

Universität Koblenz-Landau, Campus Landau
Institut für Umweltwissenschaften

**Molekularbiologische Analysen zur Verwandtschaftsstruktur und zum
Sozialsystem einer freilebenden Waschbärpopulation (*Procyon lotor* L.)
im Müritz-Nationalpark (Mecklenburg-Vorpommern)**



DIPLOMARBEIT

vorgelegt von

Susanne Gramlich

Erster Prüfer: Dr. Holger Schulz

Zweiter Prüfer: Prof. Dr. Klaus Schwenk

eingereicht im Januar 2011

Titelbilder von links nach rechts: Projekt Waschbär, Roman Vitt, Irina Muschik

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung.....	8
1. Einleitung.....	10
1.1 Projekt Waschbär.....	10
1.2 Verbreitung des Waschbären in Deutschland.....	10
1.3 Sozialverhalten	11
1.4 Untersuchungsgebiet	14
1.5 Molekularbiologische Analyse	15
1.6 Ziele der Arbeit.....	16
2. Material und Methoden.....	18
2.1 Probenahme	18
2.2 DNA-Extraktion	18
2.2.1 DNA-Extraktion aus Gewebe	18
2.2.2 DNA-Extraktion aus Speichel.....	19
2.2.3 DNA-Extraktion aus Haaren.....	19
2.3 PCR.....	19
2.4 Gelelektrophorese	22
2.5 Fragmentlängenanalyse	22
2.6 Auswertung.....	24
3. Ergebnisse	27
3.1 Genetische Diversität.....	27
3.2 Elternschaftsanalysen	29
3.3 Individueller Fortpflanzungserfolg und Mehrfachvaterschaften	32
3.4 Matrilinien	34
3.5 Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Koalitionen der Rüden	36
3.6 Fortpflanzungserfolg und Zugehörigkeit zu einer Koalition	38
3.7 Vergleich von DNA-Extrakten aus Haar- und Speichelproben.....	40
4. Diskussion.....	41
4.1 Genotypisierung.....	41
4.2 Genotypisierungserfolg mit DNA aus Haar- und Speichelproben im Vergleich	41
4.3 Auswertung mit den Programmen CERVUS und KINGROUP	42
4.4 Genetische Diversität.....	43

4.5 Elternschaftszuordnung	44
4.6 Individueller Fortpflanzungserfolg.....	46
4.7 Mehrfachvaterschaften	48
4.8 Matrilinien der Fähen und Wanderung der Rüden	49
4.9 Zusammenhang zwischen genetischer und geographischer Distanz bei Fähen	51
4.10 Verwandtschaft der Rüden innerhalb einer Koalition	51
5. Fazit und Ausblick	53
6. Literaturverzeichnis	54
7. Anhang.....	60
Eidesstattliche Erklärung.....	63
Danksagung.....	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Lage des Müritz Nationalparks.	15
Abbildung 2.1: Ausschnitt aus einem Elektropherogramm... ..	23
Abbildung 3.1: Boxplot des Vergleichs der r-Werte von Rüden und Fähen.....	35
Abbildung 3.2: Vergleich der AI_c -Werte von Rüden und Fähen.	35
Abbildung 3.3: Histogramm der AI_c -Werte von Rüden und Fähen.	36
Abbildung 3.4: Beziehung zwischen genetischer und geographischer Distanz bei adulten Fähen.....	36
Abbildung 3.5: Boxplot zum Vergleich der r-Werte aller Rüden sowie der unterschiedlichen Bündnistypen.....	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Primer.	21
Tabelle 2.2: Mastermix für die PCR.	21
Tabelle 2.3: PCR Programm.	22
Tabelle 2.4: Auflistung der für die Simulationen in CERVUS eingesetzten Parameter.	25
Tabelle 3.1: Allelzahl, beobachtete und erwartete Heterozygotie sowie Ergebnisse des Tests auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für die untersuchten Loci	27
Tabelle 3.2: Vergleich der genetischen Diversität von sechs verschiedenen Waschbärpopulationen ..	28
Tabelle 3.3: Auflistung der Jungtiere, denen eindeutig ein Elternpaar zugeordnet werden konnte.	29
Tabelle 3.4: Liste der Jungtiere, denen nur ein oder kein Elterntier zugeordnet werden konnte.	31
Tabelle 3.5: Übersicht über die Elterntiere der einzelnen Würfe	33
Tabelle 3.6: Übersicht über den Fortpflanzungserfolg der an einer Koalition beteiligten Rüden	38
Tabelle 3.7: Übersicht über den Fortpflanzungserfolg der einzelnen Rüden in den vier Untersuchungsjahren	39

Abkürzungsverzeichnis

AI _c	Assignment Index correction
bp	Basenpaare
LOD	likelihood-odds ratio
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
SLS	sample loading solution
TBE	TRIS-Borat-EDTA

Zusammenfassung

Das ursprüngliche Verbreitungsgebiet des Waschbären erstreckt sich von Nord- bis Mittelamerika, doch aufgrund von Aussetzungen und Ausbrüchen aus der Gefangenschaftshaltung ist er schon seit etwa 70 Jahren in Deutschland verbreitet. Die Lebensweise des Waschbären in Deutschland steht allerdings erst seit relativ kurzer Zeit im Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. Um grundlegende Erkenntnisse über Reproduktionsökologie, Populationsbiologie, Raum- und Sozialverhalten freilebender Waschbären zu gewinnen, wurde eine wildbiologische Studie, das „Projekt Waschbär“, im Müritz-Nationalpark in Mecklenburg-Vorpommern initiiert. Die Datenerhebung erfolgt zu einem großen Teil durch radiotelemetrische Beobachtung der Tiere. Da einige Fragestellungen nicht allein durch Beobachtungen geklärt werden können ist es sinnvoll, die Freilandarbeiten durch molekularbiologische Analysen zu ergänzen.

Die genetischen Daten sollten dazu verwendet werden die genetische Diversität der Population festzustellen, den Jungtieren Eltern zuzuordnen und Aussagen zum Verwandtschaftsgrad adulter Tiere zu treffen. Von besonderem Interesse waren dabei der Nachweis von Mehrfachvaterschaften innerhalb eines Wurfes sowie die Beantwortung der Frage, welche Rolle der Verwandtschaftsgrad zwischen Rüden bei der Bildung einer Koalition spielt. Hierzu wurden die im Untersuchungsgebiet lebenden Waschbären über einen Zeitraum von vier Jahren (2006 - 2010) beprobt, wodurch der größte Teil (ca. 90 %) der im Müritz-Nationalpark lebenden Waschbärpopulation erfasst werden konnte. Für die Genotypisierung wurden Gewebe-, Haar- und Speichelproben verwendet. Insgesamt wurden 141 Waschbären an 10 Mikrosatellitenloci genotypisiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Waschbärpopulation im Müritz-Nationalpark im Vergleich mit verschiedenen Populationen aus den USA und Kanada eine geringere genetische Diversität aufweist, welche auf einen Gründereffekt zurückzuführen ist. In der Elternschaftsanalyse konnten 95 % der Jungtiere ein Muttertier und 78 % ein Vattertier zugeordnet werden. In einigen Fällen war aufgrund der geringen genetischen Diversität eine sichere Elternzuordnung allein mit den genetischen Daten nicht möglich. Hier mussten die Kenntnisse aus den Freilandbeobachtungen einbezogen werden. Aus den Ergebnissen der Elternschaftsanalyse konnten Rückschlüsse auf den individuellen Paarungserfolg der einzelnen Tiere gezogen werden. Zwischen den Rüden zeigten sich Unterschiede im individuellen Fortpflanzungserfolg als deren Ursache die Zugehörigkeit zu einer Koalition vermutet wurde. Es ergab sich allerdings kein signifikanter Unterschied im Fortpflanzungserfolg zwischen Koalitionsrüden und Rüden, die nicht in einer Koalition lebten. Ein weiterer Aspekt, über den die Elternschaftsanalyse

Aufschluss geben sollte, war das Auftreten von Mehrfachvaterschaften innerhalb eines Wurfs. Bei etwa der Hälfte der Würfe mit mehreren Wurfgeschwistern ergaben sich Hinweise auf eine Mehrfachvaterschaft. Zudem besaßen innerhalb eines Jahres die Jungtiere verschiedener Fähen denselben Vater. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich sowohl Rüden als auch Fähen während der Ranz mit mehreren Partnern paaren. Die Population im Müritz-Nationalpark besitzt folglich ein promiskuitives Paarungssystem.

