiges Bild der Gibbon-Evolution dargestellt wurde. Mit Hilfe von Sequenzinformation der mitochondrialen Kontrollregion konnte jedoch erstmals ein klarer Hinweis auf die phylogenetischen Konstellationen innerhalb der Gibbons gefunden werden (Roos & Geissmann, 2001). Demnach spaltet sich zuerst *Nomascus* von der Stammlinie ab, gefolgt von *Symphalangus*, wobei *Bunopithecus* und *Hylobates* sich als letztes voneinander trennen. Aufgrund der großen genetischen Differenzen zwischen den einzelnen Gibbon-Gruppen, die mit denen zwischen den Hominidae-Gattungen vergleichbar sind, schlug Roos und Geissmann (2001) vor, alle vier Gibbon-Gruppen als eigene Gattungen einzustufen.

Neben den fraglichen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Gattungen sind auch die Verhältnisse innerhalb der Gattungen von Interesse. Insbesondere gilt dies für die stark bedrohte *Nomascus*-Gruppe Indochinas, in der drei bis vier Arten anerkannt sind. Traditionell klassifizierte man alle Taxa als Unterarten von *N. concolor* (Napier & Napier, 1967; Marshall & Sugardjito, 1986). Aufgrund größerer Unterschiede in Vokalisation (Geissmann, 1994, 1995) und Morphologie (Groves & Wang, 1990; Groves, 1993) wurden später aber *N. leucogenys* und *N. gabriellae* als eigenständige Arten von *N. concolor* abgetrennt. Hinweise auf eine vierte, möglicherweise bereits ausgestorbene Art *N. nasutus* im Nordosten Vietnams basierten ebenfalls auf morphologischen und akustischen Daten (Geissmann, 1989, 1994, 1995). Während einer

Feldstudie im August 2001 in Kim Hy konnten jedoch klare Hinweise auf das Überleben von Gibbons in NO-Vietnam gefunden und Proben von einem frisch gewilderten Tier gesammelt werden. Die damit durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen belegten eindeutig die Existenz einer vierten *Nomascus*-Art (Goldthorpe et al., in Präp.).

Innerhalb der Gattung *Hylobates* sind die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den sechs traditionell anerkannten Arten (*H. klossii*, *H. pileatus*, *H. moloch*, *H. muelleri*, *H. lar*, *H. agilis*) ebenfalls nahezu ungeklärt. Alle an *Hylobates*-Arten durchgeführten Studien erbrachten kaum übereinstimmende Ergebnisse (Chivers, 1977; Creel & Preuschoft, 1984; Garza & Woodruff, 1992; Geissmann, 2002a, b; Haimoff et al., 1982), so daß keine der möglichen Verwandtschaftskonstellationen ausgeschlossen werden kann.

Um die Phylogenie der Gibbons, insbesondere die zwischen den Arten zu klären, wurden in diesem Kapitel Sequenzen des mitochondrialen Cytochrom b Gens aller derzeit anerkannten Arten ermittelt und phylogenetisch analysiert. Die dabei erzielten Ergebnisse sollten weiterhin bereits publizierte Daten (Roos & Geissmann, 2001) bestätigen und erweitern. Da die Sequenzinformation der mitochondrialen Kontrollregion keine Datierungen zuließ, sollten die Aufspaltungszeiten der vier Gibbon-Gattungen nun anhand der Cytochrom b Daten berechnet werden.

5.2. Material und Methoden

Als Basis für die phylogenetischen Rekonstruktionen diene ein Datensatz mit 18 Sequenzen des kompletten mitochondrialen Cytochrom b Gens, bestehend aus 12 Gibbon-, fünf Hominidae- und einer *Papio*-Sequenz, die als Außengruppe verwendet wurde. Um den Arbeitsaufwand zu minimieren, wurden nur die Sequenzen der 12 Gibbons selbst ermittelt und der Datensatz anschließend durch bereits publizierte Sequenzen vervollständigt. Die labortechnische Vorgehensweise und statistische Auswertung ist unter 2.1. und 2.2. detailliert beschrieben. Weitere Einzelheiten zu den verwendeten Materialien und Sequenzen sind in „10. Anhang“ aufgeführt.

5.3. Ergebnisse

5.3.1. Sequenzanalyse des mitochondrialen Cytochrom b Gens

Es konnten von allen zur Verfügung stehenden Proben erfolgreich vollständige Sequenzen des mitochondrialen Cytochrom b Gens amplifiziert und sequenziert werden. Um die erzielten Sequenzdaten besser bewerten zu können, wurden die Datensätze zusätzlich noch mit homologen Sequenzen der Hominidae (*Homo sapiens*, *Pan paniscus*, *P. troglodytes*, *Gorilla gorilla*, *Pongo abelii*) und *Papio hamadryas* aus der NCBI-Datenbank erweitert.

Wie bei allen Catarrhini wird auch bei Gibbons die Transkription des 1140bp langen Gens nicht über ein Stop-Kodon, sondern über ein posttranskriptionelles Polyadenylierungssignal (T) terminiert.

Basenzusammensetzung

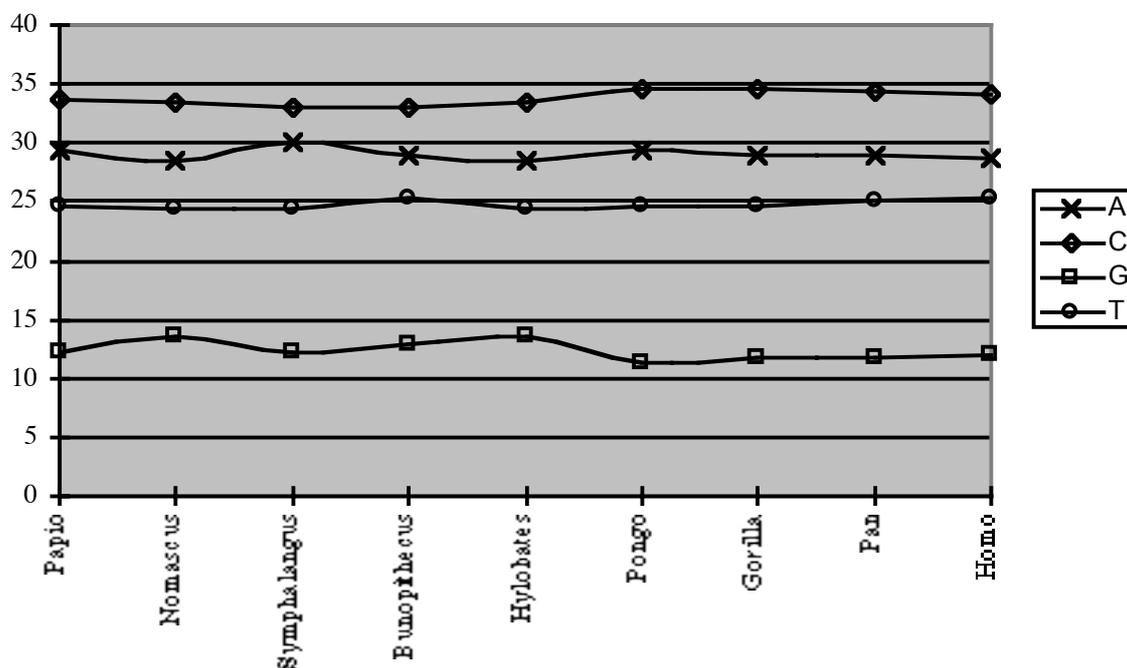


Abbildung 21: Durchschnittliche Basenzusammensetzung der untersuchten Gattungen in%.

Die Analyse der Basenzusammensetzung zeigte keine großen Unterschiede zwischen den einzelnen Gattungen. Prinzipiell ist aber eine leichte Verschiebung des GC-Gehalts erkennbar. So stellt Cytosin (C) bei *Papio* und den vier Gibbon-Gattungen einen durchschnittlichen Anteil

von 33,34% des Gens dar, wogegen bei den Hominoidea dieser auf 34,44% ansteigt. Entsprechend liegt der Guanin-Anteil (G) bei den großen Menschenaffen und Mensch (11,67%) um 1,19% niedriger als bei den Hylobatidae und *Papio* (12,86%).

Paarweise Differenzverteilung

Die beobachteten Differenzen zwischen anerkannten Arten liegen bei 4,21-7,98%. Je tiefer die Verzweigungen fallen, desto größer werden die beobachteten Unterschiede zwischen den Taxa. So unterscheiden sich Gattungen in 9,47-15,35% und Familien in 15,44-18,07%. Die beobachteten Differenzen zwischen den Hominoidea und der Außengruppe *Papio* liegen bei 20,44-22,90%.

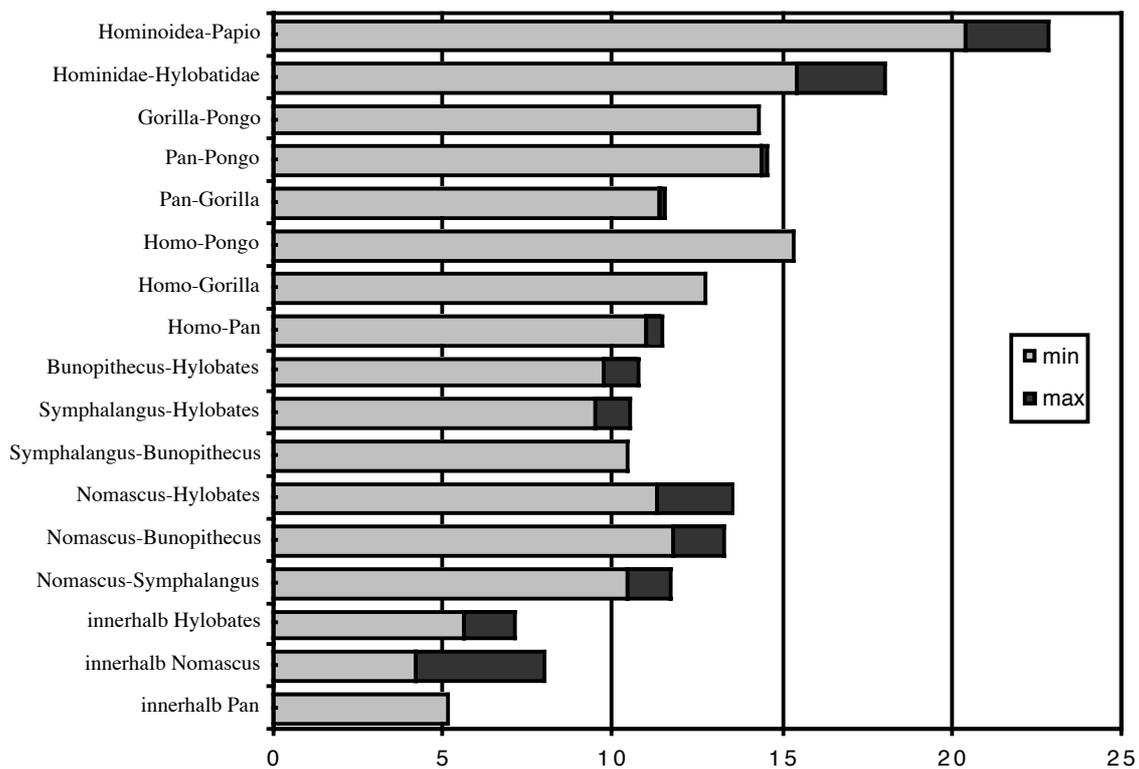


Abbildung 22: Paarweise Differenzverteilungen in% zwischen den untersuchten Hominoidea-Vertretern und der Außengruppe *Papio*.

Da die ermittelten paarweisen Differenzen in Kategorien unterteilt werden können, können diese auch zur Klassifizierung von Taxa verwendet werden. So würde man Taxa, die sich in 4-8% unterscheiden als Arten klassifizieren, die, die sich in 9-13,5% unterscheiden in Gattungen und

die, die sich in 14-18% unterscheiden in Familien. Da die Vergleiche zwischen *Pongo* und den anderen Hominidae-Vertretern bei 14,3-15,4% liegen, würde dies jedoch einen Familienstatus für *Pongo* (Pongidae) bedeuten. Weitere Details zu paarweisen Differenzverteilungen sind in Abb. 22 graphisch dargestellt.

Phylogenetische Rekonstruktionen

Als Basis für die Stammbaumrekonstruktionen diente ein Datensatz von 18 Sequenzen, in dem alle 12 Gibbon-Arten, sowie ein breites Spektrum an Hominidae-Arten vertreten waren. Die homologe Sequenz von *Papio hamadryas* wurde als Außengruppe verwendet.

Die Baum-Berechnungen wurden wie unter 2.2.5. beschrieben mit den drei Algorithmen Maximum-Parsimony, Neighbor-Joining und Maximum Likelihood und unter Verwendung unterschiedlicher Sequenzevolutionsmodelle erstellt. Für die NJ-Rekonstruktionen in PHYLIP wurde dazu das in PUZZLE ermittelte Transitions-Transversions-Verhältnis von 6,12 und die ML-Distanzkorrektur verwendet. NJ-Bäume in PAUP dagegen wurden unter Annahme des „General time-reversal“-Modells und dem in MODELTEST geschätzten Wert für die Gamma-Verteilung der Raten-Heterogenität ($\alpha = 0,225094$) berechnet.

Die aus den Kalkulationen abgeleiteten Baumtopologien zeigen überwiegend identische Verwandtschaftsverhältnisse und unterscheiden sich nur durch variiierende Bootstrap- bzw. Quartet Puzzling-Werte (Abb. 23).

Phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen

In allen rekonstruierten Baumtopologien ist eine Unterteilung in die beiden Familien Hominidae und Hylobatidae eindeutig erkennbar und deren Monophylie statistisch gut belegt (69-100%).

Innerhalb der Gibbons spaltet sich zuerst *Nomascus* ab, danach *Symphalangus* und zuletzt trennen sich *Bunopithecus* und *Hylobates* voneinander. Die Schwestergruppenbeziehung von *Bunopithecus* und *Hylobates* ist dabei mit Bootstrap- bzw. Quartet Puzzling-Werten von 81-90% gut belegt. Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen *Nomascus*, *Symphalangus* und

Bunopithecus/Hylobates dagegen sind nur durch eine statistische Unterstützung von 52-71% angedeutet, so daß dieses Ergebnis keine klare Auflösung der Verhältnisse erlaubt. Innerhalb der Gattung *Nomascus* stellt *N. nasutus* die tiefste Abspaltung dar, gefolgt von *N. concolor*, wobei *N. gabriellae* und *N. leucogenys* die rezenteste Verzweigung bilden. Die statistischen Unterstützungen für diese Konstellationen und die Monophylie der Gattung liegen bei 79-100%.