Um weitere Aussagen über das Sozialsystem der Waschbären treffen zu können, wurde der Verwandtschaftsgrad von Fähen und Rüden betrachtet. Der Verwandtschaftsgrad unter adulten Fähen war signifikant höher ($p < 0,001$) als der Verwandtschaftsgrad unter adulten Rüden. Hierdurch wurden das philopatrische Verhalten der Fähen sowie das Abwanderungsverhalten der Rüden anhand der genetischen Daten bestätigt. Es ergab sich kein Zusammenhang zwischen genetischer und geographischer Distanz bei den Fähen. Vermutlich wird ein solcher Zusammenhang durch das promiskuitive Paarungsverhalten und die geringe genetische Diversität verwischt. Um eine Aussage darüber zu treffen, welche Rolle die Verwandtschaft bei der Bildung einer Koalition unter Rüden spielt, wurden die Verwandtschaftswerte verschiedener Bündnistypen verglichen. Die meisten an einer Koalition beteiligten Rüden waren nicht nah miteinander verwandt, jedoch gab es auch Ausnahmen. Generell schien nahe Verwandtschaft aber nicht der Grund für die Bildung einer Koalition zu sein. Obwohl die zehn verwendeten Mikrosatellitenloci nicht in allen Fällen für eine sichere Elternzuordnung ausreichend waren, konnten mit Hilfe der molekularbiologischen Analyse dennoch wichtige Fragen zum Sozialsystem der Waschbären geklärt werden, deren Beantwortung allein durch Beobachtungen im Freiland nicht möglich war.

1. Einleitung

1.1 Projekt Waschbär

Aus den USA liegen zahlreiche Studien über Ökologie und Verhalten des Waschbären vor, doch in Europa und somit auch in Deutschland ist der Waschbär bislang wenig erforscht, obwohl er schon seit Jahrzehnten hier verbreitet ist (Michler et al. 2008). Die in den USA gewonnenen Erkenntnisse sind zudem nur bedingt auf die in Deutschland lebenden Populationen übertragbar, da gerade das Sozialsystem der Waschbären stark von den Umweltbedingungen abhängig ist (Ratnayeke et al. 2002) und mit dem Breitengrad variiert (Fritzell 1978). Deshalb wurde das „Projekt Waschbär“ (www.projekt-waschbaer.de) ins Leben gerufen und sammelt unter der Leitung von Dipl.-Biol. Berit Köhnemann und Dipl.-Biol. Frank-Uwe Michler seit 2006 Daten zu Nahrungs- und Reproduktionsökologie, Populationsbiologie, Raumnutzung und Sozialsystem wildlebender Waschbären im Müritz-Nationalpark in Mecklenburg-Vorpommern. Dies geschieht u. a. durch Fang, Untersuchung und Besenderung der Waschbären mit anschließender telemetrischer Langzeitüberwachung. Besonders die Erkenntnisse über Sozialsystem, Raumnutzung und Migrationsverhalten dienen als Grundlage für die Analysen im Rahmen dieser Arbeit.

1.2 Verbreitung des Waschbären in Deutschland

Der Waschbär (*Procyon lotor* Linné, 1758) wurde Anfang des 20. Jahrhunderts aus seinem ursprünglichen Verbreitungsgebiet, das sich von Nord- bis Mittelamerika erstreckt, zur Fellproduktion nach Europa eingeführt (Gehrt 2003, Hohmann und Bartussek 2005). In Westeuropa haben sich seitdem drei Populationszentren etabliert (Gehrt 2003). Eine kleine Population befindet sich in Nordostfrankreich im Departement Aisne nahe der belgischen Grenze und zwei große Populationen existieren in Deutschland, eine in Mitteldeutschland mit dem Schwerpunkt in Nordhessen und die hier untersuchte Population in Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern (Hohmann 2000, Thomaschek 2008, Michler und Köhnemann 2009). Die Population in Mitteldeutschland geht auf ein gezieltes Aussetzen von vier Waschbären am Edersee in Nordhessen im Jahr 1934 zurück mit dem Ziel, die „heimische Fauna bereichern zu können“ (Leicht 2009). Die Population in Mecklenburg-Vorpommern wurde von Tieren begründet, die 1945 nach einem Bombenangriff aus einer Pelztierfarm östlich von Berlin entlaufen sind (Stubbe 1993, Hohmann und Bartussek 2005). Von diesen beiden Zentren ausgehend haben die Waschbären inzwischen, unterstützt durch weitere Aussetzungen und Ausbrüche aus der Gefangenschaftshaltung, weite Teile Mittel- und Nordostdeutschlands be-

siedelt, wobei sie regional in sehr unterschiedlichen Dichten auftreten. Im Untersuchungsgebiet liegt die Populationsdichte bei 4 - 6 Individuen / 100 ha (Michler et al. 2008) und ist damit etwas höher als in der bis dato einzigen vergleichbaren Untersuchung in einem Waldgebiet im Solling (südliches Niedersachsen), wo die Populationsdichte bei 2 - 4 Individuen / 100 ha liegt (Hohmann 2000). Diese Werte liegen allerdings weit unter der Dichte von bis zu 100 Individuen / 100 ha, die in urbanen Lebensräumen wie der Stadt Kassel erreicht werden können (Michler et al. 2004).

Da der Waschbär bis 1954 unter Naturschutz stand und nicht bejagt werden durfte (Kampmann 1975, Michler und Köhnemann 2009), konnten die Gründerpopulationen über ein bzw. zwei Jahrzehnte ungestört wachsen. Die Waschbären haben sich schnell als Neobiota in Mitteleuropa etabliert, ohne allerdings als invasive Art und somit negativen Auswirkungen auf die Fauna oder das Ökosystem aufzutreten (Lutz 1981, Michler und Köhnemann 2009). Durch ihre omnivore Lebensweise finden sie reichlich Nahrung, ohne damit in Konkurrenz zu anderen Arten zu treten (Lutz 1981). Zudem besitzen Waschbären in Europa keine natürlichen Feinde (Michler et al. 2009) und üben selbst keinen ernsthaften Prädationsdruck aus (Michler und Köhnemann 2009). Mit der Nutzung von Baumhöhlen als Schlafplätze besetzen sie außerdem eine Nische, die nur von wenigen anderen Arten genutzt wird, wodurch die Konkurrenz um Versteckmöglichkeiten ausbleibt (Hohmann und Hupe 1998, Hohmann 2000). Nach dem Bundesnaturschutzgesetz gilt der Waschbär in Deutschland als heimische Tierart, da er sich nach der Einbürgerung durch den Menschen ohne weitere menschliche Eingriffe über mehrere Generationen in freier Natur erhalten hat (BNatSchG § 7 Abs. 2 Nr. 7).

1.3 Sozialverhalten

Der auffälligste Aspekt im Sozialverhalten der Waschbären ist, dass die Fähen solitär leben, während die Rüden oft Gruppen, sogenannte Koalitionen, bilden (Gehrt und Fritzell 1998b, Hohmann 1998, Michler et al. 2004). Dieses Verhalten tritt bei Carnivoren selten auf und ist meist eine Reaktion auf eine hohe Populationsdichte (Gehrt 2003, Gehrt und Fox 2004).

Die Fähen sind philopatrisch, d. h. die Töchter verbleiben auch nachdem sie ausgewachsen sind im Lebensraum der Mutter (Gehrt und Fritzell 1998a, Hohmann 2000, Michler und Köhnemann 2010). Durch dieses Verhalten kommt es lokal zur Ausbildung von Matrilinearitäten, innerhalb derer alle Fähen von einer gemeinsamen Stammutter abstammen und deshalb untereinander nah verwandt sind. Da die Fähen die Jungtiere allein aufziehen ist es für sie von Vorteil, in einem bekannten Gebiet zu bleiben, weil der Fortpflanzungserfolg der Fähen von der

Kenntnis geeigneter Wurf- und Futterplätze abhängt (ressourcenorientiertes Verhalten) (Clutton-Brock 1989). Dieses Verhalten ist nur möglich, wenn zwischen Mutter und Tochter keine Konkurrenz um Ressourcen oder Paarungsmöglichkeiten herrscht und der Mutter somit kein Nachteil entsteht, wenn sie die Tochter in ihrem Gebiet duldet (Gehrt und Fritzell 1998a). Obwohl sich die Streifgebiete nah verwandter Fähen also stark überlappen, bewegen diese sich dennoch meistens unabhängig voneinander (Chamberlain und Leopold 2002) und nur gelegentlich kommt es zu Begegnungen an Futter- oder Schlafplätzen (Hohmann und Bartussek 2005). Eine solche soziale Organisationsform, in der dauerhafte enge Beziehungen fehlen, wird als „Fusion-Fission-System“ bezeichnet (Hohmann 1998).

Bei den Waschbären sind es folglich Rüden die abwandern, da ihr Fortpflanzungserfolg, im Gegensatz zu den Fähen, nicht so sehr von der Kenntnis der Ressourcen eines Gebietes abhängt und ihnen in dieser Hinsicht kein Nachteil entsteht, wenn sie das vertraute Gebiet verlassen (Favre et al. 1997). Ein Grund für juvenile männliche Waschbären ihr Geburtsgebiet zu verlassen ist die Vermeidung von Inzucht, da aufgrund der Ausbildung von Matrilinearitäten eine hohe Verwandtschaft zu den Fähen des Geburtsgebiets besteht (Hauver 2008). Ein weiterer Grund ist die Vermeidung von Konkurrenz mit nah verwandten Rüden um Paarungsmöglichkeiten und Ressourcen (Gehrt und Fritzell 1998a). Die meisten Rüden wandern in ihrem zweiten Lebensjahr, so dass sie bei Eintritt der Geschlechtsreife ihr Geburtsgebiet verlassen haben (Gehrt und Fritzell 1998a, Hohmann 2000, Muschik 2008, Michler und Köhneemann 2010). Die Angaben über bei der Wanderung zurückgelegte Entfernungen sind sehr unterschiedlich und reichen von einigen Kilometern (Hohmann 2000, Cullingham et al. 2008) bis hin zu extremen Entfernungen von über 250 km (Priewert 1961 zitiert nach Gehrt und Fritzell 1998a). Markierte Rüden aus dem Untersuchungsgebiet dieser Studie wanderten im Mittel 52 km (Min. 2 km, Max. 285 km), doch die durchschnittlich zurückgelegte Entfernung ist wahrscheinlich noch größer, da die meisten Rüden tot aufgefunden wurden und ihre Wanderung vermutlich noch nicht beendet hatten (Michler und Köhneemann 2010).

Die Koalitionen der Rüden bestehen aus zwei oder mehr Tieren, die sich große Teile eines Streifgebietes teilen und eine enge soziale Bindung zueinander besitzen. Koalitionsrüden bewegen sich nachts gemeinsam durch ihr Gebiet und teilen sich Tagschlafplätze oder suchen sich getrennte Schlafplätze, die in geringer Entfernung voneinander liegen. Koalitionen werden in der Regel nach Ende der Paarungszeit gebildet und lösen sich zu Beginn der folgenden Paarungszeit wieder auf (Michler in prep.). Die Dauer der meisten Koalitionen ist nur auf eine

Saison beschränkt, einige wenige haben über mehrere Jahre bestand (Gehrt und Fritzell 1998b, Hohmann 2000, Chamberlain und Leopold 2002). Koalitionen bestehen aus geschlechtsreifen Rüden verschiedener Altersklassen, Jungtiere sind nie in einer Koalition anzutreffen (Gehrt und Fox 2004, Gehrt et al. 2008).

Aufgrund der Wanderungsbewegungen der Rüden, den sich jährlich neu bildenden Koalitionen sowie dem Tod älterer Rüden besteht eine große Dynamik in der Organisation der Rüden. Ein möglicher Grund für die Bildung der Koalitionen wird in der hohen Anzahl und der aufgrund der Ausbildung von Matrilinearitäten geklumpten Verteilung der Fähen gesehen (Hohmann 1998, Michler et al. 2004). Aufgrund der hohen Fähendichte hat ein einzelner Rüde zur Paarungszeit ein „Monopolisierungsproblem“, d. h. für einen einzelnen Rüden ist es zu aufwendig, sich einen exklusiven Zugang zu allen in seinem Streifgebiet lebenden Fähen zu sichern, zumal da die Fähen fast gleichzeitig zum Östrus kommen und durchschnittlich nur für drei Tage empfängnisbereit sind (Gehrt und Fritzell 1998b, Gehrt und Fritzell 1999, Hohmann 2000). Durch die Bildung einer Koalition kann also das gemeinsame Streifgebiet mit den darin lebenden Fähen leichter gegen andere Rüden verteidigt werden. Dabei gehen zwar Paarungsmöglichkeiten an den Koalitionspartner verloren, da aber die Bildung einer Koalition die Chance auf Paarung oft erst ermöglicht und die Fähen so zahlreich sind stellt dies für den einzelnen Rüden keinen großen Verlust dar (Hohmann 2000, Hohmann und Bartussek 2005). Weil sich die Rüden nicht an der Jungenaufzucht beteiligen ist die Aussicht auf möglichst große Paarungschancen für sie besonders wichtig, da ihr Reproduktionserfolg allein von der Anzahl der Fähen abhängt, mit denen sie sich paaren (reproduktionsorientiertes Verhalten) (Clutton-Brock 1989). Welche Rolle die Verwandtschaft der Rüden bei der Bildung einer Koalition spielt ist noch nicht völlig geklärt, da es sowohl Koalitionen aus unverwandten (Michler et al. 2004) als auch aus verwandten Rüden (Gehrt et al. 2008) gibt.

Obwohl die Streifgebiete von Rüden und Fähen stark überlappen, verhalten sich beide Geschlechter neutral zueinander. Zu direktem Kontakt kommt es meist nur in den Winterlagern (Michler in prep.) und während der Ranz (Hohmann 2000, Gehrt 2003).