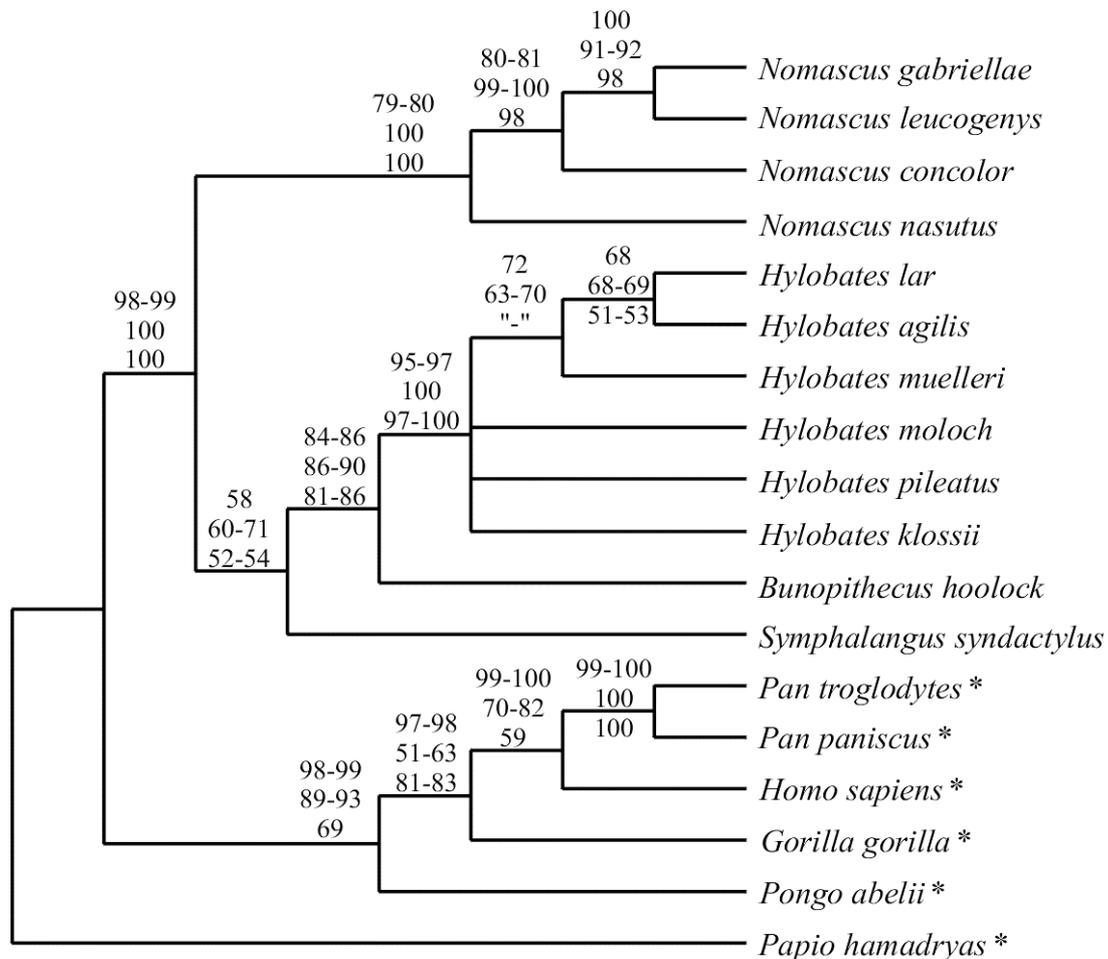


Abbildung 23: 50%-Mehrheitsregel-Konsensus-Baum basierend auf ML-, NJ- und MP-Rekonstruktionen. Zahlen im Baum geben Quartet Puzzling- bzw. Bootstrap-Werte in% an (oben: ML; Mitte: NJ, unten: MP). "-" bezeichnet Werte unter 50%. Die mit * markierten Arten sind durch bereits publizierte Sequenzen repräsentiert (siehe Anhang).

Obwohl die Monophylie der Gattung *Hylobates* eindeutig bestätigt ist (95-100%), können die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den sechs untersuchten Arten dagegen kaum aufgelöst

werden. So ist zwar eine Verwandtschaft von *H. lar*, *H. agilis* und *H. muelleri* angedeutet, jedoch ist dieses Verhältnis nur durch Werte von 51-72% belegt bzw. gar nicht bestätigt (MP).

Die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Hominidae sind zumindest in ML-Rekonstruktionen relativ gut belegt. So spaltet sich zuerst *Pongo* von der Stammlinie ab, danach *Gorilla*. Die rezenteste Verzweigung wird durch *Homo* und *Pan*, die sich weiter in zwei Arten (*P. paniscus*, *P. troglodytes*) unterteilt, repräsentiert. Die Quartet Puzzling-Werte (ML) für die genannten Konstellationen liegen alle bei 97-100%. Im Gegensatz hierzu sind die Verhältnisse in MP- und NJ-Bäumen weniger gut unterstützt (59-83%).

5.3.2. Berechnung von Aufspaltungszeiten

Die Berechnung von Aufspaltungszeiten wurde anhand des vollständigen Datensatzes durchgeführt. Da der relative Raten-Test keine signifikanten Unterschiede in den Raten ($P > 0,05$) einzelner Linien aufzeigte, konnten für die Datierung alle Positionen und Sequenzen verwendet werden. Ebenso zeigten die Molecular Clock Likelihood Ratio Tests in PUZZLE keine signifikanten Unterschiede zwischen den analysierten Bäumen (Annahme molekulare Uhr: $\log L -7096,97$; Annahme keine molekulare Uhr: $\log L -7085,19$), so daß eine Datierung anhand des vorliegenden Datensatzes möglich war. Die für die Berechnung verwendeten Kantenlängen wurden in PUZZLE unter Vorgabe einer Baumtopologie und des HKY-Modells kalkuliert. Die vorgegebene Baumtopologie entsprach überwiegend der in dieser Arbeit ermittelten Gibbon-Phylogenie, wurde aber innerhalb von *Hylobates* durch detailliertere Verwandtschaftsverhältnisse (Geismann, 2002a) ergänzt.

Die Kalibrierung der molekularen Uhr stellt auch bei den Hominoidea eine große Schwierigkeit dar. Da man heute prinzipiell von einem älteren Ursprung der Primaten ausgeht (Martin, 2003; Tavaré et al., 2002), müssen auch die Kalibrierungspunkte für die Hominoidea zurückgesetzt werden. So schätzten Arnason et al. (1998) den letzten gemeinsamen Vorfahren aller Catarrhini auf etwa 50 Millionen Jahre (Mio) und den der Hominoidea auf etwa 34 Mio. Im Gegensatz hierzu werden in den meisten anderen Arbeiten deutlich jüngere Zeiten von etwa 25 Mio für die Aufspaltung von Cercopithecoidea und Hominoidea verwendet (Goodman et al.,

1998; Goodman, 1999; Page & Goodman, 2001; Stewart & Disotell, 1998). Basis letzterer Datierungen sind die beiden Fossilien *Proconsul*, ein Vorfahr der Hominoidea und *Victoriapithecus*, ein ursprünglicher Cercopithecoidea-Vertreter, die beide vor etwa 15-20 Mio lebten (Stewart & Disotell, 1998). Der anhand genetischer Daten geschätzte letzte gemeinsame Vorfahr aller Hominoidea lebte somit vor etwa 18 Mio. Folglich wurden in dieser Arbeit die beiden diskutierten Aufspaltungszeiten von 18 und 34 Mio als Kalibrierungsspunkt für die Datierung verwendet. Nimmt man diese Zeiten für die Aufspaltungen von Hominidae und Hylobatidae an, ergibt sich für das Cytochrom b eine Evolutionsrate von $7,31 \times 10^{-9}$ und $3,87 \times 10^{-9}$ Substitutionen/Position/Jahr.

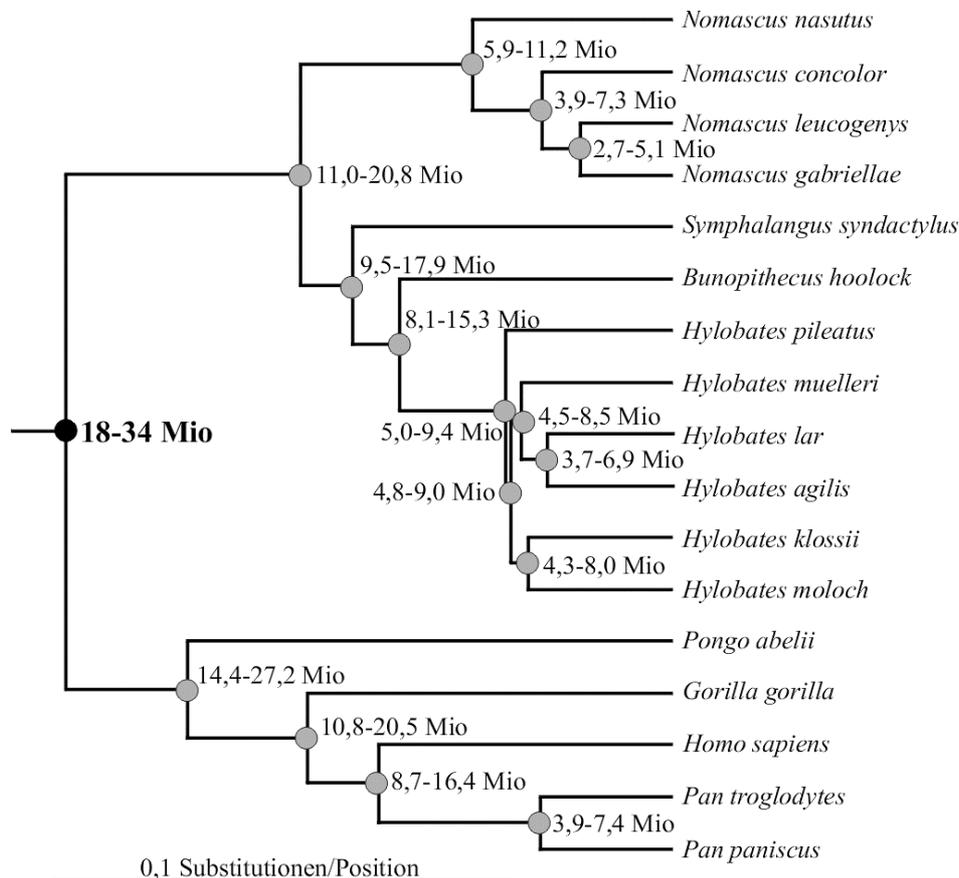


Abbildung 24: Aufspaltungszeiten errechnet anhand eines ML-Baumes. Der schwarze Kreis gibt die Referenzwerte; die grauen Kreise die ermittelten Zeitpunkte für die jeweiligen letzten gemeinsamen Vorfahren an.

Nach der Aufspaltung in die beiden Familien Hominidae und Hylobatidae vor etwa 18-34 Mio, kam es innerhalb der Hominidae zu einer relativ frühen Abtrennung von *Pongo* (14,4-27,2

Mio). Von den übrigen drei Gattungen stellt *Gorilla* (10,8-20,5 Mio) die erste Abzweigung dar. Die beiden Linien *Homo* und *Pan* trennten sich schließlich vor etwa 8,7-16,4 Mio, wobei sich letztere Gattungen vor 3,9-7,4 Mio zusätzlich in die zwei Arten *P. paniscus* und *P. troglodytes* unterteilte.

Die Aufspaltung in die vier Gibbon-Gattungen dagegen erfolgte in einem relativ kurzem Zeitraum (2,9-5,5 Mio), wobei sich *Nomascus* als erste Gattung von der Stammlinie abzweigte (11,0-20,8 Mio). Nach der Abtrennung von *Symphalangus* vor etwa 9,5-17,9 Mio, kam es schließlich zu einer letzten Verzweigung in die Gattungen *Bunopithecus* und *Hylobates* (8,1-15,3 Mio). Die sechs *Hylobates*-Arten entstanden innerhalb eines sehr kurzen Zeitrahmens von nur 1,3-2,5 Mio, so daß die Artbildung vor etwa 3,7-6,9 Mio abgeschlossen war. Die Unterteilung in einzelne Arten innerhalb *Nomascus* begann mit der Abspaltung von *N. nasutus* vor etwa 5,9-11,2 Mio und wurde durch eine letzte Verzweigung zwischen *N. gabriellae* und *N. leucogenys* vor etwa 2,7-5,1 Mio beendet.

5.4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals alle zwölf anerkannten Gibbon-Arten molekulargenetisch untersucht. Die erzielten Ergebnisse erbrachten klare Hinweise auf die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Hylobatidae, so daß diese einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von Evolution und Biogeographie der kleinen Menschenaffen liefern.

Mit den mitochondrialen Daten aller Gibbon-Arten, fünf Hominae-Vertretern sowie von *Papio hamadryas* wurden Stammbäume unter Verwendung unterschiedlicher Algorithmen und Sequenzevolutionsmodelle ermittelt, die die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der beiden Familien meist gut auflösten. Da die Basenzusammensetzungen zwischen den analysierten Gattungen kaum variiert, kann eine artifizielle Gruppierung phylogenetisch nicht verwandter Taxa nahezu ausgeschlossen werden (Schmitz et al., 2002b; Tarrío et al., 2001), so daß die ermittelte Phylogenie die tatsächliche Evolution der Hominoidea widerspiegelt.

Phylogenie und Taxonomie der Hylobatidae

Die Monophylie der beiden Schwesterfamilien Hominidae und Hylobatidae ist durch den Datensatz gut unterstützt und bestätigt somit die allgemein gültige Einteilung.

Innerhalb der Hylobatidae konnten die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den vier Gattungen nur bedingt gelöst werden. So ist zwar eine Schwestergruppenbeziehungen von *Hylobates* und *Bunopithecus* relativ gut belegt, die Verhältnisse zwischen dieser Gruppe, *Symphalangus* und *Nomascus* aber nur zu erahnen. Die mit den Cytochrom b Daten angedeutete basale Stellung von *Nomascus* wird jedoch eindeutig durch Sequenzinformation der mitochondrialen Kontrollregion bestätigt (Roos & Geissmann, 2001), so daß davon auszugehen ist, daß die hier ermittelte Phylogenie der realen Evolution entspricht. Demnach kam es nach einer ersten Abspaltung von *Nomascus* zur Abzweigung von *Symphalangus*. Die letzte Untergliederung innerhalb der Gibbons fand schließlich zwischen *Bunopithecus* und *Hylobates* statt. Möglicherweise kann diese phylogenetische Konstellation auch mit der Reduktion der diploiden Chromosomenzahl von $2n=52$, über 50 bis zu 44 und 38 in Zusammenhang gebracht werden. Da die beobachteten Differenzen zwischen den vier Gibbon-Gattungen mit denen zwischen *Homo*, *Pan* und *Gorilla* vergleichbar sind, ist der Gattungsstatus der vier Hauptgruppen gerechtfertigt und bestätigt frühere Daten (Roos & Geissmann, 2001). Innerhalb der Gattung *Nomascus* wurden vier sehr unterschiedliche Taxa bearbeitet, die sich im untersuchten Gen in 4,21-7,98% unterscheiden. Als erste Art spaltete sich *N. nasutus* von der Stammlinie ab, deren Existenz erst kürzlich bestätigt wurde (Goldthorpe et al., in Präp.). Nachdem sich *N. concolor* abtrennte, kam es schließlich zu einer weiteren Verzweigung in die beiden Arten *N. leucogenys* und *N. gabriellae*. Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den sechs untersuchten *Hylobates*-Arten waren mit den vorliegenden Daten nicht zu klären und entsprachen somit früheren Ergebnissen (Chivers, 1977; Creel & Preuschoft, 1984; Garza & Woodruff, 1992; Geissmann, 2002a, b; Haimoff et al., 1982). Da die beobachteten Differenzen zwischen 5,61 und 7,11% liegen, ist jedoch der Artstatus der sechs Taxa gerechtfertigt ist.

Die Hominidae unterteilen sich in die vier Gattungen *Pongo*, *Gorilla*, *Pan* und *Homo*, wobei sich *Pongo* als erstes abzweigt. Als nächstes trennt sich *Gorilla* ab, so daß die rezenteste

Aufspaltung durch *Homo* und *Pan* repräsentiert wird. Innerhalb der Gattung *Pan* kam es schließlich vor 3,9-7,4 Mio zu einer weiteren Untergliederung in die beiden Arten *P. paniscus* und *P. troglodytes*.

Biogeographie der Hylobatidae

Durch die Analyse aller anerkannten Gibbon-Arten konnte in dieser Arbeit erstmals ein vollständiges Bild der Hylobatidae-Evolution gezeichnet werden. Um aber die ermittelte Phylogenie und die daraus abgeleiteten Verbreitungsmuster in Zusammenhang mit geologischen oder klimatischen Veränderungen bringen zu können, müssen ebenfalls die Aufspaltungszeiten der einzelnen Gibbon-Taxa bekannt sein. Wie bei allen Primaten ist aber die Datierung aufgrund der wenigen und schwer klassifizierbaren Fossilfunde, die eine mögliche Kalibrierung molekularer Uhren abgeben würden, schwierig. Der häufig verwendete Referenzpunkt von 25 Mio für die Aufspaltung von Hominoidea und Cercopithecoidea basiert auf den Fossilien *Proconsul* und *Victoriapithecus*. *Proconsul* lebte vor etwa 17-20 Mio in Afrika und wird als früher Vorfahr der Hominoidea angesehen. *Victoriapithecus* dagegen liegt in der Cercopithecoidea-Linie und lebte vor etwa 15-19 Mio ebenfalls in Afrika. Basierend auf diesen Fossilien und anschließender molekularer Datierung wurde der letzte gemeinsame Vorfahr aller Hominoidea auf etwa 18 Mio geschätzt (Übersicht in Stewart & Disotell, 1998). Da man heute prinzipiell von einem älteren Ursprung der Primaten ausgeht (Martin, 2003; Tavaré et al., 2002), müssten auch die Aufspaltungszeiten der Hominoidea zurückgesetzt werden. Gestützt wird diese Idee durch molekulare Arbeiten, in denen Kalibrierungspunkte außerhalb der Primaten gewählt wurden (Arnason et al., 1996a, 1998, 2000). Die dabei ermittelten Aufspaltungszeiten liegen bei 50-52 Mio für Cercopithecoidea – Hominoidea und 32-36 Mio für Hominidae – Hylobatidae. Aufgrund der Unklarheiten bezüglich des Ursprungs der Primaten wurden in der vorliegenden Studie die beiden diskutierten Aufspaltungszeiten von 18 und 34 Mio als Referenzwert für die Kalibrierung der molekularen Uhr verwendet.