Das Paarungssystem der Waschbären liegt zwischen polygyn und promiskuitiv (Fritzell 1978, Gehrt und Fritzell 1997) und wird durch die Verteilung der Fähen sowie durch die Synchronität des Östrus beeinflusst (Gehrt 2003). Aufgrund der geklumpten Verteilung der Fähen ging man lange davon aus, dass nur die Rüden polygam sind (Fritzell 1978). Beobachtungen haben jedoch inzwischen gezeigt, dass sich auch ein gewisser Prozentsatz der Fähen mit mehreren Rüden paart (Gehrt und Fritzell 1999). Durch genetische Untersuchungen kann-

te bereits nachgewiesen werden, dass es aufgrund dieses Verhaltens zu Mehrfachvaterschaften innerhalb eines Wurfes kommen kann (Roy Nielsen und Nielsen 2007, Hauver 2008). Das Auftreten von Mehrfachvaterschaften wurde bislang nur in Waschbärpopulationen mit hoher Populationsdichte untersucht. In den dort untersuchten Würfen besaß ein Großteil der Wurfgeschwister unterschiedliche Väter (Roy Nielsen und Nielsen 2007, Hauver 2008). Ob überhaupt und wie häufig Mehrfachvaterschaften innerhalb eines Wurfes auch bei der geringen Populationsdichte im Müritz-Nationalpark auftreten, soll durch die vorliegende Arbeit geklärt werden.

1.4 Untersuchungsgebiet

Beim Untersuchungsgebiet handelt es sich um den Serrahner Teil des Müritz-Nationalparks, der 1990 gegründet wurde (Abbildung 1.1). Der Müritz-Nationalpark besitzt eine Gesamtfläche von 322 km² und gliedert sich in das größere Teilgebiet Müritz mit einer Fläche von 260 km² und das kleinere, südöstlich davon gelegene Teilgebiet Serrahn mit einer Fläche von 62 km² (Landesamt für Forsten und Großschutzgebiete Mecklenburg-Vorpommern 2004a).

Die Mecklenburgische Seenplatte ist eine typische Jungmoränenlandschaft, die in der Folge der Weichselkaltzeit entstanden ist (Landesamt für Forsten und Großschutzgebiete Mecklenburg-Vorpommern 2004b). Charakteristische Geländeformen dieses Landschaftstyps sind eine Vielzahl an geschlossenen Hohlformen, ein wenig ausgebildetes Flusssystem sowie zahlreiche Binnenentwässerungsgebiete (Ahnert 1996). Durch den hohen Grundwasserspiegel haben sich in den Hohlformen Moore gebildet, weshalb waldfreie Moore einen Flächenanteil von 8 % des Müritz-Nationalparks ausmachen. Eine Fläche von 13 % ist von Seen bedeckt, darunter über 100 größere Seen mit einer Fläche von über 1 ha (Landesamt für Forsten und Großschutzgebiete Mecklenburg-Vorpommern 2004a und b). Das einzige Fließgewässer, das durch das Untersuchungsgebiet verläuft, ist der Mühlengraben (Michler et al. 2008).

Der Müritz-Nationalpark ist zu 72 % bewaldet, wovon ein Anteil von über 75 % auf Kiefernwälder entfällt (Nationalparkamt Müritz 2010a). Dies ist eine Folge der Aufforstung nach ursprünglichem Raubbau und der Nutzholzgewinnung (Landesamt für Forsten und Großschutzgebiete Mecklenburg-Vorpommern 2004b). Buche (8 %), Birke (6 %) und Erle (5 %) machen jeweils nur einen geringen Flächenanteil aus (Nationalparkamt Müritz 2010b). Nur im Serrahner Teil, der zu 82 % bewaldet ist, finden sich zwar auch noch über 50 % Kiefern, doch daneben gibt es als Besonderheit großflächige, reine Buchenbestände mit einigen solitär stehenden Eichen (Köhnemann 2007). Bei den Buchenwäldern handelt es sich um eines der größten zusammenhängenden Buchenwaldgebiete Deutschlands, weshalb ein großer Teil der

Buchenwälder um Serrahn 2009 zur Nominierung als UNESCO-Weltnaturerbebestätte vorgeschlagen wurde (Nationalparkamt Müritz 2010c).

Aufgrund der vielen Gewässerstrukturen stellt das Untersuchungsgebiet einen sehr attraktiven Lebensraum für die Waschbären dar, da sie dort unter anderem einen erheblichen Teil ihrer Nahrung finden, wie z. B. Amphibien, Insektenlarven und Fische (Köhnemann und Michler 2009). Da die Buchenwälder schon seit langer Zeit nicht wirtschaftlich genutzt oder durch menschliche Eingriffe reguliert werden, findet sich dort eine große Anzahl an alten oder abgestorbenen Bäumen, die durch ihre Astlöcher oder hohlen Stämme den Waschbären einen idealen Rückzugsraum bieten (Michler et al. 2008).

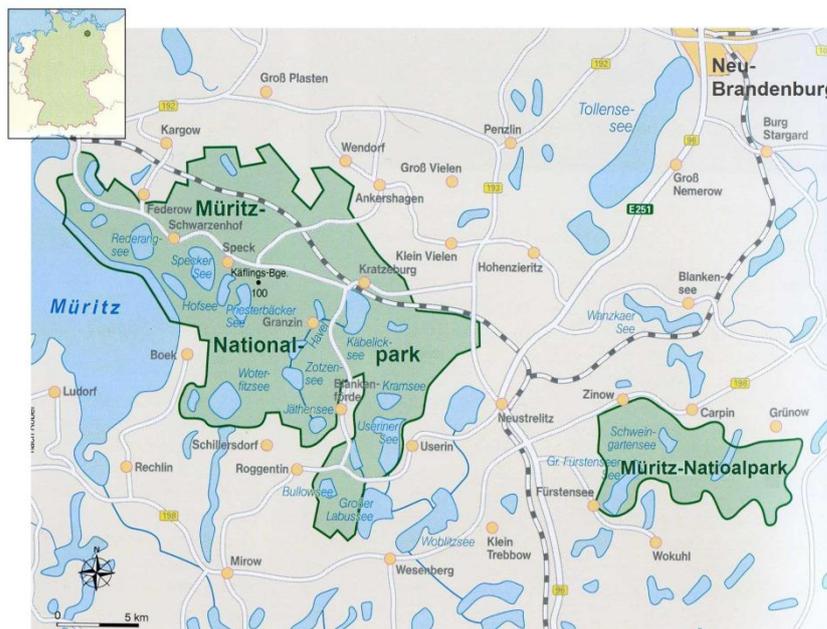


Abbildung 1.1: Lage des Müritz Nationalparks. Links das größere Teilgebiet Müritz, rechts das kleinere Teilgebiet Serrahn. (Quelle: Bibelriether 1997, verändert).

1.5 Molekularbiologische Analyse

Zur Genotypisierung der Waschbären wurden Mikrosatelliten als molekulare Marker verwendet. Bei Mikrosatelliten handelt es sich um nicht-codierende DNA-Abschnitte, innerhalb derer sich ein Motiv aus zwei bis vier Basenpaaren mehrfach wiederholt. Vor jedem Mikrosatelliten befindet sich ein Abschnitt mit einer geringen Mutationsrate, welcher den jeweiligen Mikrosatelliten eindeutig kennzeichnet und an den sich bei der PCR die Primer anlagern. Da die Zahl der Wiederholungen des Motivs variabel ist variiert auch die Gesamtlänge des Mikrosatelliten, die als Allel bezeichnet wird, zwischen den untersuchten Individuen. Für jedes

Individuum kann so, basierend auf den Fragmentlängen mehrerer Mikrosatelliten, ein individueller Genotyp erstellt werden (Townsend et al. 2008).

Da die Allele biparental vererbt werden, können auf Basis des Genotyps eines Jungtieres die wahren Eltern aus einer Auswahl möglicher Eltern ermittelt werden. Außerdem können durch das Vorhandensein bzw. Fehlen gleicher Allele, bei gleichzeitiger Kenntnis der Allelhäufigkeiten innerhalb einer Population, Rückschlüsse auf die verwandtschaftliche Nähe zweier Individuen gezogen werden.

Eine Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Waschbärpopulation auf Grundlage genetischer Daten ist eine sinnvolle Ergänzung, da sich Verwandtschaften sowie einige Aspekte des Sozialsystems nicht allein durch Beobachtungen klären lassen. So sind zwar für einige Jungtiere die Muttertiere aus Beobachtungen bekannt, doch andere Jungtiere wurden nie zusammen mit einer möglichen Mutter nachgewiesen. Da sich die Rüden nicht an der Jungenaufzucht beteiligen, gibt es generell keine Beobachtungen von Jungtieren mit ihren Vätertieren. Hinweise auf mögliche Väter ergeben sich oft nur aus der Aktionsraumüberlappung zwischen Rüden und Fähen. Konkretere Hinweise gibt es, wenn Fähen während der Ranzzeit mit einem oder mehreren Rüden nachweislich Kontakt hatten. Welcher der möglichen Rüden der Vater der Jungtiere ist und ob sogar eine Mehrfachvaterschaft vorliegt, lässt sich folglich nur anhand der genetischen Daten klären. Ebenso sollte sich die Philopatrie der Fähen sowie die Abwanderung der Rüden anhand der genetischen Daten zeigen lassen, indem sich die Fähen untereinander genetisch ähnlicher sind als die Rüden (Ratnayeke et al. 2002).

1.6 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die beprobten Waschbären ($n = 141$, 74 Rüden, 67 Fähen) an zehn Genorten genotypisiert werden. Die genetischen Daten werden dazu verwendet, möglichst vielen Jungtieren die wahre Mutter und den wahren Vater aus einem Pool möglicher Eltern sicher zuzuordnen. Ein besonderes Augenmerk wird hierbei auf die Feststellung von Mehrfachvaterschaften innerhalb eines Wurfes gelegt.

Ein weiteres Ziel ist es, den Verwandtschaftsgrad der in einer Koalition lebenden Rüden zu ermitteln, um zu testen, ob diese besonders nah oder nicht verwandt sind. Außerdem soll festgestellt werden, ob sich die Zugehörigkeit zu einer Koalition auf den Fortpflanzungserfolg eines Rüden auswirkt.

Des Weiteren soll mit den genetischen Daten die Existenz von Matrilineen und die Beschränkung der Wanderungsbewegungen auf Rüden belegt werden. Hierzu wird die Hypothese ge-

testet, dass Fähen aufgrund der Matrilinearität untereinander einen höheren Verwandtschaftsgrad besitzen als die Rüden.

2. Material und Methoden

2.1 Probenahme

Die Entnahme von Gewebe-, Haar- und Speichelproben wurde von Mitarbeitern des „Projekt Waschbär“ durchgeführt. Die Tiere wurden in selbstgebauten Fallen gefangen, deren Mechanismus nur von Waschbären ausgelöst werden kann. Aus der Falle heraus wurden die Tiere dann in einen separaten Bearbeitungskäfig mit doppeltem Boden laufen gelassen, in dem sie zur Verabreichung des Anästhetikums fixiert werden konnten. An jeden Waschbären wurde zunächst eine Identifikationsnummer vergeben und zur späteren Wiedererkennung wurden sie mit Ohrmarken (Dalton Rototag[®]) versehen. Gewebe wurde mittels einer Hautstanze (Biopsy Punch Ø 6mm, Kruuse[®]) entnommen und bis zur Bearbeitung im Labor in einem mit Ethanol (99,9 %, vergällt) gefüllten 2 ml Reaktionsgefäß im Kühl- oder Gefrierschrank aufbewahrt. Zur Entnahme der Speichelproben wurde ein Beprobungsset (Voigtländer[®]) verwendet. In einem Fall wurde die Speichelprobe mit einem handelsüblichen Wattestäbchen genommen, dessen Spitze in einer Filmdose aufbewahrt wurde. Die Haarproben wurden bis zur Verwendung in Briefumschlägen aufbewahrt. Eine ausführliche Darstellung der angewandten feldökologischen Methoden findet sich bei Köhnemann (2007).

Insgesamt lagen für diese Arbeit 26 Gewebe-, 22 Haar- und 7 Speichelproben neu zur Bearbeitung vor. Im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit (Peter 2009) wurden bereits 93 Tiere an acht Loci genotypisiert. Die vorhandenen DNA-Extrakte wurden verwendet, um diese Tiere an zwei weiteren Loci zu genotypisieren. Die bereits erhobenen genetischen Daten wurden für die vorliegende Arbeit weiter verwendet und zusammen mit den neu erhobenen Daten nochmals analysiert.

2.2 DNA-Extraktion

2.2.1 DNA-Extraktion aus Gewebe

Vor der Extraktion wurden die Haare von den Gewebeproben entfernt. Da für die Extraktion 20 mg Gewebe eingesetzt werden sollte, wurden die Gewebeproben nach der Haarentfernung in feuchtem Zustand entsprechend abgewogen. Proben mit einem Gewicht von unter 20 mg wurden komplett verwendet. Das Gewebe wurde mit einem Skalpell kleingeschnitten und dann für 5 - 10 min bei 50°C im Trockenschrank getrocknet, um das darauf verbliebene Ethanol zu verdampfen. Zur DNA-Extraktion aus den Gewebe-, Haar- und Speichelproben wurde das NucleoSpin[®] Tissue-Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die DNA-Extraktion wur-

de nach dem Standard-Protokoll von Macherey-Nagel (siehe Anhang) durchgeführt. Vor der Ethanol-fällung wurden die Proben zusätzlich zentrifugiert (5 min, 16160 x g), um im Lysat verbliebene Haare zu entfernen, und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Eluierung der DNA erfolgte, abweichend vom Standard-Protokoll, in zwei Schritten mit jeweils 50 µl BE-Puffer und einer Inkubationszeit von fünf Minuten, da diese Methode in vorangegangenen Tests eine höhere Ergiebigkeit zeigte.

2.2.2 DNA-Extraktion aus Speichel

Die Extraktion der DNA aus den Speichelproben folgte ebenfalls dem Standardprotokoll von Macherey-Nagel (siehe Anhang). Für die Prä-Lyse wurden 400 µl PBS, für die Lyse entsprechend 400 µl von Puffer B3 und für die Ethanol-fällung 400 µl Ethanol (99%, Roth) eingesetzt. Um das Lysat von der Spitze der Wattestäbchen zu trennen, wurde so viel Lysat wie möglich in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert.

2.2.3 DNA-Extraktion aus Haaren

Je nach Größe der Haarfollikel wurden zwischen 60 und 75 Follikel von den Haaren abgetrennt und in einem 2 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Zur Prä-Lyse wurden die Proben ca. 12 h bei 56°C in einem Thermoschüttler (peqlab Thriller) inkubiert. Auf ein vorheriges mehrmaliges gefrieren und auftauen der Proben, wie im Standardprotokoll beschrieben, wurde verzichtet, da sich in Vorversuchen hierdurch keine besseren Ergebnisse erzielen ließen (Extraktionsprotokoll siehe Anhang).