Die molekularen Daten und Verbreitungsmuster sprechen für einen afrikanischen Ursprung der Catarrhini (Stewart & Disotell, 1998). Demnach wanderten die Hominoidea vor

mindestens 18-34 Mio aus Afrika nach Eurasien aus und verzweigten sich in die beiden Familien Hominidae und Hylobatidae. Die Hominidae unterteilten sich weiterhin in vier Gattungen, von denen sich *Pongo* vor etwa 14,4-27,2 Mio abtrennte. Ein Vorfahr der restlichen drei Gattungen ist dann wieder nach Afrika zurückgekehrt und verzweigte sich vor etwa 10,8-20,5 Mio bzw. 8,7-16,4 Mio in die Linien *Gorilla*, *Homo* und *Pan*. Die berechneten Werte stimmen nur bedingt mit den angenommenen Zeiten anderer Arbeiten überein. So ist zwar die frühe Abspaltung von *Pongo* vor etwa 14 Mio (Übersicht in Stewart & Disotell, 1998) bzw. 24-30 Mio (Arnason et al., 1996, 1998, 2000) mit den Daten dieser Arbeit vergleichbar, jedoch sind die hier ermittelten Aufspaltungszeiten zwischen *Gorilla/Pan/Homo* im Vergleich zu anderen Schätzungen etwas erhöht. Da die geologischen Gegebenheiten innerhalb dieser kurzen Zeitspannen aber nur gering variierten, hat dies kaum Einfluß auf die biogeographische Verbreitungsgeschichte der Hominidae. Prinzipiell stellt sich aber die Frage, wann die Wanderungen stattfanden. Wäre ein Vorfahr der Hominoidea vor mindestens 34 Mio aus Afrika nach Eurasien gewandert, hätte er eine Reihe von Wasserbarrieren überwinden müssen (Whybrow, 1984, 1992). Da dies eher unwahrscheinlich ist, geht man davon aus, daß die Migrationen vor 20 bzw. 10 Mio stattfanden, als Landbrücken eine Verbindung zwischen den Kontinenten herstellten (Stewart & Disotell, 1998). Schätzungen die sehr gut mit den ermittelten Aufspaltungszeiten von 18 und 10,8 Mio übereinstimmen.

Die Hylobatidae unterteilten sich innerhalb eines sehr kurzen Zeitraumes (2,9-5,5 Mio) in die vier Gattungen. Die tiefste Abspaltung stellt *Nomascus* dar, die sich bereits vor etwa 11,0-20,8 Mio von der Stammlinie abtrennte. Die nächste Verzweigung vor etwa 9,5-17,9 Mio wird von *Symphalangus* repräsentiert, die nur auf der malaiischen Halbinsel und Sumatra überlebte. Schließlich unterteilte sich die dritte Linie vor etwa 8,1-15,3 Mio in *Bunopithecus* und *Hylobates*.

Drei der vier Gattungen (*Nomascus*, *Bunopithecus* und *Hylobates*) kommen im Quellgebiet der Flüsse Yangtze, Mekong und Salween vor, so daß diese Region als mögliches Ursprungsgebiet der Gibbons in Frage kommt. Da *Nomascus* ursprünglich über weite Teile Chinas verbreitet war (Gao et al., 1981; van Gulik, 1967; Zhang et al., 1992) und die ermittelte

Phylogenie eine klare Nord-Süd-Wanderung der Arten (von *N. nasutus* über *N. concolor* bis zu *N. leucogenys* und *N. gabriellae*) beschreibt, ist davon auszugehen, daß *Nomascus* über den Oberlauf des Mekong in das Gebiet östlich des Flusses einwanderte und sich dort nach Süden hin ausdehnte. Eine mögliche Überquerung des Mekongs unterhalb seines Oberlaufes erscheint dagegen als unwahrscheinlich, da der Fluss mindestens seit dem mittleren Miozän gewaltige Ausmaße hat (Métivier & Gaudemer, 1999) und auch für weitere Primatenarten (*Rhinopithecus*, *Pygathrix*, *Trachypithecus francoisi*-Gruppe, *Nycticebus pygmaeus*) eine unüberwindbare Barriere darstellt.

Die Abspaltung von *Symphalangus* vollzog sich vor etwa 9,5-17,9 Mio. Da die Gattung heute auf der malaiischen Halbinseln und auf Sumatra vorkommt und der Unterart-Status der beiden Formen angezweifelt wird (Geissmann, 1995), wäre es möglich, daß *Symphalangus* vor 9,5-17,9 Mio nur die malaiische Halbinsel und erst sehr viel später, während einer der vielen Meeresspiegel-Absenkungen im Pleistozän (Bergh et al., 1996), Sumatra besiedelte.

Die Verzweigung der heute durch den Salween-Fluß getrennten Gattungen *Bunopithecus* und *Hylobates* fand vor etwa 8,1-15,3 Mio statt. Da der Salween vermutlich bereits zu dieser Zeit eine schwer überwindbare Barriere darstellte, erscheint eine Überquerung des Flusses im Oberlauf als wahrscheinlich.

Die Gattung *Hylobates* unterteilte sich schließlich Radiations-artig vor 5,0-3,7 bzw. 9,4-6,9 Mio in sechs Arten, die über weite Teile Süd-Ost-Asiens verbreitet sind. Da in beiden Zeiträumen Verbindungen zwischen den heutigen Verbreitungsgebieten bestanden, kann keine der Zeiten für die Ausdehnung der Gattung ausgeschlossen werden. Die Verbindungen zwischen den Inseln und dem Festland waren jedoch durch einen niedrigeren Meeresspiegel vor 5 Mio deutlich mehr ausgeprägt als vor 10 Mio (Hall, 1998, 2001), so daß eine spätere Radiation vor 5,0-3,7 Mio eher in Frage kommt.

5.5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Gibbon-Studie wurden erstmals alle 12 Arten der Hylobatidae molekulargenetisch untersucht. Die anhand mitochondrialer Cytochrom b Daten erstellten

Phylogenien erbrachten meist eine klare Auflösung der Verwandtschaftsverhältnisse und bestätigten die bereits publizierten Ergebnisse. Demnach spaltet sich *Nomascus* als erste Linie ab, gefolgt von *Symphalangus*, wobei die letzte Verzweigung durch *Bunopithecus* und *Hylobates* repräsentiert wird. Innerhalb der Gattungen konnten die phylogenetischen Beziehungen nur bedingt gelöst werden. So kann zwar vom Datensatz eindeutig die Abspaltungsfolge der *Nomascus*-Arten abgeleitet werden, nicht aber die der *Hylobates*-Arten, die sich vermutlich Radiations-artig verzweigten. Weiterhin konnten die Zeiten für die jeweiligen letzten gemeinsamen Vorfahren der einzelnen Gruppen ermittelt werden. Da die jüngeren Datierungen insgesamt besser mit den geologischen Gegebenheiten vereinbar sind, wird davon ausgegangen, daß der Ursprung der Hominoidea nicht älter als 25 Mio ist.

6. Allgemeine Diskussion

Das primäre Ziel dieser Dissertation war die Auflösung von phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen innerhalb der Halbaffen, Schlankaffen und Gibbons, die jeweils durch ein umfangreiches Arten-Spektrum repräsentiert waren. So konnten alle Gattungen der Halbaffen, neun der zehn Colobinae-Gattungen und alle Gibbon-Arten bearbeitet werden. Für die Rekonstruktion der Verwandtschaftsbeziehungen wurden Fragmente des mitochondrialen Genoms sequenziert und phylogenetisch analysiert. Zusätzlich wurden exemplarisch für die Halbaffen 51 Transpositionereignisse, die als molekular-kladistische Marker Verwendung fanden, charakterisiert. Die mit den beiden Methoden erstellten Phylogenien erbrachten dabei überwiegend eindeutige Verwandtschaftsverhältnisse, so daß die Ergebnisse dieser Arbeit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der evolutionären Zusammenhänge innerhalb der drei Primatengruppen liefern. Anhand der erstellten Phylogenien und in Kombination mit geologischen Gegebenheiten wurde auch die biogeographische Verbreitungsgeschichte der jeweiligen Gruppen rekonstruiert und mögliche Überschneidungen zwischen diesen ermittelt.

Basenzusammensetzung

Die Analyse der Cytochrom b Sequenzen zeigt eine hohe Variabilität der Basenzusammensetzung zwischen den einzelnen Halbaffen-Gattungen an. Innerhalb der Colobinae und Hominoidea dagegen sind diese sehr homogen gestaltet, wobei zwischen Colobinae und Cercopithecinae ebenfalls eine klare Verschiebung des Guanin- und Cytosin-Gehalts erkennbar ist. Vermutlich ist die sehr heterogene Basenzusammensetzung bei Halbaffen für die auf mitochondrialen Daten basierende und durch drei Transpositionereignisse widerlegte artifizielle Gruppierung von Galagonidae und afrikanischen Loridae zum Ausschluß der asiatischen Loridae verantwortlich. Ein Grund für die Veränderungen der Basenzusammensetzung liegt möglicherweise in einem Mitochondrien-spezifischen gerichteten Mutationsdruck, der bereits für Primaten und Dermopteren beschrieben wurde (Schmitz et al., 2002b).

Paarweise Differenzverteilung und Systematik

Die beobachteten Differenzen im Cytochrom b Gen zwischen den Halbaffen-Taxa sind durchschnittlich größer als die zwischen den Colobinae- und Hylobatidae-Taxa der gleichen taxonomischen Einheit. So unterscheiden sich die anerkannten Halbaffen-Arten in 2,72-14,45%; die maximale Differenz zwischen den Arten der Hylobatidae dagegen liegt bei nur 7,98%. Ähnliches gilt für die Gattungen: bei Halbaffen liegt der Unterschied bei 12,54-19,56%; bei Colobinae bei 12,34-15,69% und bei Hylobatidae bei 9,47-15,35%.

Insgesamt bestätigen die ermittelten paarweisen Differenzvergleiche die heutigen Erkenntnisse, daß die Diversität kleiner Säuger-Arten eher unter- und die der größeren Arten eher überschätzt wurde (Castresana, 2001). So wurden bei kleineren Arten sehr unterschiedliche Taxa nur als Unterarten oder überhaupt nicht als eigenständige Taxa anerkannt, wogegen bei größeren Arten häufig zu stark unterteilt wurde. In dieser Arbeit konnte diese Körpergrößenbasierte Ungleichverteilung bestätigt werden. Weiterhin wurde festgestellt, daß auch nachtaktive Formen eine sehr viel größere Diversität repräsentieren als dies bisher angenommen wurde. So liegen die beobachteten Distanzen zwischen tagaktiven oder kathemerale Halbaffen-Arten (*Eulemur* sp., *Lemur catta*, *Hapalemur* sp., *Varecia* sp., *Propithecus* sp., *Indri indri*) bei maximal 11,58% (\emptyset 8,05%) und sind somit mit denen zwischen Hylobatidae-Arten von 7,98% vergleichbar. Im Gegensatz hierzu unterscheiden sich die nachtaktiven Halbaffen-Arten in bis zu 14,45% (*Microcebus* sp.). Bemerkenswert dabei ist, daß die tagaktiven Vertreter zum Beispiel der Gattung *Eulemur* traditionell schon immer in fünf Arten klassifiziert wurden, die der Gattung *Microcebus* aber bis vor kurzem nur in zwei Arten (Napier & Napier, 1985). Ähnliches trifft auch für die beiden einzigen nachtaktiven Gattungen der Haplorrhini *Tarsius* (Koboldmakis) und *Aotus* (Nachtaffen) zu. Traditionell klassifizierte man alle Formen der Nachtaffen als Unterarten von *Aotus trivirgatus* (Napier & Napier, 1985), jedoch unterscheiden sich die einzelnen Taxa durch sehr unterschiedliche Chromosomensätze, wonach heute acht Arten anerkannt werden (Geissmann, 2002a). Bei den Koboldmakis, die ursprünglich in drei Arten unterteilt wurden (Napier & Napier, 1985), geht man heute von mindestens sieben Arten aus (Geissmann, 2002a).

Erklären läßt sich diese Ungleichverteilung durch die ursprüngliche Klassifizierung anhand von überwiegend Fell-morphologischen Merkmalen. Im Gegensatz zu tagaktiven Primaten weisen nachtaktive Vertreter aber keine größeren Unterschiede in der Fellfärbung auf, da ihnen diese in der Dunkelheit keine Vorteile verschaffen. Für sie sind Unterschiede zum Beispiel in der Vokalisation sehr viel wichtiger; ein Merkmal, welches erst in letzten Jahren näher untersucht wurde. Basierend auf den Ergebnissen dieser und weiterer Arbeiten (Castresana, 2000; Yoder et al., 2000) läßt sich vermuten, daß die Diversität nachtaktiver und kleinerer Arten bisher als zu gering angenommen wurde und es somit zukünftig durch die Analyse besser geeigneter Merkmale zu weiteren taxonomischen Aufspaltung innerhalb dieser Gruppen kommen wird.

Phylogenetische Rekonstruktionen

Für die Analyse phylogenetischer Verwandtschaftsbeziehungen wurden in dieser Arbeit überwiegend Sequenzen des mitochondrialen Cytochrom b Gens (1140 bp) verwendet. Die Abspaltungsfolge innerhalb der Colobinae war mit diesem Datensatz aber nicht zu klären, so daß weitere Abschnitte des mitochondrialen Genoms sequenziert wurden. Das dafür auserwählte Fragment beinhaltete neben dem Cytochrom b Gen die Kontrollregion, die 12S rRNA, Teile der 16s rRNA sowie die dazwischen liegenden tRNAs und hatte eine Gesamtlänge von etwa 4,3 kb. Die anschließenden phylogenetischen Rekonstruktionen wurden mit Hilfe unterschiedlicher Algorithmen und Sequenzevolutionsmodelle durchgeführt. Die dabei ermittelten Baumtopologien waren meist identisch und unterschieden sich nur in der statistischen Unterstützung einzelner Äste, so daß davon auszugehen ist, daß die erstellten Phylogenien die reale Evolution der drei Primatengruppen widerspiegeln. Bewiesen werden konnte dies zudem am Beispiel der Halbaffen anhand von molekular-kladistischen Markern. Die dabei ermittelte Phylogenie bestätigte prinzipiell die auf mitochondriale Daten basierende Topologie, löste in einigen Fällen jedoch sogar besser auf (Position *Phaner*, Verhältnis Indriidae-Lemuridae). Einzig widersprüchlich waren die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen afrikanischen Loridae, asiatischen Loridae und Galagonidae. Obwohl die Monophylie der Loridae durch drei

Transpositionereignisse klar belegt ist, deuten die mitochondrialen Daten eine Schwestergruppenbeziehung der afrikanischen Vertreter zum Ausschluß der asiatischen an. Da diese Konstellation statistisch aber relativ schwach oder gar nicht unterstützt ist, sollte diese als unaufgelöst angesehen werden, wodurch sich der Widerspruch zur SINE-basierten Phylogenie aufhebt.

Insgesamt zeigte sich, daß die mitochondrialen Daten besonders zur Rekonstruktion von phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen zwischen nah verwandten Taxa, jedoch nicht zur Auflösung von Radiationen oder tiefen Verzweigungen geeignet waren. Trotz der möglichen Ungleichverteilung von ursprünglich polymorphen Markern in Folgelinien („Incomplete Lineage Sorting“), die hier nicht entdeckt wurde, erwiesen sich Transpositionereignisse bei tiefen Aufspaltungen als unschlagbares Markersystem. Durch die Kombination von mitochondrialen und molekular-kladistischen Daten konnte so ein vollständiges Bild der Halbaffen-Evolution gezeichnet werden. Für die Schlankaffen und Gibbons wurden ausschließlich mitochondriale Daten verwendet, die aber aufgrund der jungen Aufspaltungen eine relativ gute Auflösung der Verwandtschaftsbeziehungen ermöglichten.