2.3 PCR

Da die Extrakte für die PCR in Anlehnung an die Diplomarbeit von Peter (2009) eine DNA-Konzentration von 20 ng/µl aufweisen sollten, wurde diese zunächst mit dem NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (peqlab) bestimmt. Als Berechnungsgrundlage der DNA-Konzentration diente die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm (Berechnung siehe Anhang). Im Zuge dieser Messung wurde auch die Reinheit des DNA-Extraktes ermittelt. Hierzu wurde das Verhältnis der Absorption bei den Wellenlängen von 260 nm und 280 nm berechnet. Bei einem Verhältnis zwischen 1,8 und 2 kann die DNA als frei von Verunreinigungen durch Proteine angesehen werden (Mülhardt 2009). Extrakte mit einer DNA-Konzentration von über 20 ng/µl wurden entsprechend verdünnt, Extrakte aus Haar- und

Speichelproben mit einer DNA-Konzentration unter 20 ng/μl (n = 21) wurden unverdünnt eingesetzt.

Für die PCR wurden bereits bekannte, speziell für Waschbären entwickelte Primer verwendet (Cullingham et al. 2006, Fike et al. 2007). Von diesen wurden bereits sechzehn tetranukleotide Primer in einer vorangegangenen Diplomarbeit (Peter 2009) getestet, wobei sich acht als brauchbar erwiesen haben. Da in dieser Arbeit noch zwei weitere Primer eingesetzt werden sollten, wurden zusätzlich die dinukleotiden Primer PLOT-02, PLOT-03, PLOT-04, PLOT-05, PLOT-07 und PLOT-09 (Fike et al. 2007) getestet. Mit jedem dieser Primer konnte in der PCR DNA amplifiziert werden, aber aufgrund höherer Allelzahlen wurden die Primer PLOT-02 und PLOT-05 für die weitere Verwendung ausgewählt.

Um die PCR-Produkte mit einem Fluoreszenzfarbstoff für die spätere Detektion markieren zu können, wurden alle Forward-Primer mit einer M13-Sequenz (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') versehen, an die sich ein farbmarkierter M13 Primer anlagern konnte (Boutin-Ganache et al. 2001). Die acht bereits verwendeten Primer wurden mit den gleichen Farben markiert wie in der Diplomarbeit von Peter (2009), um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. Die Farbmarkierung der beiden zusätzlichen Primer wurde so gewählt, dass bei der Fragmentlängenanalyse bis zu fünf Mikrosatelliten in einem Multiplex-Ansatz kombiniert werden konnten. Die jeweilige Farbmarkierung der Primer ist in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Für die PCR wurde ein Reaktionsvolumen von 15 μl verwendet, dessen Zusammensetzung Tabelle 2.2 entnommen werden kann. Bei den Primern PLOT-02, PLOT-05, PLOT-06, PLOT-08, PLOT-10 und PLO-M2 wurde von allen Proben 1 μl des DNA-Extraktes eingesetzt. Bei den Primern PLO-M3, PLO-M17, PLO3-86 und PLO2-123 wurde von allen Extrakten mit einer DNA-Konzentration unter 10 ng/μl 2 μl des DNA-Extraktes eingesetzt um bessere Ergebnisse zu erzielen. Für jede Probe wurde die PCR mit jedem Primer drei Mal wiederholt. Um Kontaminationen auszuschließen, wurde bei jeder PCR eine Negativprobe getestet, bei der statt des DNA-Extraktes ddH₂O eingesetzt wurde. Zur Durchführung der PCR wurde ein Primus 96 advanced® Thermocycler (peqlab) verwendet. Das genaue PCR-Programm ist in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Übersicht über die zur Genotypisierung der Waschbären aus dem Müritz-Nationalpark verwendeten Primer. Die angegebene Farbmarkierung und Annealing-Temperatur wurden bei der PCR verwendet, Primer-Sequenz und Fragmentlänge wurden der Referenz entnommen.

Primer	Primer-Sequenz	Farbmarkierung	T _a [°C]	Fragmentlänge [bp]	Referenz
PLOT-02	F:TCAATGTAGAAGCTGAGAAAAATTTGA R:GGCTCAAATCAGAGGTTAACAA	Cy 5	61	180-204	Fike et al. (2007)
PLOT-05	F: GCACCACTTGGCTTGATAGC R: GCAAGTGCTCTGTAAAGTGTGG	Cy 5.5	64	110-133	Fike et al. (2007)
PLOT-06	F: TAGCATGCAACTCCTCATCC R: TGGAGAGAAAATCCCACAGAC	Cy 7	63	161-173	Fike et al. (2007)
PLOT-08	F: TGTCTGTTAGACCACAGAAGTCC R: ATTAATATAATAGGACAGGGTGTGC	Cy 5.5	63	236-256	Fike et al. (2007)
PLOT-10	F: ACTCTTGCTGGACTCATCC R: ATGCCAATCAGGCTCATACC	Cy 5.5	63	146-178	Fike et al. (2007)
PLO-M2	F: GGAAAACCACAGAGAGACGG R: CTTGGCACAGAGCAGAATCC	Cy 7	56	281-329	Cullingham et al. (2006)
PLO-M3	F: CTCCCATCTTCTCTTTTCG R: GTTGACAATTGCAGGACCAC	Cy 5	56	266-286	Cullingham et al. (2006)
PLO-M17	F: CTGCTGAGTAAGGAGTAAGG R: TCCCCTGTACATATTCAGGC	Cy 7	56	208-228	Cullingham et al. (2006)
PLO2-123	F: GTCTACTCAGTGCATAGCATTGTGC R: TTCCTGCAATGTCCCTCTAACTG	Cy 5.5	56	579-619	Cullingham et al. (2006)
PLO3-86	F: GATTGATAGATTAATTGGTCTTAACTCC R: CTGGATTATAAATCTGGCAAGAGCC	Cy 7	56	301-460	Cullingham et al. (2006)

F = forward, R = reverse, T_a = Annealing-Temperatur

Tabelle 2.2: Mastermix für die PCR mit 1 µl DNA-Extrakt (links) bzw. mit 2 µl DNA-Extrakt (rechts). Das Volumen bezieht sich auf eine Probe.

Reagenzien	Ausgangs-Konzentration	Volumen [µl]
Primer forward	10 pmol/µl	0,3
Primer reverse	100 pmol/µl	0,15
M13-Primer	100 pmol/µl	0,15
PCR-Puffer	5x	3
MgCl ₂	25 mM	0,75
dNTP	10 mM	0,3
Taq	5 u/µl	0,075
ddH ₂ O		9,9275
DNA-Extrakt	20 ng/µl	1
Gesamtvolumen		15

Reagenzien	Ausgangs-Konzentration	Volumen [µl]
Primer forward	10 pmol/µl	0,3
Primer reverse	100 pmol/µl	0,15
M13-Primer	100 pmol/µl	0,15
PCR-Puffer	5x	3
MgCl ₂	25 mM	0,75
dNTP	10 mM	0,3
Taq	5 u/µl	0,075
ddH ₂ O		8,275
DNA-Extrakt	< 10 ng/µl	2
Gesamtvolumen		15

Tabelle 2.3: Einzelne Schritte des für die PCR verwendeten Programms.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Erste Denaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	40
Annealing	*	30 s	
Strangverlängerung	72°C	30 s	
Abschließende Strangverlängerung	72°C	5 min	1
Kühlung	8°C	∞	

* Annealing-Temperatur variiert je nach Primer, siehe Tabelle 2.1.

2.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde durchgeführt um festzustellen, ob bei der PCR DNA amplifiziert wurde. Diese Kontrolle war insbesondere bei DNA-Extrakten mit geringer DNA-Konzentration erforderlich. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob DNA-Fragmente der richtigen Fragmentlänge amplifiziert wurden und ob das Reaktionsgemisch durch fremde DNA kontaminiert war.