Biogeographische Rekonstruktionen

Anhand der klar belegten Phylogenien konnten die Verbreitungsmuster der drei Gruppen rekonstruiert werden. Um aber mögliche Zusammenhänge zwischen diesen Szenarien und geologischen Veränderungen aufzudecken, müssen auch Zeiten für die jeweiligen Wanderungen oder Separierungen bekannt sein. Die Berechnung dieser Zeiten erfolgte anhand der Sequenzdaten unter Annahme einer molekularen Uhr. Zur Kalibrierung wurden Fossilfunde und bereits publizierte Referenzwerte aus molekularen Arbeiten verwendet. Da die Ansichten über den Ursprung der Primaten jedoch stark variieren (63-81,5 Mio), wurden in dieser Arbeit die jeweiligen diskutierten Zeiten zur Kalibrierung der molekularen Uhr eingesetzt. Aufgrund dieser Unsicherheiten bezüglich des Alters der Primaten und der Analyse eines nur sehr kurzen Abschnitts sollten die hier ermittelten Aufspaltungszeiten jedoch nur als grober Anhaltspunkt gewertet werden.

Insgesamt zeigte sich, daß die jüngeren Schätzungen für die jeweiligen Verzweigungen eher mit geologischen Veränderungen und Fossilfunden vereinbar sind als die älteren Datierungen. Bei den Halbaffen trifft dies vor allem auf die Besiedelung des indischen Subkontinents zu, der erst vor etwa 42 Mio mit Asien kollidierte (Patriat & Segoufin, 1988). Der älteren Schätzung zufolge wäre die Auswanderung aus Asien vor etwa 44-53 Mio geschehen und somit zu einer Zeit als noch keine Verbindung zwischen den beiden Landmassen bestand. Die Besiedelung des indischen Subkontinents durch *Loris* vor etwa 44 Mio läßt sich demnach nur durch eine Überquerung einer Wasserbarriere erklären. Die frühere Schätzung von 33 Mio für eine Besiedelung des indischen Raums dagegen wäre über Land möglich gewesen.

Die zweite große Wanderungsbewegung der Halbaffen führte nach Madagaskar und fand –je nach Kalibrierung– in einem Zeitraum von vor etwa 53-61, 44-50 bzw. 70-80 Mio statt. Da in all diesen Zeiträumen keine Landverbindung mehr zwischen der Insel und Afrika bestand, kann eine Besiedelung nur durch eine Überquerung der Straße von Mozambique über Wasser erklärt werden.

Bei den Schlankaffen und Gibbons stimmen die jüngeren Schätzungen ebenfalls besser mit den geologischen Gegebenheiten überein. Die Auswanderung der Colobinae und Hominoidea aus Afrika nach Asien vollzog sich vor etwa 8,6-9,9 oder 18,3-21,2 Mio (Colobinae) bzw. vor etwa 18 oder 34 Mio (Hominoidea). Da in der Zeit von vor 10-20 Mio der Weg zwischen Asien und Afrika durch keine größeren Wasserbarrieren eingeschränkt wurde, gilt dieser Zeitraum für die Wanderungsbewegungen als sehr wahrscheinlich (Stewart & Disotell, 1998). Somit würden zwar die beiden geschätzten Zeiträume für die Colobinae-Auswanderung in diesem Bereich liegen, jedoch für die Hominoidea nur der jüngere. Die Ausdehnung der Colobinae- und Hylobatidae-Gattungen dagegen war vermutlich weniger durch Veränderungen des Meeresspiegels beeinflusst, so daß hier keine Zusammenhänge aufgedeckt wurden. Die auf etwa 3,7-5,0 Mio geschätzte Ausbreitung der *Hylobates*-Arten jedoch war aufgrund stärker ausgeprägter Landbrücken zwischen den heutigen Verbreitungsgebieten eher möglich als vor etwa 6,9-9,4 Mio. Weiterhin kommt hinzu, daß die Mentawai-Inseln möglicherweise erst vor etwa 5 Mio entstanden sind (Hall, 1998) und somit eine Besiedelung vor etwa 8 Mio durch *H. klossii*

ausgeschlossen werden kann. Ähnliches gilt auch für die Besiedelung der Inseln durch *Simias*. Aufgrund der vermuteten Schwestergruppenbeziehung von *Simias* und *Nasalis* kann deren Verzweigung auf maximal 6 bzw. 13 Mio geschätzt werden. Aus geologischen Gründen ist eine Kolonialisierung der Inseln somit nur mit dem jünger geschätzten Zeitpunkt vereinbar.

Auf dem afrikanischen Kontinent sind Schlankaffen und Halbaffen weit verbreitet, wobei Schlankaffen fast ausschließlich im tropischen Regenwald zu finden sind. Obwohl Vertreter beider Gruppen sympatrisch vorkommen, wurden keine Ähnlichkeiten zwischen den Verbreitungsmustern der Gattungen erkannt. In Asien dagegen wurden klare Überschneidungen zwischen den ermittelten Verbreitungsszenarien der Halbaffen, Schlankaffen und Gibbons festgestellt, von denen im folgendem einige näher beschrieben werden:

1. indischer Subkontinent

Jeweils eine Gattung der Halbaffen (*Loris*) und Schlankaffen (*Semnopithecus*) ist auf dem indischen Subkontinent und Sri Lanka verbreitet. Da beide Gattungen in ihren Primatengruppen immer die erste Abspaltung innerhalb der asiatischen Vertreter darstellen, ist anzunehmen, daß deren Vorfahren aus Afrika nach Asien einwanderten. Nach der Abzweigung der indischen Formen sind dann die Vorfahren der restlichen Presbytini bzw. von *Nycticebus* weiter nach Süd-Ost-Asien vorgedrungen. Obwohl zwar hier eine klare geographische Verbindung zwischen den beiden Szenarien besteht, muß es sich aber um zwei unabhängige Ereignisse gehandelt haben, da die Schlankaffen erst vor etwa 8,6-9,9 (18,3-21,2) Mio nach Asien einwanderten und somit deutlich später als die Halbaffen (33-40 (44-53) Mio).

2. Indochina: Mekong

In allen drei Primatengruppen lassen sich Vertreter finden, die in Indochina (Region östlich des Mekongs) endemisch sind. Bei den Halbaffen ist dies *Nycticebus pygmaeus*, bei Schlankaffen sind dies die Gattungen *Pygathrix* und *Rhinopithecus* sowie die Superspezies *Trachypithecus [francoisi]* und bei den Gibbons die Gattung *Nomascus*. Die Abspaltung von *N. pygmaeus* von den restlichen *Nycticebus*-Arten vollzog sich vor etwa 10,5-13,7 Mio und ist somit mit der

Abtrennung von *Nomascus* von den übrigen Hylobatidae-Gattungen vor etwa 11,0-20,8 Mio vergleichbar. Die Überquerung des Mekongs durch die „odd-nosed monkeys“ *Nasalis*, *Pygathrix* und *Rhinopithecus* dagegen geschah erst vor etwa 6,2-7,7 (13,2-16,5) Mio. In der Geschichte des Flusses kam es dann noch zu weiteren Überquerung durch Arten der Schlankaffen (*T. germaini*, *T. crepusculus* mit *Trachypithecus* [*francoisi*]) und Halbaffen (*N. bengalensis*), die aber vermutlich erst im Plio- und Pleistozän stattfanden.

3. Indochina: Yangtze

Nachdem *Nasalis* nach Borneo auswanderte, verzweigten sich vor etwa 5,7-12,2 Mio auch *Pygathrix* und *Rhinopithecus*. Etwa zeitgleich (5,9-11,2 Mio) spaltete sich auch *Nomascus nasutus* von den südlicheren Formen ab. Als mögliche Barriere zwischen den jeweiligen Gruppen und als nördliche Grenze von *Pygathrix* kommt der Yangtze in Frage, der bis ins späte Miozän im Delta des roten Flusses (Nord-Vietnam) mündete und erst später seinen heutigen Verlauf einnahm (Kottelat, 1989). Für die später eingewanderten Arten stellte der Yangtze dagegen keine Barriere mehr dar, da sie sich erst nach dessen Richtungswechsel ausdehnten.

4. Mentawai-Inseln

Auf den Mentawai-Inseln (Siberut, Sipora, Nord- und Süd-Pagai) westlich von Sumatra leben die fünf endemischen Primatenarten *Presbytis potenziani*, *Simias concolor*, *Hylobates klossii*, *Macaca siberu* und *M. pagensis*, wobei für die Makaken bereits gezeigt wurde, daß diese die Inseln zweimal (vor 1,1 und 2,2 Mio) besiedelten (Roos et al., 2003). Da die anderen drei Arten jedoch im Gegensatz zu *Macaca* keine nah verwandte Form auf Sumatra haben, ist eine einmalige Besiedelung der Inseln durch diese Arten wahrscheinlich, konnte aber aufgrund der wenigen molekularen Daten bisher nicht bestätigt werden. Nach den Berechnungen dieser Arbeit besiedelte *H. klossii* die Inseln vor 4,3-8,0 Mio. Da die Mentawais aber vermutlich erst vor etwa 5 Mio entstanden sind (Hall, 1998), käme nur die jüngere Schätzung für eine Besiedelung in Frage. Ähnliches trifft auch für die Kolonialisierung durch *Simias* zu. Obwohl in bisherigen molekularen Arbeiten noch kein Vertreter dieser Gattung untersucht wurde, geht man aufgrund

morphologischer Merkmale von einer Schwestergruppenbeziehung von *Nasalis* und *Simias* aus (Geissmann, 2002a). Den hier errechneten Zeiten entsprechend trennte sich *Nasalis* vor 6,2-13,2 Mio von *Pygathrix/Rhinopithecus* ab, wodurch eine Besiedelung der Inseln durch *Simias* auf maximal 6 bzw. 13 Mio festgelegt werden kann. Da diese beiden Werte aber die maximale Spanne beschreiben, wäre ein späterer Zeitpunkt ebenfalls möglich, wobei aus geologischen Gründen hier auch nur die jüngere Schätzung von maximal 6 Mio in Frage kommt. Von *Presbytis potenziani* gibt es bisher ebenfalls keine molekularen Daten, wodurch dessen phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen zu anderen *Presbytis*-Vertretern ungeklärt blieb. Anhand molekularer Daten konnte jedoch der letzte gemeinsame Vorfahr der übrigen *Presbytis*-Arten auf etwa 4,9-10,5 Mio geschätzt werden (Roos, unpublizierte Daten). Da *P. potenziani* innerhalb der Gattung vermutlich eine sehr frühe Abspaltung darstellt, kann eine Besiedelung der Mentawai-Inseln auf einen Zeitraum von etwa 4-5 bzw. 9-10,5 Mio begrenzt werden. Den errechneten Zeiten nach wären die Inseln somit insgesamt durch drei Wanderungsbewegungen besiedelt worden. Während der ersten, die kurz nach dem Entstehen der Inseln geschah, wanderten *Hylobates klossii*, *Presbytis potenziani* und *Simias concolor* ein, die letzten beiden Wanderungen dagegen vollzogen sich erst vor 2,2 und 1,1 Mio und hatten die erfolgreiche Besiedelung durch *Macaca siberu* und *M. pagensis* zur Folge.

7. Allgemeine Zusammenfassung

Die primäre Aufgabe dieser Studie war die Rekonstruktion von phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen innerhalb der Halbaffen (Strepsirrhini), Schlankaffen (Colobinae) und Gibbons (Hylobatidae). Basierend auf den erstellten Phylogenien sollten weiterhin die biogeographischen Verbreitungsmuster der jeweiligen Gruppen rekonstruiert und mögliche Überschneidungen zwischen diesen ermittelt werden.

Innerhalb der **Strepsirrhini** gibt es eine Reihe von unbeantworteten Fragen bezüglich ihrer Evolutionsgeschichte. Besonders herausragend ist die nach der phylogenetischen Position des Fingertieres (*Daubentonia*, Chiromyiformes) und der damit verbundenen Besiedelungsgeschichte Madagaskars. Ebenso interessant sind die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der in Asien und Afrika verbreiteten Loriformes. Obwohl die Monophylie der beiden Familien Loridae und Galagonidae anhand morphologischer Merkmale eindeutig belegt ist, gibt es molekulare Hinweise auf eine Paraphylie der Loridae. Hinzu kommt, daß auf beiden Kontinenten grazile als auch robuste Formen der Loridae vertreten sind, wodurch eine phylogenetische Rekonstruktion der Verwandtschaftsverhältnisse zusätzlich erschwert wird. Die Lemuriformes werden in die vier Familien Lemuridae, Indriidae, Lepilemuridae und Cheirogaleidae unterteilt. Deren Verwandtschaftsbeziehungen zueinander und die Abspaltungsfolgen innerhalb sind bisher jedoch nahezu ungeklärt.

Zur Rekonstruktion der evolutionären Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Halbaffen wurden Sequenzen des mitochondrialen Cytochrom b Gens von 145 Individuen aus allen 22 Gattungen generiert und anschließend mit unterschiedlichen Algorithmen und Sequenzevolutionsmodellen phylogenetisch analysiert. Weiterhin wurden 51 SINE-Integrationen auf Mono- und Multi-Lokus-Ebene charakterisiert, die als molekular-kladistische Marker die auf mitochondrialen Daten basierende Phylogenie untermauern sollten. Durch die Kombination der beiden Methoden konnten somit eine Reihe von evolutionsbiologischen Fragen der Halbaffen geklärt werden.

Die Ergebnisse beweisen eindeutig die Monophylie der madagassischen Vertreter, wodurch eine nur einmalige Besiedelung Madagaskars als wahrscheinlich gilt. Die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den vier Lemuriformes-Familien konnten dagegen mit keiner der beiden Methoden geklärt werden, jedoch fand sich eine SINE-Transposition, die Hinweise auf eine Schwestergruppenbeziehung von Lemuridae und Indriidae liefert. Die Abspaltungsfolge innerhalb der Lemuridae und Cheirogaleidae ist relativ gut aufgelöst. So trennt sich innerhalb der Lemuridae *Varecia* als erste Linie ab. *Eulemur* bildet schließlich die Schwestergattung zu einer Gruppe bestehend aus *Lemur* und *Hapalemur*. Bei den Cheirogaleidae stellt *Phaner* die erste Abzweigung dar, gefolgt von *Cheirogaleus* und *Allocebus*; *Mirza* und *Microcebus* bilden die letzte Aufspaltung. Die Verhältnisse zwischen den drei Indriidae-Gattungen *Indri*, *Propithecus* und *Avahi* dagegen sind nur schwach angedeutet. Die Monophylie der beiden Loriformes-Familien Loridae und Galagonidae konnte mit Hilfe von SINE-Integrationen klar bewiesen werden; ebenso die jeweilige Schwestergruppenbeziehung der afrikanischen (*Perodicticus*, *Arctocebus*) und asiatischen (*Nycticebus*, *Loris*) Loridae. Innerhalb der Galagonidae gibt es nur eine schwache Unterstützung für einen gemeinsamen Ursprung von *Galago* und *Otolemur* zum Ausschluß von *Galagoides*. Weiterhin lieferten die Daten klare Hinweise auf die Abspaltungsfolge innerhalb der einzelnen Gattungen.

Anhand der erstellten Phylogenie konnte die Verbreitungsgeschichte der Halbaffen rekonstruiert werden. So liegt der Ursprung der Strepsirrhini vermutlich in Afrika. Von dort aus kam es dann zu zwei Wanderungsbewegungen, die vor 53-61 (44-80) Mio nach Madagaskar und vor etwa 33-40 (27-53) Mio nach Asien führten.

Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den zehn **Colobinae**-Gattungen sind bis heute nahezu ungeklärt. Insbesondere trifft dies auf die angezweifelte Monophylie von afrikanischen und asiatischen Vertretern zu. Weiterhin gibt es keine klaren Vorstellung über die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der „odd-nosed monkeys“ (*Nasalis*, *Simias*, *Pygathrix*, *Rhinopithecus*) und zwischen den ursprünglich in *Presbytis* vereinigten Spezies-Gruppen *Presbytis*, *Trachypithecus* und *Semnopithecus*. Die evolutionären Verhältnisse zwischen den drei

afrikanischen Gattungen *Colobus*, *Procolobus* und *Piliocolobus* sind ebenfalls unzureichend gelöst.

Zur Rekonstruktion der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Colobinae wurde ein etwa 4,3 kb langes Fragment des mitochondrialen Genoms von neun der zehn Gattungen sequenziert und phylogenetisch analysiert. Der auserwählte Abschnitt beinhaltet das Cytochrom b Gen, die Kontrollregion, die 12S rRNA, Teile der 16S rRNA sowie die dazwischen liegenden tRNAs für Threonin, Prolin, Phenylalanin und Valin. Da das Fragment schnell und langsamer evolvierende Bereiche enthält, sollte eine Auflösung der Verhältnisse ermöglicht werden.

Die ermittelten Phylogenien beweisen eindeutig die jeweilige Monophylie von asiatischen und afrikanischen Vertretern. Innerhalb der afrikanischen Gattungen bildet *Colobus* dann die erste Abspaltung, so daß *Procolobus* und *Piliocolobus* Schwestergattungen darstellen. Auf dem asiatischen Kontinent kam es zu einer ersten Abzweigung von *Semnopithecus*. Die restlichen Gattungen unterteilen sich in zwei Gruppen mit einerseits *Trachypithecus* und *Presbytis* und andererseits mit *Nasalis*, *Pygathrix* und *Rhinopithecus*. Obwohl ein gemeinsamer Ursprung der „odd-nosed monkeys“ klar belegt ist, können die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den drei untersuchten Gattungen nicht aufgelöst werden.

Anhand der erstellten Phylogenie ist von einem afrikanischen Ursprung der Colobinae auszugehen. Die Auswanderung nach Asien vollzog sich schließlich vor etwa 8,6-9,9 (18,3-21,2) Mio.

Die in Asien beheimateten **Hylobatidae** können in die vier Gattungen *Nomascus*, *Symphalangus*, *Bunopithecus* und *Hylobates* untergliedert werden. Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen diesen sind aber bisher kaum bekannt. Ebenso gibt es keine klaren Vorstellung über die phylogenetischen Beziehungen zwischen den sechs *Hylobates*- (*H. agilis*, *H. klossii*, *H. lar*, *H. moloch*, *H. muelleri*, *H. pileatus*) und den vier *Nomascus*-Arten (*N. concolor*, *N. gabriellae*, *N. leucogenys*, *N. nasutus*).

Zur Rekonstruktion der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Hylobatidae wurden Sequenzen des mitochondrialen Cytochrom b Gens von allen anerkannten Arten ermittelt und phylogenetisch untersucht.

Die Phylogenien deuten eine basale Position von *Nomascus* an. Nach der Abspaltung von *Symphalangus* trennten sich schließlich auch *Bunopithecus* und *Hylobates* voneinander. Innerhalb von *Nomascus* ist die Abspaltungsfolge klar belegt. Demnach spaltet sich *N. nasutus* als erste Linie ab, gefolgt von *N. concolor*, so daß *N. leucogenys* und *N. gabriellae* die rezenteste Verzweigung bilden. Die Verhältnisse zwischen den sechs *Hylobates*-Arten dagegen konnten nicht gelöst werden, so daß von einer Radiations-artigen Verzweigung auszugehen ist.

Zur Berechnung von Aufspaltungszeiten wurden die mitochondrialen Daten verwendet. Da das Alter des letzten gemeinsamen Vorfahren aller Primaten umstritten ist, wurden zur Kalibrierung der molekularen Uhr unterschiedliche Werte eingesetzt. Die anhand der Zeiten und Phylogenien ermittelten Verbreitungsszenarien wurden anschließend mit geologischen Gegebenheiten verglichen. Es zeigte sich, daß die jünger geschätzten Aufspaltungszeiten eher mit geologischen Veränderungen vereinbar sind als die älteren, so daß insgesamt von einem jüngeren Ursprung der Primaten auszugehen ist.

Da es in Afrika und Asien Überschneidungen zwischen den Verbreitungsgebieten der Primatengruppen gibt, wurden diese auf mögliche evolutionsgeschichtliche Zusammenhänge hin untersucht. Für den afrikanischen Kontinent ergaben sich dabei keine Verbindungen. In Asien jedoch konnten klare Korrelationen zwischen Evolution, Geologie und Verbreitung ermittelt werden. Insbesondere trifft dies auf den indischen Subkontinent, die Mentawai-Inseln und Indochina zu.

8. Literatur

- Adkins, R.M. & Honeycutt, R.L.** (1994): Evolution of the primate cytochrome c oxidase subunit II gene. *Journal of Biology and Evolution* **38**: 215-231.
- Arnason, U., Gullberg, A., Janke, A. & Xu, X.** (1996): Pattern and timing of evolutionary divergences between hominoids based on analyses of complete mtDNAs. *Journal of Molecular Evolution* **43**: 650-661.
- Arnason, U., Gullberg, A. & Janke, A.** (1998): Molecular timing of primate divergences as estimated by two nonprimate calibration points. *Journal of Molecular Evolution* **47**: 718-727.
- Arnason, U., Gullberg, A., Schweizer-Burguete, A. & Janke, A.** (2000): Molecular estimates of primate divergences and new hypotheses for primate dispersal and the origin of modern humans. *Hereditas* **133**: 217-228.
- Arnason, U., Adegoke, J.A., Bodin, K., Born, E.W., Esa, Y.B., Gullberg, A., Nilsson, M., Short, R.V., Xu, X. & Janke, A.** (2002): Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**: 8151-8156.
- Avis, J.C. & Johns, G.C.** (1999): Proposal for a standardized temporal scheme of biological classification for extant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**: 7358-7363.
- Bergh, G.D., de Vos, J., Sondaar, P.Y. & Aziz, F.** (1996): Pleistocene zoogeographic evolution of Java (Indonesia) and glacio-eustatic sea level fluctuations: a background for the presence of *Homo*. *Indo-pacific Prehistory Association Bulletin* **14**: 7-21.
- Brandon-Jones, D.** (1984): Colobus und leaf monkeys. In: MacDonald, I.D. (ed.), *Encyclopaedia of Mammals*. (George Allen & Unwin, London): 398-408.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A. & Wilson, A.C.** (1982): Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution* **18**: 225-239.
- Bruce, E.J. & Ayala, F.J.** (1979): Phylogenetic relationships between man and the apes: electrophoretic evidence. *Evolution* **33**: 1040-1056.
- Canavez, F.C., Moreira, M.A.M., Ladasky, J.J., Pissinatti, A., Parham, P. & Seuánez, H.N.** (1999): Molecular phylogeny of New World primates (Platyrrhini) based on β_2 -microglobulin DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **12**: 74-82.
- Cann, R.L., Stoneking, M. & Wilson, A.C.** (1987): Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* **325**: 31-36.
- Castresana, J.** (2000): Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* **17**: 540-552.

- Castresana, J.** (2001): Cytochrome b Phylogeny and the Taxonomy of Great Apes and Mammals. *Molecular Biology and Evolution* **18**(4): 465-471.
- Charles-Dominique, P. & Martin, R.D.** (1970): Evolution of lorises and lemurs. *Nature* **227**: 257-260.
- Chivers, D.J.** (1977): The lesser apes. In: Prince Rainier III of Monaco & Bourne, G.H. (eds.), *Primate Conservation*. (Academic Press, New York): 539-598.
- Collura, R.V. & Stewart, C.B.** (1995): Insertions and duplications of mtDNA in the nuclear genomes of Old World monkeys and hominoids. *Nature* **378**: 485-489.
- Creel, N. & Preuschoft, H.** (1984): Systematics of the lesser apes: A quantitative taxonomic analysis of craniometric and other variables. In: Preuschoft, H., Chivers, D.J., Brockelman, W.Y. & Creel, N. (eds.), *The Lesser Apes: Evolutionary and Behavioural Biology*. (Edinburgh University Press, Edinburgh): 562-613.
- Crovella, S., Masters, J.C. & Rumpler, Y.** (1994): Highly Repeated DNA Sequences as Phylogenetic Markers Among the Galaginae. *American Journal of Primatology* **32**: 177-185.
- Daniels, G.R. & Deininger, P.L.** (1985): Repeat sequence families derived from mammalian tRNA genes. *Nature* **371**: 819-822.
- De Boer, L.E.M.** (1973): Cytotaxonomy of the Lorisioidea (Primates: Prosimii). 1. Chromosome studies and karyological relationships in the Galagidae. *Genetica* **44**: 155-193.
- DelPero, M., Masters, J.C., Zuccon, D., Cervella, P., Crovella, S. & Ardito, G.** (2000): Mitochondrial Sequences as Indicators of Generic Classification in Bush Babies. *International Journal of Primatology* **21**(5): 889-904.
- DelPero, M., Masters, J.C., Cervella, P., Crovella, S., Ardito, G. & Rumpler, Y.** (2001): Phylogenetic relationships among Malagasy lemuriforms (Primates: Strepsirrhini) as indicated by mitochondrial sequence data from the 12S rRNA gene. *Zoological Journal of the Linnean Society* **133**: 83-103.
- Delson, E.** (1994): Evolutionary history of the colobine monkeys in paleoenvironmental perspective. In: Davies, A.G. & Oates, J.F. (eds.), *Colobine Monkeys – Their Ecology, Behaviour and Evolution*. (Cambridge University Press, Cambridge): 11-43.
- Dene, H., Goodman, M., Prychodko, W. & Moore, G.W.** (1976): Immundiffusion systematics of the primates: The Strepsirhini. *Folia Primatologica* **25**: 35-61.
- Dutrillaux, B.** (1988): Chromosome evolution in primates. *Folia Primatologica* **50**: 134-135.
- Dutrillaux, B. & Rumpler, Y.** (1995): Phylogenetic relations among Prosimii with special reference to Lemuriformes and Malagasy nocturnals. In: Alterman, L., Doyle, G.A. & Izard, M.K. (eds), *Creatures of the Dark: The Nocturnal Prosimians*. (Plenum Press, New York): 141-150.
- Eaglen, R.H.** (1980): *The Systematics of Living Strepsirrhini, With Special Reference to the Lemuridae*. Ph.D. Dissertation, Duke Universität.

- Fausser, J.L., Prosper, P., Donati, G., Ramanamanjato, J.B. & Rumpler, Y.** (2002): Phylogenetic relationships between *Hapalemur* species and subspecies based on mitochondrial DNA sequences. *BMC Evolutionary Biology* **2**: 1-9.
- Felsenstein, J.** (1993): PHYLIP (Phylogeny Inference Package), Version 3.5c. (Distributed by the author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle).
- Fietz, J.** (1999): Monogamy as a rule rather than exception in nocturnal lemurs: The case of the fat-tailed dwarf lemur, *Cheirogaleus medius*. *Ethology* **105**: 259-272.
- Fitch, W.M.** (1971): Toward defining the course of evolution: Minimal change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* **20**: 406-416.
- Gao, Y., Wen, H. & He, Y.** (1981): The change of historical distribution of Chinese gibbons (*Hylobates*). *Zoological Research* **2**: 1-8. (Chinesisch).
- Garza, J.C. & Woodruff, D.S.** (1992): A phylogenetic study of the gibbons (*Hylobates*) using DNA obtained non-invasively from hair. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **1**: 202-210.
- Geissmann, T.** (1989): A female black gibbon, *Hylobates concolor* subspecies, from northeastern Vietnam. *International Journal of Primatology* **10**: 455-476.
- Geissmann, T.** (1993): *Evolution of Communication in Gibbons (Hylobatidae)*. Ph.D. Dissertation, Universität Zürich.
- Geissmann, T.** (1994): Systematik der Gibbons. *Zeitschrift des Kölner Zoo* **37**: 65-77.
- Geissmann, T.** (1995): Captive management and conservation of gibbons in China and Vietnam, with special reference to crested gibbons (*Hylobates concolor* group). *Primate Report* **42**: 29-41.
- Geissmann, T.** (2002a): *Vergleichende Primatologie*. (Springer, Berlin/Heidelberg).
- Geissmann, T.** (2002b): Duet-splitting and the evolution of gibbon songs. *Biological Reviews* **77**: 57-76.
- Geissmann, T., Groves, C.P. & Roos, C.** (2003, eingereicht): On a live specimen of the Tenasserim Lutung, *Trachypithecus barbei* (Blyth, 1847). *Journal of Zoology*.
- Gingerich, P.D. & Uhen, M.D.** (1994): Time of origin of primates. *Journal of Human Evolution* **27**: 443-445.
- Goldthorpe, G., Pham Duc Tien & Roos, C.** (in Präp.): New Record for *Nomascus* sp. cf. *nasutus* in Kim Hy Forest, Bac Kan Province, Northern Vietnam and its Taxonomic Status.
- Goodman, M.** (1999): Molecular Evolution '99: The genomic Record of Humankind 's Evolutionary Roots. *American Journal of Human Genetics* **64**: 31-39.
- Goodman, M., Porter, C.A., Czelusniak, J., Page, S.L., Schneider, H., Shoshani, J., Gunnell, G. & Groves, C.P.** (1998): Toward a Phylogenetic Classification of Primates Based on DNA Evidence Complemented by Fossil Evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **9(3)**: 585-598.

- Groves, C.P.** (1970): The forgotten leaf-eaters, and the evolution of the Colobinae. In: Napier, J.R. & Napier, P.N. (eds.), *Old World Monkeys: Evolution, Systematics, and Behavior*. (Academic Press, New York): 555-587.
- Groves, C.P.** (1971): Systematics of the genus *Nycticebus*. *Proceedings of the Third International Congress of Primatology, Zürich 1970*: 44-53.
- Groves, C.P.** (1972): Systematics and phylogeny of gibbons. In: Rumbaugh, D.M. (ed.), *Gibbon and Siamang, Vol 1*. (Karger, Basel): 1-89.
- Groves, C.P.** (1974): Taxonomy and phylogeny of prosimians. In: Martin, R.D., Doyle, G.A. & Walker, A.C. (eds.), *Prosimian Biology*. (Duckworth, London): 435-448.
- Groves, C.P.** (1989): *A Theory of Human and Primate Evolution*. (Clarendon Press, Oxford).
- Groves, C.P.** (1993): Speciation in living hominoid primates. In: Kimbel, W.H. & Martin, L.B. (eds.), *Species, Species Concepts, and Primate Evolution*. (Plenum Press, New York/London): 109-121.
- Groves, C.P.** (2000): The genus *Cheirogaleus*: unrecognized biodiversity in dwarf lemurs. *International Journal of Primatology* **21**: 943-962.
- Groves, C.P.** (2001): *Primate Taxonomy*. (Smithsonian Institution, Washington/London).
- Groves, C.P. & Wang, Y.** (1990): The gibbons of the subgenus *Nomascus* (Primates, Mammalia). *Zoological Research* **11**: 147-154.
- Haimoff, E.H., Chivers, D.J., Gittins, S.P. & Whitten, A.J.** (1982): A phylogeny of gibbons (*Hylobates* spp.) based on morphological and behavioural characters. *Folia Primatologica* **39**: 213-237.
- Hall, B.G.** (2001): *Phylogenetic Trees Made Easy. A How-To Manual for Molecular Biologists*. (Sinauer Associates, Sunderland).
- Hall, L.M., Jones, D.S. & Wood, B.A.** (1998): Evolution of the gibbon subgenera inferred from cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **10**: 281-286.
- Hall, R.** (1998): The plate tectonics of Cenozoic SE Asia and the distribution of land and sea. In: Hall, R. & Holloway, J.D. (eds.), *Biogeography and Geological Evolution of SE Asia*. (Backhuys Publishers, Leiden): 99-131.
- Hall, R.** (2001): Cenozoic reconstructions of SE Asia and the SW Pacific: changing patterns of land and sea. In: Metcalfe, I., Smith, J.M.B., Morwood, M. & Davidson, I.D. (eds.), *Faunal and Floral Migrations and Evolution in SE Asia-Australasia*. (Swets & Zeitlinger Publishers): 35-56.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T.** (1985): Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **22**: 160-174.
- Hayashi, S., Hayasaka, K., Takenaka, O. & Horai, S.** (1995): Molecular phylogeny of gibbons inferred from mitochondrial DNA sequences: Preliminary report. *Journal of Molecular Evolution* **41**: 359-365.