Für die Gelelektrophorese wurde ein 2%iges Agarose-Gel verwendet, bestehend aus 1 g Agarose (peqlab), 50 ml 0,5 x TBE (Zusammensetzung siehe Anhang) und 3 µl Ethidiumbromid (Roth). Es wurden jeweils 10 µl des PCR-Produktes mit 2 µl Ladepuffer (Zusammensetzung siehe Anhang) versetzt und anschließend in die Taschen des Gels pipettiert. Um die Länge der Fragmente bestimmen zu können, wurden in jeder Reihe 3 µl einer 100 bp DNA-Leiter (Roth) eingesetzt. Zur Durchführung der Elektrophorese wurden Gelkammern der Firma Labnet International (Sub System 70TM) verwendet. Die Laufzeit betrug 45 min, bei Primer PLOT-05 nur 35 min, bei einer Spannung von 90 V. Nach Ende der Gelelektrophorese wurde das Gel mit UV-Licht beleuchtet, um das Ergebnis erkennen zu können, und dabei mit einer Digitalkamera fotografiert.

2.5 Fragmentlängenanalyse

Zur Bestimmung der Fragmentlängen wurde das CEQTM 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter) verwendet. Die Zusammensetzung des Ansatzes aus Sample Loading Solution und Größenstandard wurde je nach Anzahl der in einem Tube eingesetzten Mikrosatelliten variiert. Für einen Multiplex-Ansatz mit vier oder fünf Mikrosatelliten wurde für eine Reihe, bestehend aus acht Einzeltubes, ein Mastermix aus 200 µl SLS (Beckman Coulter) und

5,6 µl 400 bp oder 600 bp Größenstandard (Beckman Coulter) hergestellt und je 25 µl davon in ein Tube der Mikrotiterplatte pipettiert. Von den mit Cy 5.5 oder Cy 7 markierten Mikrosatelliten wurde je 1 µl eingesetzt, von den mit Cy 5 markierten Mikrosatelliten 0,5 µl. Für einen Ansatz mit einem bis drei Mikrosatelliten wurden pro Reihe 240 µl SLS und 4,8 µl 400 bp oder 600 bp Größenstandard eingesetzt und davon je 30 µl in die Tubes der Mikrotiterplatte pipettiert. Von den mit Cy 5.5 oder Cy 7 markierten Mikrosatelliten wurden je 2 µl eingesetzt, von den mit Cy 5 markierten Mikrosatelliten je 1 µl.

Das Auslesen der Fragmentlängen aus den Elektropherogrammen erfolgte im Programm CEQ 8000 Series Genetic Analysis System Software Version 9.0.25 (Beckman Coulter). Einen Ausschnitt aus einem Elektropherogramm zeigt Abbildung 2.1. Gewertet wurde stets der letzte Peak vor einem starken Abfall der Signalintensität. Die angezeigten Fragmentlängen wurden so auf- bzw. abgerundet, dass immer ein Abstand von vier (bei tetranukleotiden Mikrosatelliten) bzw. zwei (bei dinukleotiden Mikrosatelliten) Basenpaaren zwischen aufeinanderfolgenden Fragmentlängen lag. Von der so ermittelten Fragmentlänge wurden noch 19 bp abgezogen, um die Fragmentlänge um die Länge des M13-Primers zu korrigieren.

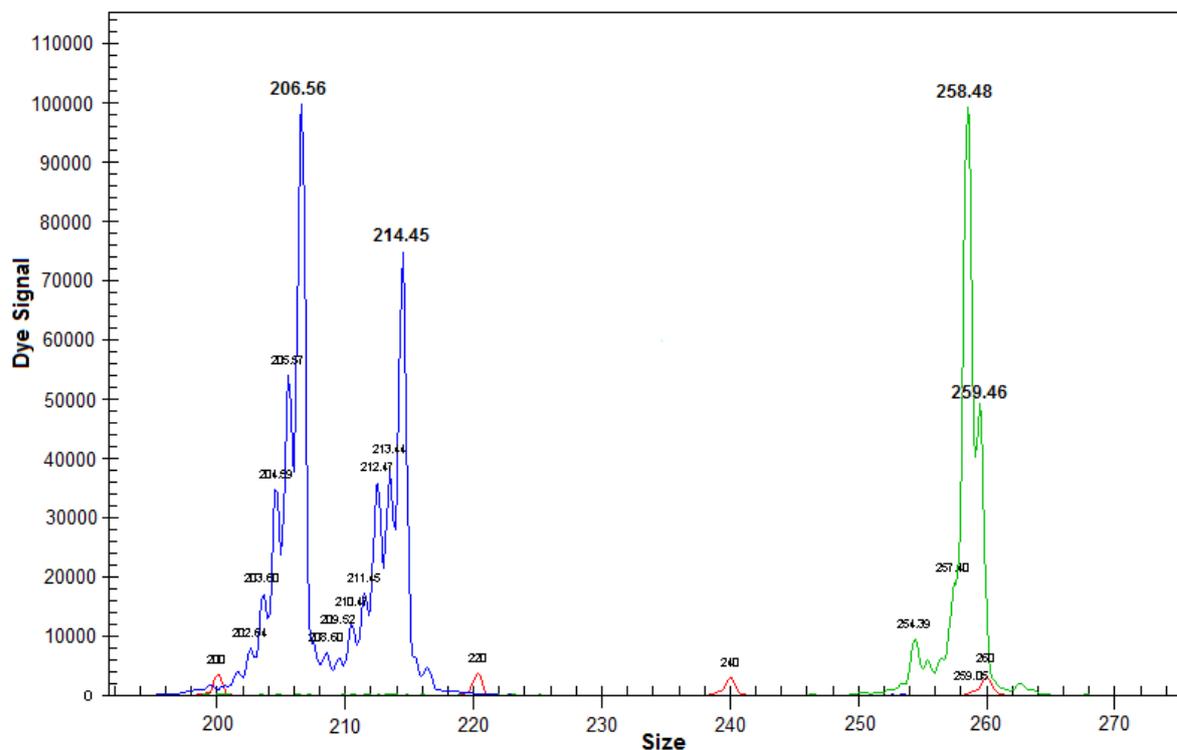


Abbildung 2.1: Ausschnitt aus einem Elektropherogramm. Die blauen Peaks zeigen einen heterozygoten Locus mit den Fragmentlängen 206 bp und 214 bp. Der grüne Peak zeigt einen homozygoten Locus, dessen Allele beide eine Fragmentlänge von 260 bp besitzen. Die roten Peaks stammen vom Größenstandard.

2.6 Auswertung

Um Aussagen über die genetische Diversität der untersuchten Waschbärpopulation zu treffen, wurde zunächst mit dem Programm ARLEQUIN 3.5 (Excoffier et al. 2005) die beobachtete und erwartete Heterozygotie für die einzelnen Loci berechnet und der Test auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht durchgeführt. Mit dem Programm CERVUS 3.0 (Kalinowski et al. 2007) wurden die Allelhäufigkeiten an den einzelnen Loci berechnet.

Zur Ermittlung von Mutter- und Vaterschaft sowie Elternpaaren für jedes Jungtier wurde ebenfalls CERVUS 3.0 eingesetzt. CERVUS ermittelt auf Basis der Genotypen und Allelhäufigkeiten in der Population für jeden Elternkandidaten sowohl die Wahrscheinlichkeit, dass er das tatsächliche Elterntier eines Jungtieres ist, als auch die Wahrscheinlichkeit, dass er nicht das Elterntier ist. Der natürliche Logarithmus aus dem Verhältnis dieser beiden Wahrscheinlichkeiten wird als LOD-Wert bezeichnet. Je höher der LOD-Wert, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Elternkandidat das tatsächliche Elterntier ist. Auf diese Weise ermittelt CERVUS für jedes Jungtier die beiden Vater- bzw. Mutterkandidaten mit den höchsten LOD-Werten. Aus den LOD-Werten dieser beiden Tiere wird dann die Differenz gebildet, der sogenannte Δ -Wert. Um festzustellen, ab welcher Höhe des Δ -Wertes die Zuordnung eines Elterntieres signifikant ist, erfolgt vor der eigentlichen Analyse eine Simulation der Elternschaftsanalyse, in der kritische Werte für Δ festgelegt werden (Marshall et al. 1998). Der Simulation liegen die Genotypen und die daraus ermittelten Allelhäufigkeiten der untersuchten Waschbärpopulation zugrunde.