- Hedges, S.B., Parker, P.H., Sibley, C.G. & Kumar, S.** (1996): Continental breakup and the ordinal diversification of birds and mammals. *Nature* **381**: 226-229.
- Hennig, W.** (1950): *Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik*. (Deutscher Zentralverlag, Berlin).
- Hill, W.C.O.** (1934): A monography on the purple-faced leaf-monkey (*Pithecus vetulus*). *Ceylon Journal of Science B* **9**: 23-88.
- Hill, W.C.O.** (1947): The loroid genus *Arctocebus*: Observations based on the type material. *Proceedings of the Royal Society Edinburgh* **23**: 155-164.
- Hillis, D.M.** (1999): SINEs of the perfect character. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**: 9979-9981.
- Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B.K.** (1996): *Molecular Systematics*. (Sinauer Associates, Sunderland).
- Honess, P.E.** (1996): *Speciation among galagos (Primates, Galagidae) in Tanzanian forests*. Ph.D. Dissertation, Oxford Brookes Universität.
- Honess, P.E.** (1997): Taxonomic revision of the galagos: Academic indulgence or practical necessity?. *Primate Eye* **63**: 21.
- Jablonski, N.G.** (1998): The evolution of the doucs and snub-nosed monkey and the question of the phyletic unity of the odd-nosed colobines. In: Jablonski, N.G. (ed.), *The Natural History of the Doucs and Snub-nosed Monkeys*. (World Scientific, Singapore): 13-52.
- Jablonski, N.G.** (1999): Primate evolution – in and out of Africa. *Current Biology* **9**: R119-R122.
- Jolly, A.** (1980): *A World Like Our Own*. (Yale University Press, New Haven).
- Jurka, J. & Klonowski, P.** (1996): Integration of Retroposable Elements in Mammals: Selection of Target Sites. *Journal of Molecular Evolution* **43**: 685-689.
- Kappeler, P.M.** (2000): Lemur Origins: Rafting by Groups of Hibernators?. *Folia Primatologica* **71**: 422-425.
- Kappeler, P.M., Rasoloarison, R.M., Zischler, H. & Roos C.** (in Präp.): Distribution, Molecular Phylogeny and Systematics of the Giant mouse lemur (*Mirza* sp., Gray 1870) with a description of a new species.
- Kay, R.F., Ross, C. & Williams, B.A.** (1997): Anthropoid origins. *Science* **275**: 797-804.
- Kishino, H. & Hasegawa, M.** (1989): Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order of Hominoidea. *Journal of Molecular Evolution* **29**: 170-179.
- Kottelat, M.** (1989): Zoogeography of the fishes from Indochinese inland waters with an annotated check list. *Bulletin Zoologisch Museum* **12**: 1-54.

- Krause, D., Hartmann, J. & Wells, A.** (1997): Late cretaceous vertebrates from Madagascar: Implications for biotic change in deep time. In: Goodman, S. & Patterson, B. (eds.), *Natural Change and Human Impact in Madagascar*. (Smithsonian Institutions Press, Washington): 3-43.
- Kuhn, H.J.** (1967): Zur Systematik der Cercopithecidae. In: Trarck, D.S., Schneider, R. & Kuhn, H.J. (eds.), *Neue Ergebnisse der Primatologie*. (G. Fischer, Stuttgart): 25-46.
- Kumar, S. & Hedges, S.B.** (1998): A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature* **392**: 917-920.
- Li, W.H. & Graur, D.** (1991): *Fundamentals of Molecular Evolution*. (Sinauer Associates, Sunderland).
- Li, W.H., Gu, Z., Wang, H. & Nekrutenko, A.** (2001): Evolutionary analyses of the human genome. *Nature* **409**: 847-849.
- Linnaeus, C.** (1758): *Systema Naturae per Regna Tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Characteribus, Differentis, Synonymis, Locis, 10th edition*. (Laurentius Salvius, Stockholm).
- Linnaeus, C.** (1789): *Systema Naturae, 13th edition*. (Gmelin, Paris).
- Liu, R., Shi, L. & Chen, Y.** (1987): A study on the chromosomes of the white-browed gibbon (*Hylobates hoolock leuconedys*). *Acta Theriologica Sinica* **7**: 1-7 (Chinesisch).
- Marshall, J.T. & Sugardjito, J.** (1986): Gibbon systematics. In: Swindler, D.R. & Erwin, J. (eds.), *Comparative Primate Biology, Vol 1: Systematics, Evolution, and Anatomy*. (R. Liss, New York): 137-185.
- Martin, R.D.** (1990): *Primate Origins and Evolution: A Phylogenetic Reconstruction*. (Chapman Hall/Princeton University Press, London/New Jersey).
- Martin, R.D.** (2000): Origins, Diversity and Relationships of Lemurs. *International Journal of Primatology* **21(6)**: 1021-1049.
- Martin, R.D.** (2003): Combining the primate record. *Nature* **422**: 388-391.
- Masters, J. C., Rayner, R.J., Ludewick, H., Zimmermann, E., Molez-Verriere, N., Vincent, F. & Nash, L.T.** (1994): Phylogenetic Relationships Among the Galaginae as Indicated by Erythrocytic Allozymes. *Primates* **35(2)**: 177-190.
- McCall, R.A.** (1997): Implications of recent geological investigations of the Mozambique Channel for the mammalian colonization of Madagascar. *Proceedings of the Royal Society London B* **264**: 663-665.
- McCrossin, M.L.** (1992): New Species of Bushbaby From the Middle Miocene of Maboko Island, Kenya. *American Journal of Physical Anthropology* **89**: 215-233.
- Métivier, F. & Gaudemer, Y.** (1999): Stability of output fluxes of large rivers in South and East Asia during the last 2 million years: implication on floodplain processes. *Basin Research* **11**: 293-303.

- Morales, J.C., Disotell, T.R. & Melnick, D.J.** (1999): Molecular Phylogenetic Studies of Nonhuman Primates. In: Dolhinow, P. & Fuentes, A. (eds.), *The Nonhuman Primates*. (Mayfield Publishing Company, London/Toronto): 18-28.
- Mourier, T., Hansen, A.J., Willerslev, E. & Arctander, P.** (2001): The Human Genome Project Reveals a Continuous Transfer of Large Mitochondrial Fragments to the Nucleus. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 1833-1837.
- Miyamoto, M.M.** (1999): Molecular systematics: Perfect SINEs of evolutionary history?. *Current Biology* **9**: R816-R819.
- Murata, S., Takasaki, N., Saitoh, M. & Okada, N.** (1996): Details of retropositional genome dynamics that provide a rationale for a generic division: the distinct branching of all the Pacific salmon and trout (*Oncorhynchus*) from the Atlantic salmon and trout (*Salmo*). *Genetics* **142**: 915-926.
- Murphy, W.J., Eizirik, E., Johnson, W.E., Zhang, Y.P., Ryder, O.A. & O'Brien, S.J.** (2001): Molecular phylogenetics and the origin of placental mammals. *Nature* **409**: 614-618.
- Nadler, T. & Roos, C.** (2002a): Systematic position, distribution and status of douc langurs (*Pygathrix*) in Vietnam. *Abstracts of the XIXth Congress of the International Primatological Society, Beijing, China*: 301.
- Nadler, T. & Roos, C.** (2002b): Systematic position, distribution and status of langurs within the genus *Trachypithecus* in Vietnam. *Abstracts of the XIXth Congress of the International Primatological Society, Beijing, China*: 302-303.
- Napier, J.R.** (1970): Paleoecology and catarrhine evolution. In: Napier, J.R. & Napier, P.H. (eds.), *Old World Monkeys: Evolution, Systematics, and Behavior*. (Academic Press, New York): 53-95.
- Napier, J.R. & Napier, P.H.** (1967): *A Handbook of Living Primates*. (Academic Press, London).
- Napier, J.R. & Napier, P.H.** (1985): *The Natural History of the Primates*. (Cambridge University Press, Cambridge).
- Nash, L.T., Bearder, S.K. & Olson, T.R.** (1989): Synopsis of *Galago* Species Characteristics. *International Journal of Primatology* **10(1)**: 57-80.
- Nikaido, M., Rooney, A.P. & Okada, N.** (1999): Phylogenetic relationships among cetartiodactyls based on insertions of short and long interspersed elements: Hippopotamuses are the closest extant relatives of whales. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**: 10261-10266.
- Nikaido, M., Matsuno, F., Hamilton, H., Brownell, R.L., Cao, Y., Ding, W., Zuoyan, Z., Shedlock, A.M., Fordyce, R.E., Hasegawa, M. & Okada, N.** (2001): Retroposon analysis of major cetacean lineages: The monophyly of toothed whales and the paraphyly of river dolphins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**: 7384-7389.
- Nowak, M.** (1999): *Walker's Primates of the World*. (John Hopkins Press, Baltimore).

- Oates, J.F., Davies, A.G. & Delson, E.** (1994): The diversity of living colobines. In: Davies, A.G. & Oates, J.F. (eds.), *Colobine Monkeys – Their Ecology, Behaviour and Evolution*. (Cambridge University Press, Cambridge): 45-73.
- Olson, T.R.** (1979): *Studies on aspects of the morphology and systematics of the genus Otolemur*. Ph.D. Dissertation, Universität London.
- Oxnard, C.E.** (1981): The uniqueness of *Daubentonia*. *American Journal of Physical Anthropology* **54**: 259.
- Page, S.L. & Goodman, M.** (2001): Catarrhine Phylogeny: Noncoding DNA Evidence for a Diphyletic Origin of the Mangabeys and for a Human-Chimpanzee Clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **18**: 14-25.
- Pastorini, J., Forstner, M.R.J. & Martin, R.D.** (2000): Relationships among Brown Lemurs (*Eulemur fulvus*) Based on Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **16(3)**: 418-429.
- Pastorini, J., Forstner, M.R.J. & Martin, R.D.** (2001a): Phylogenetic History of Sifakas (*Propithecus*: Lemuriformes) Derived from mtDNA Sequences. *American Journal of Primatology* **53**: 1-17.
- Pastorini, J., Martin, R.D., Ehresmann, P., Zimmermann, E. & Forstner, M.R.J.** (2001b): Molecular Phylogeny of the Lemur Family Cheirogaleidae (Primates) Based on Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19(1)**: 45-56.
- Pastorini, J., Forstner, M.R.J. & Martin, R.D.** (2002): Phylogenetic relationships among Lemuridae (Primates): evidence from mtDNA. *Journal of Human Evolution* **43**: 463-478.
- Pastorini, J., Thalmann, U. & Martin, R.D.** (2003): A molecular approach to comparative phylogeography of extant Malagasy lemurs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **100 (10)**: 5879-5884.
- Patriat, P. & Segoufin, J.** (1988): Reconstruction of the Central Indian Ocean. *Tectonophysics* **155**: 211-234.
- Philips, E.M. & Walker, A.** (2002): Fossil lorisooids. In: Hartwig, W.C. (ed.), *The Primate Fossil Record*. (Cambridge University Press, New York): 83-95.
- Pocock, R.I.** (1935): The monkeys of the genera *Pithecus* (or *Presbytis*) and *Pygathrix* found to the East of the Bay of Bengal. *Proceedings of the Zoological Society London* **1934**: 895-961.
- Porter, C.A., Sampaio, I., Schneider, H., Schneider, M.P.C., Czelusniak, J. & Goodman, M.** (1995): Evidence on primate phylogeny from ϵ -globin gene sequences and flanking regions. *Journal of Molecular Evolution* **40**: 30-55.
- Porter, C.A., Page, S.L., Czelusniak, J., Schneider, H., Schneider, M.P.C., Sampaio, I. & Goodman, M.** (1997): Phylogeny and Evolution of Selected Primates as Determined by Sequences of the ϵ -Globin Locus and 5' Flanking Regions. *International Journal of Primatology* **18(2)**: 261-295.

- Posada, D. & Crandall, K.A.** (1998): Modeltest: testing the model of DNA substitutions. *Bioinformatics* **14**(9): 817-818.
- Prouty, L.A., Buchanan, P.D., Pollitzer, W.S. & Mootnick, A.R.** (1983): *Bunopithecus*: A genus-level taxon for the hoolock gibbon (*Hylobates hoolock*). *American Journal of Primatology* **5**: 83-87.
- Rabinowitz, P.D., Coffin, M.F. & Falvey, D.** (1983): The separation of Madagascar and Africa. *Science* **220**: 67-69.
- Radespiel, U., Cepok, S., Zietemann, V. & Zimmermann, E.** (1998): Sex-specific usage patterns of sleeping sites in grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*) in Northwestern Madagascar. *American Journal of Primatology* **46**: 77-84.
- Rasmussen, D.T. & Nekaris, K.A.I.** (1998): Evolutionary history of lorisiform primates. *Folia Primatologica* **69**: 250-285.
- Rasoloarison, R.M., Goodman, S.M. & Ganzhorn, J.U.** (2000): Taxonomic revision of mouse lemurs (*Microcebus*) in the western portions of Madagascar. *International Journal of Primatology* **21**: 963-1019.
- Reichenbach, H.G.L.** (1862): *Die vollständige Naturgeschichte des In- und Auslandes*. (Central-Atlas, Dresden).
- Robinson, M., Gouy, M., Gautier, C. & Mouchiroud, D.** (1998): Sensitivity of the relative-rate test to taxonomic sampling. *Molecular Biology and Evolution* **15**(9): 1091-1098.
- Roos, C.** (2000): 1.2. Phylogeny and genetics. In: Nadler, T. & Ha Thang Long (eds.), *The Cat Ba langur: Past, Present and Future. The definitive Report on Trachypithecus poliocephalus, the World's Rarest Primate*. (Forest Inventory and Planning Institute, Hanoi): 22-23.
- Roos, C.** (2003, im Druck): 2.3. Molecular phylogeny and systematics of Vietnamese leaf monkeys. In: Nadler, T., Nguyen Xuan Dang, Lormée, N. & Momberg, F. (eds.), *Vietnam Primate Conservation Status Review 2003, Part 2: Leaf Monkeys*.
- Roos, C. & Geissmann, T.** (2001): Molecular Phylogeny of the Major Hylobatid Divisions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**(3): 486-494.
- Roos, C. & Nadler, T.** (2001): Molecular evolution of the Douc Langurs. *Zoologischer Garten (N.F.)* **71**: 1-6.
- Roos, C. & Ostner, J.** (in Präp.): Paraphyletic origin of red-fronted lemurs (*Eulemur fulvus rufus*), and the re-introduction of the synonym *Eulemur fulvus rufifrons* (Bennett, 1833).
- Roos, C., Nadler, T., Zhang, Y.P. & Zischler, H.** (2001): Molecular evolution and distribution of the superspecies *Trachypithecus [francoisi]*. *Folia Primatologica* **72**: 181-182.
- Roos, C., Ziegler, T., Hodges, J.K., Zischler, H. & Abegg, C.** (im Druck, 2003): Molecular phylogeny of Mentawai macaques: taxonomic and biogeographic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*.

- Roos, C., Pastorini, J., Zischler, H. & Schülke, O.** (in Präp.): Taxonomic revision of the family Cheirogaleidae and definition of the new family Phaneridae.
- Rosenblum, L.L., Supriatna, J., Hasan, M.N. & Melnick, D.J.** (1997): High Mitochondrial DNA Diversity with Little Structure Within and Among Leaf Monkey Populations (*Trachypithecus cristatus* and *Trachypithecus auratus*). *International Journal of Primatology* **18**: 1005-1028.
- Rowe, N.** (1996): *The Pictorial Guide to the Living Primates*. (Pogonias Press, New York).
- Rumpler, Y.** (2000): What Cytogenetic Studies May Tell Us about Species Diversity and Speciation of Lemurs. *International Journal of Primatology* **21(5)**: 865-881.
- Rumpler, Y. & Albignac, R.** (1973): Cytogenetic study of the endemic Malagasy lemur: *Hapalemur*, I. Geoffroy, 1851. *Journal of Human Evolution* **2**: 267-270.
- Rumpler, Y., Warter, S., Petter, J.J., Albignac, R. & Dutrillaux, B.** (1988): Chromosomal evolution of Malagasy lemurs. *Folia Primatologica* **50**: 124-129.
- Rumpler, Y., Crovella, S. & Montagnon, D.** (1994): Systematic Relationships among Cheirogaleidae (Primates, Strepsirhini) Determined from Analysis of Highly Repeated DNA. *Folia Primatologica* **63**: 149-155.
- Saitou, N. & Nei, M.** (1987): The neighbor-joining method: A new method of reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).
- Schmid, J. & Kappeler, P.M.** (1994): Sympatric mouse lemurs (*Microcebus* spp.) In Western Madagascar. *Folia Primatologica* **63**: 162-170.
- Schmitz, J., Ohme, M. & Zischler, H.** (2001): SINE Insertions in Cladistic Analyses and the Phylogenetic Affiliations of *Tarsius bancanus* to Other Primates. *Genetics* **157**: 777-784.
- Schmitz, J., Ohme, M., Suryobroto, B. & Zischler, H.** (2002a): The Colugo (*Cynocephalus variegatus*, Dermoptera): The Primates' Gliding Sister?. *Molecular Biology and Evolution* **19(12)**: 2308-2312.
- Schmitz, J., Ohme, M. & Zischler, H.** (2002b): The Complete Mitochondrial Sequence of *Tarsius bancanus*: Evidence for an Extensive Nucleotide Compositional Plasticity of Primate Mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* **19(4)**: 544-553.
- Schneider, H., Schneider, M.P.C., Sampaio, I., Harada, M.L., Stanhope, M., Czelusniak, J. & Goodman, M.** (1993): Molecular phylogeny of the New World monkeys (Platyrrhini, Primates). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2**: 225-242.
- Schneider, H., Sampaio, I., Harada, M.L., Barroso, C.M.L., Schneider, M.P.C., Czelusniak, J. & Goodman, M.** (1996): Molecular phylogeny of the New World monkeys (Platyrrhini, Primates) based on two unlinked nuclear genes: IRBP intron 1 and epsilon-globin sequences. *American Journal of Physical Anthropology* **100**: 153-179.

- Schultz, A.H.** (1933): Observations on the growth, classification and evolutionary specialization of gibbons and siamangs. *Human Biology* **5**: 212-255, 385-428.
- Schwartz, J.H.** (1986): Primate systematics and a classification of the order. In: Swindler, D. & Erwin, J. (eds.), *Comparative primate biology, vol. 1, systematics, evolution and anatomy*. (Alan R. Wilson, New York): 1-41.
- Schwartz, J.H.** (1992): Phylogenetic relationships of African and Asian lorises. In: Matano, S., Tuttle, R.H., Ishida, H. & Goodman, M. (eds.), *Topics in primatology, vol. 3, evolutionary biology, reproductive endocrinology, and virology*. (University Tokyo Press, Tokyo): 65-81.
- Schwartz, J.H.** (1996): *Pseudopotto martini*: A new genus and species of extant lorisiform primate. *Anthropological Papers of the American Museum of Natural History New York* **78**:1-14.
- Schwartz, J.H., Tattersall, I. & Eldredge, N.** (1978): Phylogeny and classification of the primates revisited. *Yearbook of Physical Anthropology* **21**: 95-133.
- Seiffert, E.R., Simons, E.L. & Attia, Y.** (2003): Fossil evidence for an ancient divergence of lorises and galagos. *Nature* **422**: 421-424.
- Shafer, D.A.** (1986): Evolutionary cytogenetics of the siabon (gibbon-siamang) hybrid apes. In: Taub, D.M. & King, F.A. (eds.), *Current Perspectives in Primate Biology*. (Reinhold, New York): 226-239.
- Shimamura, M., Yasue, H., Ohshima, K., Abe, H., Kato, H., Kishiro, T., Goto, M., Munechika, I. & Okada, N.** (1997): Molecular evidence from retroposons that whales form a clade within even-toed ungulates. *Nature* **388**: 666-670.
- Shoshani, J., Groves, C.P., Simons, E.L. & Gunnell, G.F.** (1996): Primate phylogeny: Morphological vs molecular results. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **5**: 102-154.
- Simonetta, A.** (1957): Catalogo e sinonimia annotata degli ominoidi fossili ed attuali (1758-1955). *Atti Society Toscana Sciences National Pisa Series B* **64**: 53-113.
- Simons, E.L.** (1988): A new species of *Propithecus* (Primates) from Northeast Madagascar. *Folia Primatologica* **50**: 143-151.
- Simpson, G.G.** (1967): The Tertiary lorisiform primates of Africa. *Symposium of the Zoological Society London* **45**: 165-193.
- Singer, S.S., Schmitz, J., Schwiegk, C. & Zischler, H.** (2003): Molecular cladistic markers in New World monkey phylogeny (Platyrrhini, Primates). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**: 490-501.
- Smit, A.F.A.** (1996): *Structure and Evolution of Mammalian Interspersed Repeats*. Ph.D. Dissertation, South California Universität.
- Stewart, C.B. & Disotell, T.R.** (1998): Primate evolution – in and out of Africa. *Current Biology* **8**: R582-R588.

- Storey, M., Mahoney, J., Saunders, A., Duncan, R., Kelley, S. & Coffin, M.** (1995): Timing of hot spot-related volcanism and the breakup of Madagascar and India. *Science* **267**: 852-855.
- Strimmer, K. & von Haeseler, A.** (1996): Quartet puzzling: A maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Molecular Biology and Evolution* **13**: 964-969.
- Swofford, D.L.** (1999): PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), Version 4. (Sinauer Associates, Sunderland).
- Szalay, F.S. & Delson, E.** (1979): *Evolutionary History of the Primates*. (Academic Press, New York).
- Tamura, K. & Nei, M.** (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Journal of Molecular Evolution* **10**: 512-526.
- Tarrio, R., Rodriguez-Trelles, F. & Ayala, F.J.** (2001): Shared nucleotide composition biases among species and their impact on phylogenetic reconstructions of the Drosophilidae. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 1464-1473.
- Tatout, C., Lavie, L. & Deragon, J.M.** (1998): Similar Target Site Selection Occurs in Integration of Plant and Mammalian Retroposons. *Journal of Molecular Evolution* **47**: 463-470.
- Tattersall, I.** (1982): *The Primates of Madagascar*. (Columbia University Press, New York).
- Tavaré, S., Marshall, C.R., Will, O., Soligo, C. & Martin, R.D.** (2002): Using the fossil record to estimate the age of the last common ancestor of extant primates. *Nature* **416**: 726-729.
- Thalmann, U. & Geissmann, T.** (2000): Distribution and variation in the western woolly lemur (*Avahi occidentalis*) with a description of a new species (*A. unicolor*). *International Journal of Primatology* **21**: 915-941.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G.** (1997): The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research* **25**: 4876-4882.
- Van Gulik, R.H.** (1967): *The Gibbon in China: an Essay in Chinese Animal Lore*. (Brill, Leiden).
- Von Dornum, M. & Ruvolo, M.** (1999): Phylogenetic relationships of the New World monkeys (Primates, Platyrrhini) based on nuclear G6PD DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **12**: 459-476.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A. & Higuchi, R.** (1991): Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **10**: 506-513.

- Wang, W., Forstner, M.R.J., Zhang, Y.P., Liu, Z.M., Wei, Y., Huang, H.Q., Hu, H.G., Xie, Y.X., Wu, D.H. & Melnick, D.J. (1997): Phylogeny of Chinese Leaf Monkeys Using Mitochondrial ND3-ND4 Gene Sequences. *International Journal of Primatology* **18**: 305-320.
- Warren, R.D. & Crompton, R.H. (1996): Lazy leapers: Energetics, phylogenetic inertia and the locomotor differentiation of the Malagasy primates. In: Lourenco, W. (ed.), *Biogéographie de Madagascar*. (Orstom, Paris): 259-266.
- Warter, S., Randrianasolo, G., Dutrillaux, B. & Rumpler, Y. (1987): Cytogenetic study of a new subspecies of *Haplemur griseus*. *Folia Primatologica* **48**: 50-55.
- Whybrow, P.J. (1984): Geological and faunal evidence for mammal „migrations“ between Asia and Africa during the Miocene. *Cour Forschung am Institut Senckenberg* **69**: 189-198.
- Whybrow, P.J. (1992): Land movements and species dispersal. In: Jones, S., Martin, R.E. & Pilbeam, D. (eds.), *The Cambridge Encyclopedia of Human Evolution*. (Cambridge University Press, Cambridge): 169-173.
- Wienberg, J. & Stanyon, R. (1987): Fluorescent heterochromatin staining in primate chromosomes. *Human Evolution* **2**: 445-457.
- Wyner, Y., DeSalle, R. & Absher, R. (2000): Phylogeny and Character Behavior in the Family Lemuridae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **15**(1): 124-134.
- Yoder, A.D. (1989): A phylogenetic systematic study of the true lorises. *American Journal of Physical Anthropology* **78**: 327.
- Yoder, A.D. (1994): Relative position of the Cheirogaleidae in strepsirrhine phylogeny: A comparison of morphological and molecular methods and results. *American Journal of Physical Anthropology* **94**: 25-46.
- Yoder, A.D. (1997): Back to the Future: A Synthesis of Strepsirrhine Systematics. *Evolutionary Anthropology* **6**: 11-22.
- Yoder, A.D. & Irwin, J.A. (1999): Phylogeny of the Lemuridae: Effects of Character and Taxon Sampling on Resolution of Species Relationships within *Eulemur*. *Cladistics* **15**: 351-361.
- Yoder, A.D., Vilgalys, R. & Ruvolo, M. (1996a): Molecular Evolutionary Dynamics of Cytochrome b in Strepsirrhine Primates: The Phylogenetic Significance of Third-Position Transversions. *Molecular Biology and Evolution* **13**(10): 1339-1350.
- Yoder, A.D., Cartmill, M., Ruvolo, M., Smith, K. & Vilgalys, R. (1996b): Ancient single origin for Malagasy primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**: 5122-5126.
- Yoder, A.D., Rasoloarison, R.M., Goodman, S.M., Irwin, J.A., Atsalis, S., Ravosa, M.J. & Ganzhorn, J.U. (2000): Remarkable species diversity in Malagasy mouse lemurs (primates, *Microcebus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 11325-11330.

- Yoder, A.D., Irwin, J.A. & Payseur, B.A.** (2001): Failure of the ILD to Determine Data Combinability for Slow Loris Phylogeny. *Systematic Biology* **50(3)**: 408-424.
- Yoder, A.D., Burns, M.M., Zehr, S., Delefosse, T., Veron, G., Goodman, S.M. & Flynn, J.J.** (2003): Single origin of Malagasy Carnivora from an African ancestor. *Nature* **421**: 734-737.
- Zehr, S.** (1999): *A Nuclear and Mitochondrial Phylogeny of the Lesser Apes (Primates, Genus Hylobates)*. Ph.D. Dissertation, Harvard Universität.
- Zhang, Y.P.** (1997): Mitochondrial DNA sequence evolution and phylogenetic relationships of gibbons. *Acta Genetica Sinica* **24**: 231-237 (Chinesisch).
- Zhang, Y.P. & Ryder, O.A.** (1998): Mitochondrial Cytochrome b Gene Sequences of Old World Monkeys: With Special Reference on Evolution of Asian Colobines. *Primates* **39**: 39-49.
- Zhang, Y., Quan, G., Zhao, T. & Southwick, C.H.** (1992): Distribution of primates (except *Macaca*) in China. *Acta Theriologica Sinica* **12**: 81-95.
- Zietkiewicz, E., Richer, C., Sinnett, D. & Labudae, D.** (1998): Monophyletic Origin of Alu Elements in Primates. *Journal of Molecular Evolution* **47**: 172-182.
- Zimmermann, E.** (1990): Differentiation of vocalizations in bushbabies (Galaginae, Prosimae, Primates) and the significance for assessing phylogenetic relationships. *Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung* **28**: 217-239.
- Zimmermann, E., Cepok, S., Rakotoarison, N., Zietemann, V. & Radespiel, U.** (1998): Sympatric mouse lemurs in north-west Madagascar: A new rufous mouse lemur species (*Microcebus ravelobensis*). *Folia Primatologica* **69**: 106-114.
- Zischler, H., Geisert, H., von Haeseler, A. & Pääbo, S.** (1995): A nuclear „fossil“ of the mitochondrial D-loop and the origin of modern humans. *Nature* **378**: 489-492.
- Zischler, H., Roos, C. & Hunsmann, G.** (2003, im Druck): A brief introduction to primate evolution. In: Sverdlov, E.D. (ed.), *Retroviruses & primate genome evolution*.

9. Danksagung

Ich möchte mich herzlichst bei Hans Zischler für die sehr gute Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit und seiner ständigen Bereitschaft zu Diskussionen bedanken.

Ganz besonderer Dank geht auch an die übrigen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Primatengenetik am DPZ Claudia Schwiegk, Martina Ohme, Jürgen Schmitz, Holger Herlyn und Andreas Hapke für die Hilfen und Freuden im alltäglichen Labordasein.

Da die Arbeit ohne die Vielzahl an Proben niemals dieses Ausmaß erreicht hätte, möchte ich mich auch bei denen bedanken, die mir Proben vertrauensvoll zur Verfügung stellten oder mir bei deren Beschaffung unter die Arme gegriffen haben. Viele dieser Personen waren auch jederzeit zu heißen Diskussionen bereit und lieferten viele Hintergrundinformationen: Dietmar Zinner, Peter Kappeler, Oliver Schülke, Julia Ostner, Manfred Eberle, Roland Hilgartner, Eckhard Heymann und Christophe Knogge (VÖ DPZ), Andreas Hapke (Genetik DPZ), Keith Hodges, Michael Heistermann, Thomas Ziegler und Christophe Abegg (Repro DPZ), Kerstin Mätz-Rensing und Wolfgang Henkel (Patho DPZ), Jörg Ganzhorn (Universität Hamburg), Hans-Jürg Kuhn (Universität Göttingen), Tilo Nadler und Ulrike Streicher (EPRC Vietnam), Lucy Tallents und Barney Long (FFI Indochina), Gareth Goldthrope und Liz Tydeman (Frontier-Vietnam), Vu Ngoc Thanh (Universität Hanoi), Thomas Geissmann und Elke Zimmermann (TiHo Hannover), Linda Vigilant und Christophe Boesch (EVA Leipzig), Yves Rumpler, Luc Fausser und Daniel Montagon (Universität Strasbourg), Werner Schempp (Universität Freiburg), Herbert Tichy (Universität Tübingen), Anna Nekaris (Universität Oxford Brookes), Liz Pimley (Universität Cambridge), Helga Schulze (Universität Bochum), Christian Welker (Universität Kassel), Jenny Pastorini und Wolfgang Scheffrahn (Universität Zürich), Colin Groves (Universität Canberra), Anne Yoder (Universität Yale), Andrew Kitchener (Museum Edinburgh), Manfred Ade (Museum Berlin), Judith Masters (Museum Pietermaritzburg), Karl Amman, Holger Meinig, Peter Zwanzger, Roland Wirth sowie den Mitarbeitern der Duke Universität und den Zoos in Leipzig, München, Münster, Wuppertal, Nürnberg, Duisburg, Dresden, Stuttgart, Köln, Berlin, Twycross, Beakesbourne, Besançon, Paris, Perth und Singapur.

Finanziell unterstützt wurde die Arbeit durch das Graduiertenkolleg „Perspektiven der Primatologie“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG).

10. Anhang

Tabelle 5: Liste der verwendeten Proben

ART	HERKUNFT	SPONSOR
LORIFORMES		
<i>Loris tardigradus grandis</i>	Sri Lanka	H. Schulze
<i>Loris tardigradus grandis</i>	Sri Lanka	H. Schulze
<i>Loris tardigradus</i>	Sri Lanka	H. Schulze
<i>Loris tardigradus</i>	Sri Lanka	H. Schulze
<i>Loris tardigradus</i>	Sri Lanka	H. Schulze
<i>Loris tardigradus</i>	Sri Lanka	H. Schulze
<i>Loris tardigradus tardigradus</i>	Matara, Sri Lanka	A. Nekaris
<i>Loris tardigradus tardigradus</i>	Matara, Sri Lanka	A. Nekaris
<i>Loris tardigradus tardigradus</i>	Matara, Sri Lanka	A. Nekaris
<i>Loris tardigradus tardigradus</i>	Matara, Sri Lanka	A. Nekaris
<i>Loris tardigradus nycticeboides</i>		Anthropol. Institut Zürich
<i>Loris lydekkerianus lydekkerianus</i>	Ayyalur, Tamil Nadu, S-Indien	A. Nekaris
<i>Loris lydekkerianus lydekkerianus</i>	Ayyalur, Tamil Nadu, S-Indien	A. Nekaris
<i>Loris lydekkerianus lydekkerianus</i>	Ayyalur, Tamil Nadu, S-Indien	A. Nekaris
<i>Loris lydekkerianus nordicus</i>		H. Schulze
<i>Loris lydekkerianus nordicus</i>		Zoo Berlin
<i>Nycticebus pygmaeus</i>	Vietnam	U. Streicher
<i>Nycticebus pygmaeus</i>	Vietnam	U. Streicher
<i>Nycticebus pygmaeus</i>	Vietnam	U. Streicher
<i>Nycticebus pygmaeus</i>	Vietnam	Vu Ngoc Thanh
<i>Nycticebus pygmaeus</i>	Vietnam	Vu Ngoc Thanh
<i>Nycticebus pygmaeus</i>	Vietnam	Vu Ngoc Thanh
<i>Nycticebus pygmaeus</i>	Vietnam	Vu Ngoc Thanh
<i>Nycticebus pygmaeus</i>	Vietnam	H. Schulze
<i>Nycticebus intermedius</i>	Hoa Binh, Vietnam, Typus-Exemplar	Vu Ngoc Thanh
<i>Nycticebus bengalensis</i>	Vietnam	U. Streicher
<i>Nycticebus bengalensis</i>	Vietnam	U. Streicher
<i>Nycticebus bengalensis</i>	Vietnam	U. Streicher
<i>Nycticebus bengalensis</i>	Vietnam	U. Streicher
<i>Nycticebus bengalensis</i>		Zoo Besançon
<i>Nycticebus bengalensis</i>		Zoo Besançon
<i>Nycticebus bengalensis</i>		C. Welker
<i>Nycticebus bengalensis</i>		H. Schulze
<i>Nycticebus bengalensis</i>		Zoo Singapur
<i>Nycticebus bengalensis</i>		Zoo Singapur
<i>Nycticebus bengalensis</i>		Zoo Berlin
<i>Nycticebus coucang</i>	Sumatra	H. Meinig
<i>Nycticebus coucang</i>	Malaiische Halbinsel	Zoo Singapur
<i>Nycticebus menagensis</i>	Borneo	Museum Berlin
<i>Nycticebus javanicus</i>	Java	H. Schulze
<i>Nycticebus javanicus</i>	Java	H. Schulze
<i>Nycticebus javanicus</i>	Java	H. Schulze
<i>Nycticebus javanicus</i>	Java	H. Schulze
<i>Perodicticus potto potto</i>		H. Schulze
<i>Perodicticus potto potto</i>		H. Schulze
<i>Perodicticus potto potto</i>		C. Welker
<i>Perodicticus potto edwardsi</i>	Mt Kupe, SW-Kamerun	L. Pimley

ART	HERKUNFT	SPONSOR
<i>Perodicticus potto ibeanus</i>	Bili, NO-Zaire	K. Amman
<i>Perodicticus potto ibeanus</i>	Bili, NO-Zaire	K. Amman
<i>Arctocebus calabarensis</i>	Umuahai, Nigeria	Museum Edinburgh
<i>Arctocebus calabarensis</i>		Museum Edinburgh
<i>Arctocebus calabarensis</i>		Museum Edinburgh
<i>Arctocebus calabarensis</i>	Basho, Kamerun	Museum Berlin
<i>Galago senegalensis senegalensis</i>	Togo	Museum Edinburgh
<i>Galago senegalensis senegalensis</i>	Togo	Museum Edinburgh
<i>Galago senegalensis</i>		H. Schulze
<i>Galago senegalensis</i>		Anthropol. Institut Zürich
<i>Galago moholi</i>		C. Welker
<i>Galago matschie</i>		NCBI: AF 271409
<i>Euoticus elegantulus</i>		Museum Berlin
<i>Galago granti</i>	Tanzania	Museum Berlin
<i>Galago zanzibaricus</i>		J. Masters
<i>Otolemur crassicaudatus</i>		C. Welker
<i>Otolemur garnetti</i>		C. Welker
<i>Otolemur garnetti</i>		Anthropol. Institut Zürich
<i>Otolemur garnetti</i>		Anthropol. Institut Zürich
<i>Otolemur garnetti</i>		Anthropol. Institut Zürich
<i>Galago gabonensis</i>	Sagmelima, Kamerun	Museum Berlin
<i>Galago cameronensis</i>	Mt Kupe, SW-Kamerun	L. Pimley
<i>Galagoides demidoff</i>		W. Schempp
<i>Galagoides demidoff</i>		H. Tichy
<i>Galagoides demidoff murinus</i>	Mt Kupe, SW-Kamerun	L. Pimley
<i>Galagoides thomasi</i>	Bili, NO-Zaire	K. Amman
CHIROMYIFORMES		
<i>Daubentonia madagascariensis</i>		Duke Universität
<i>Daubentonia madagascariensis</i>		Anthropol. Institut Zürich
LEMURIFORMES		
<i>Phaner furcifer pallescens</i>	Kirindy, W-Madagaskar	O. Schülke
<i>Phaner furcifer pallescens</i>	Kirindy, W-Madagaskar	O. Schülke
<i>Phaner furcifer pallescens</i>	Kirindy, W-Madagaskar	O. Schülke
<i>Cheirogaleus major</i>	Mantaso, O-Madagaskar	J. Pastorini
<i>Cheirogaleus major</i>	Andasibe, O-Madagaskar	J. Pastorini
<i>Cheirogaleus medius</i>		Zoo Köln
<i>Cheirogaleus medius</i>		Zoo Köln
<i>Cheirogaleus medius</i>		Y. Rumpfer
<i>Cheirogaleus crosselyi</i>	Fort Dauphin, SO-Madagaskar	A. Hapke
<i>Cheirogaleus</i> sp. de.novo.	Ambanja, NW-Madagaskar	P. Kappeler
<i>Allocebus trichotis</i>		Zoo Paris
<i>Mirza coquereli</i>	Kirindy, W-Madagaskar	P. Kappeler
<i>Mirza coquereli</i>	Kirindy, W-Madagaskar	P. Kappeler
<i>Mirza coquereli</i>	Kirindy, W-Madagaskar	P. Kappeler
<i>Mirza coquereli</i>	Kirindy, W-Madagaskar	P. Kappeler
<i>Mirza</i> sp. de.novo.	Ambanja, NW-Madagaskar	P. Kappeler

ART	HERKUNFT	SPONSOR
<i>Mirza</i> sp. de.novo.	Ambanja, NW-Madagaskar	P. Kappeler
<i>Mirza</i> sp. de.novo.	Ambanja, NW-Madagaskar	P. Kappeler
<i>Mirza</i> sp. de.novo.	Ambanja, NW-Madagaskar	P. Kappeler
<i>Microcebus murinus</i>		C. Welker
<i>Microcebus murinus</i>	Berenty, S-Madagaskar	NCBI: AY 167071
<i>Microcebus murinus</i>	Mandena, SO-Madagaskar	NCBI: AF 285565
<i>Microcebus murinus</i>	Mandena, SO-Madagaskar	NCBI: AF 285566
<i>Microcebus murinus</i>	Vohimena, SW-Madagaskar	NCBI: AF 285564
<i>Microcebus murinus</i>	Kirindy, W-Madagaskar	NCBI: AF 285561
<i>Microcebus murinus</i>	Kirindy, W-Madagaskar	NCBI: AF 285562
<i>Microcebus murinus</i>	Kirindy, W-Madagaskar	NCBI: AF 285563
<i>Microcebus murinus</i>	Andranomena, W-Madagaskar	NCBI: AF 285557
<i>Microcebus murinus</i>	Andranomena, W-Madagaskar	NCBI: AF 285558
<i>Microcebus murinus</i>	Andranomena, W-Madagaskar	NCBI: AF 285559
<i>Microcebus murinus</i>	Manamby, W-Madagaskar	NCBI: AF 285560
<i>Microcebus griseorufus</i>	Beza Mahafaly, SW-Madagaskar	NCBI: AF 285568
<i>Microcebus griseorufus</i>	Beza Mahafaly, SW-Madagaskar	NCBI: AF 285567
<i>Microcebus griseorufus</i>	Berenty, S-Madagaskar	NCBI: AY 167076
<i>Microcebus griseorufus</i>	Berenty, S-Madagaskar	NCBI: AY 167077
<i>Microcebus sambiranensis</i>	Manongarivo, NW-Madagaskar	NCBI: AF 285554
<i>Microcebus berthae</i>	Kirindy, W-Madagaskar	M. Eberle
<i>Microcebus berthae</i>	Kirindy, W-Madagaskar	NCBI: AF 285540
<i>Microcebus berthae</i>	Kirindy, W-Madagaskar	NCBI: AF 285543
<i>Microcebus rufus</i>	Andasibe, O-Madagaskar	J. Pastorini
<i>Microcebus rufus</i>	Andasibe, O-Madagaskar	J. Pastorini
<i>Microcebus rufus</i>	Tampolo, O-Madagaskar	NCBI: AF 285552
<i>Microcebus rufus</i>	Ranomafana, O-Madagaskar	NCBI: AF 285545
<i>Microcebus rufus</i>	Ranomafana, O-Madagaskar	NCBI: AF 285549
<i>Microcebus rufus</i>	Ranomafana, O-Madagaskar	NCBI: AF 285551
<i>Microcebus myoxinus</i>	Bemaraha, W-Madagaskar	NCBI: AF 285535
<i>Microcebus myoxinus</i>	Bemaraha, W-Madagaskar	NCBI: AF 285536
<i>Microcebus myoxinus</i>	Bemaraha, W-Madagaskar	NCBI: AF 285537
<i>Microcebus myoxinus</i>	Aboalimena, W-Madagaskar	NCBI: AF 285538
<i>Microcebus myoxinus</i>	Aboalimena, W-Madagaskar	NCBI: AF 285539
<i>Microcebus tavaratra</i>	Ankarana, N-Madagaskar	NCBI: AF 285533
<i>Microcebus tavaratra</i>	Ankarana, N-Madagaskar	NCBI: AF 285534
<i>Microcebus ravelobensis</i>	Ankarafantsika, NW-Madagaskar	NCBI: AF 285529
<i>Microcebus ravelobensis</i>	Ankarafantsika, NW-Madagaskar	NCBI: AF 285532
<i>Lepilemur ruficaudatus</i>	Kirindy, W-Madagaskar	D. Zinner
<i>Lepilemur ruficaudatus</i>		Y. Rumpler
<i>Lepilemur edwardsi</i>	Anjamena, NW-Madagaskar	J. Pastorni
<i>Lepilemur leucopus</i>		Y. Rumpler
<i>Lepilemur dorsalis</i>		Y. Rumpler
<i>Lepilemur septentrionalis</i>		Y. Rumpler
<i>Avahi laniger</i>	Fort Dauphin, SO-Madagaskar	J. Ganzhorn
<i>Avahi occidentalis</i>		Y. Rumpler
<i>Indri indri</i>		Museum Berlin
<i>Propithecus diadema diadema</i>		Y. Rumpler
<i>Propithecus diadema edwardsi</i>	Ranomafana, O-Madagaskar	J. Pastorini
<i>Propithecus tattersalli</i>		Y. Rumpler
<i>Propithecus verreauxi coquereli</i>	Ampijoroa, NW-Madagaskar	J. Pastorini
<i>Propithecus verreauxi coronatus</i>		Zoo Paris

ART	HERKUNFT	SPONSOR
<i>Propithecus verreauxi coronatus</i>		Y. Rumpler
<i>Propithecus verreauxi verreauxi</i>		Y. Rumpler
<i>Hapalemur aureus</i>		Y. Rumpler
<i>Hapalemur meridionalis</i>	Fort Dauphin, SO-Madagaskar	J. Ganzhorn
<i>Hapalemur griseus griseus</i>		Y. Rumpler
<i>Hapalemur griseus occidentalis</i>		Y. Rumpler
<i>Hapalemur simus</i>	Karianga, SO-Madagaskar	J. Pastorini
<i>Hapalemur simus</i>		Zoo Köln
<i>Hapalemur simus</i>		Zoo Köln
<i>Lemur catta</i>		Zoo Münster
<i>Eulemur mongoz</i>		Zoo Köln
<i>Eulemur rubriventer</i>		Zoo Köln
<i>Eulemur coronatus</i>		Zoo Köln
<i>Eulemur fulvus collaris</i>		NCBI: U 53576
<i>Eulemur fulvus albifrons</i>		NCBI: AF 081048
<i>Eulemur fulvus rufifrons</i>	Kirindy, W-Madagaskar	J. Ostner
<i>Eulemur fulvus rufifrons</i>	E-Madagaskar	J. Pastorini
<i>Eulemur fulvus rufifrons</i>		Zoo Köln
<i>Eulemur fulvus rufifrons</i>		Zoo Köln
<i>Eulemur fulvus rufus</i>	Anjamena, NO-Madagaskar	J. Pastorini
<i>Eulemur macaco macaco</i>		Zoo Köln
<i>Eulemur macaco macaco</i>		Zoo Köln
<i>Eulemur macaco flavifrons</i>		NCBI: AF 081050
<i>Varecia variegata rubra</i>		Zoo Köln
<i>Varecia variegata rubra</i>		Zoo Köln
<i>Varecia variegata subcincta</i>		Zoo Köln
<i>Varecia variegata subcincta</i>		Zoo Paris
<i>Varecia variegata subcincta</i>		Zoo Paris
<i>Varecia variegata subcincta</i>		Zoo Paris
<i>Varecia variegata variegata</i>		Zoo Berlin
<i>Varecia variegata variegata</i>		Zoo Köln
<i>Varecia variegata variegata</i>		Zoo Köln
<i>Varecia variegata variegata</i>		Zoo Köln
COLOBINAE		
<i>Colobus polykomos polykomos</i>		Zoo Duisburg
<i>Procolobus verus</i>	Thai National Park, Elfenbeinküste	L. Vigilant
<i>Ptilocolobus badius badius</i>	Thai National Park, Elfenbeinküste	L. Vigilant
<i>Semnopithecus entellus entellus</i>		Zoo Dresden
<i>Trachypithecus obscurus</i>		Zoo Wuppertal
<i>Presbytis fluviatilis</i>		Howletts Wild Animal Park
<i>Nasalis larvatus</i>		Wilhelma Stuttgart
<i>Pygathrix nana</i>		Zoo Köln
<i>Rhinopithecus avunculus</i>	Na Hang, N-Vietnam	T. Nadler
HYLOBATIDAE		
<i>Nomascus nasutus nasutus</i>	Kim Hy, NO-Vietnam	Frontier Vietnam
<i>Nomascus concolor concolor</i>	Che Tao, N-Vietnam	FFI Vietnam
<i>Nomascus leucogenys leucogenys</i>		Zoo Twycross
<i>Nomascus gabriellae</i>		Zoo Leipzig
<i>Bunopithecus hoolock</i>		Zoo Perth
<i>Symphalangus syndactylus</i>		Zoo München

ART	HERKUNFT	SPONSOR
<i>Hylobates lar</i>		Zoo Wuppertal
<i>Hylobates lar</i>		Zoo Besançon
<i>Hylobates klossii</i>	Siberut, Mentawai Inseln	C. Abegg
<i>Hylobates moloch</i>		T. Geissmann
<i>Hylobates pileatus</i>		C. Roos
<i>Hylobates agilis</i>		T. Geissmann
<i>Hylobates muelleri</i>		T. Geissmann
Weitere Arten		
<i>Callithrix jacchus</i>		DPZ
<i>Papio hamadryas</i>		DPZ
<i>Macaca mulatta</i>		DPZ
<i>Pan troglodytes</i>		Zoo München
<i>Homo sapiens</i>		
Zusätzliche mitochondriale Sequenzen		
<i>Homo sapiens</i>		NCBI: X 93334
<i>Pan paniscus</i>		NCBI: NC 001644
<i>Pan troglodytes</i>		NCBI: NC 001643
<i>Gorilla gorilla</i>		NCBI: NC 001645
<i>Pongo abelii</i>		NCBI: NC 002083
<i>Papio hamadryas</i>		NCBI: NC 001992
<i>Macaca sylvanus</i>		NCBI: NC 002764
<i>Tarsius bancanus</i>		NCBI: AF 378365

11. *Curriculum vitae*

Name: Christian Roos

Geboren: am 29.10.1972 in München

Schulische Ausbildung

1979-1983 Grundschule Unterhaching

1983-1993 Gymnasium Unterhaching

Zivildienst

1994-1995 Abteilung Med. Genetik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Universitäre Ausbildung

1995-2000 Biologie-Studium an der Technischen Universität München

1999 Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München

*„Phylogenie und Taxonomie der Schlankaffen (Colobinae):
Sequenzanalyse des mitochondrialen Cytochrom b-Gens“*

2000 Diplom an der Technischen Universität München

Tätigkeiten

1995-1999 Studentische Hilfskraft in der Abteilung Med. Genetik der LMU München

seit 1995 Leiter der „Gene Bank of Primates“

2000-2002 Promotionsstipendiat im Rahmen des DFG-geförderten Graduiertenkollegs

„Perspektiven der Primatologie“

seit 2003 Wissenschaftl. Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Primatengenetik am DPZ

seit 2003 Mitglied der „IUCN/SSC Primate Specialist Group, Section Asia“