Da die Jungtiere aus fünf aufeinanderfolgenden Jahren stammen (2006 bis 2010), erfolgte die Analyse getrennt nach Jahren. Die Anzahl der möglichen Mutter- und Vaterkandidaten ändert sich dabei von Jahr zu Jahr durch Zu- und Abwanderung von Rüden, Erreichen der Geschlechtsreife von Fähen des Vorjahres und den Tod adulter Tiere. Die für die Simulationen verwendeten Parameter können Tabelle 2.4 entnommen werden. Der Anteil der beprobten Mutter- bzw. Vaterkandidaten wurde in Absprache mit den Projektleitern des „Projekt Waschbär“ festgelegt. Aus der Berechnung der Allelhäufigkeiten mit CERVUS wurde der Anteil der genotypisierten Loci entnommen. Die kleinste Anzahl genotypisierter Loci wurde aus den Rohdaten der Genotypen abgelesen. Für die Werte der Vertrauensbereiche, die Anzahl der Durchläufe und die Fehlerrate bei der Genotypisierung wurden die Voreinstellungen von CERVUS beibehalten.

Tabelle 2.4: Auflistung der für die Simulationen der Elternschaftsanalysen in CERVUS eingesetzten Parameter.

Parameter	Wert
Anteil der beprobten Mutterkandidaten	0,90
Anteil der beprobten Vaterkandidaten	0,90
Anteil der genotypisierten Loci	0,9972
Fehlerrate bei der Genotypisierung	0,01
Kleinste Anzahl genotypisierter Loci	7
Vertrauensbereich „Relaxed“	80 %
Vertrauensbereich „Strict“	95 %
Anzahl der Durchläufe	10000

Mit CERVUS wurden zunächst für jedes Jungtier die beiden wahrscheinlichsten Mutter- bzw. Vaterkandidaten ermittelt. Es wurde nach je zwei möglichen Eltern gesucht, da CERVUS in einigen Fällen dem wahren Elterntier nicht die höchste Wahrscheinlichkeit der Elternschaft zuweist. Dies geschieht vor allem, wenn der Datensatz einige Tiere mit ähnlichem Genotyp enthält. Diese Ergebnisse wurden den Projektleitern (Berit Köhnemann und Frank Michler) vorgelegt, um sie mit den Kenntnissen aus den Freilandarbeiten des „Projekt Waschbär“ abzugleichen. Die Kenntnisse beruhen auf dem Fangort der Tiere, dem gemeinsamen Auftreten von Tieren auf Bildern der Fotofallen und dem Monitoring der besenderten Tiere. In allen Fällen, in denen die von CERVUS ermittelte Mutter durch die Beobachtungen bestätigt werden konnte, wurde mit CERVUS nochmals unter Einbezug der Mutter ein genetisch passender Vater ermittelt, um eine größere Sicherheit bei der Vaterschaftszuordnung zu erreichen.

Das Programm KINGROUP v2_090501 (Konovalov et al. 2004) wurde verwendet, um den Verwandtschaftsgrad zweier Individuen zu ermitteln. Dies geschieht auf Basis der Genotypen der Individuen und der Allelhäufigkeiten in der untersuchten Population. Der Verwandtschaftsgrad wird nach der Methode von Queller und Goodnight (1989) berechnet und in Form von relatedness-Werten, im Folgenden als r-Werte bezeichnet, ausgegeben. Die r-Werte reichen von -1 bis 1 und geben den Anteil an Allelen wieder, der aufgrund der Abstammung von einem gemeinsamen Vorfahren identisch ist. Verwandte ersten Grades sollten einen r-Wert von 0,5 besitzen, Verwandte zweiten Grades einen r-Wert von 0,25 und Verwandte dritten Grades einen r-Wert von 0,125. Unverwandte Individuen besitzen einen r-Wert kleiner oder gleich null (Blouin 2003).

Die mit KINGROUP berechneten r-Werte wurden für weitere statistische Tests verwendet, die mit SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc.) durchgeführt wurden. Um die Daten auf Normalverteilung zu testen, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test eingesetzt. Zur Feststellung von Unter-

schieden zwischen zwei Fallgruppen wurde bei normalverteilten Daten der t-Test und bei nicht normalverteilten Daten der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Um Unterschiede zwischen mehreren Fallgruppen festzustellen, wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt (Lamprecht 1999). Bei allen statistischen Tests wurde ein Signifikanzwert $< 0,05$ als signifikant, ein Wert $< 0,01$ als sehr signifikant und ein Wert $< 0,001$ als hoch signifikant aufgefasst.

Verschiedene Funktionen aus dem Programm GenAlEx 6.3 (Peakall und Smouse 2006) wurden genutzt, um Aussagen über das Wanderungsverhalten der Rüden und die Verwandtschaft unter den Fähen zu treffen. Die Funktion „Sex Biased Dispersal“ wurde angewendet, um die Philopatry der Fähen bzw. die Abwanderung von Rüden anhand der genetischen Daten nachzuweisen. Von GenAlEx wird für jedes Individuum ein sogenannter AI_c -Wert berechnet, der als Kennwert für die Zugehörigkeit zu einer Population dient. Der durchschnittliche AI_c -Wert einer Population liegt bei null. Individuen mit einem negativen AI_c -Wert sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Immigranten (Peakall und Smouse 2006). Der Mantel-Test in GenAlEx wurde verwendet, um festzustellen, ob bei adulten Fähen ein Zusammenhang zwischen genetischer und geographischer Distanz existiert.

3. Ergebnisse

3.1 Genetische Diversität

Insgesamt wurden für die vorliegende Arbeit 141 Waschbären (74 Rüden, 67 Fähen) genotypisiert. Davon konnten 139 Individuen an allen zehn Loci genotypisiert werden. Aufgrund der geringen DNA-Konzentration im DNA-Extrakt konnte ein Individuum (6017) nur an sieben Loci genotypisiert werden, ein anderes Individuum (6008) nur an neun Loci.

Die Anzahl der Allele je Locus sowie die beobachtete und erwartete Heterozygotie sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Locus PLO2-123 besitzt mit drei Allelen die geringste, Locus PLO3-86 mit 11 Allelen die höchste Allelanzahl. Die durchschnittliche Anzahl der Allele je Locus liegt bei 6,2. Die Werte für die beobachtete Heterozygotie liegen im Bereich zwischen 0,319 bei PLO2-123 und 0,829 bei PLO3-86. Wie Tabelle 3.1 zeigt, liegt an keinem Locus eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vor.

Tabelle 3.1: Allelanzahl, beobachtete und erwartete Heterozygotie sowie Ergebnisse des Tests auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für die untersuchten Loci [n = 10] der Waschbärpopulation des Müritz-Nationalparks.

Locus	Allelanzahl	H _o	H _e	p
PLOT-02	8	0,736	0,741	0,052
PLOT-05	8	0,688	0,648	0,300
PLOT-06	5	0,617	0,562	0,610
PLOT-08	5	0,453	0,449	0,459
PLOT-10	5	0,589	0,591	0,255
PLO-M2	8	0,773	0,785	0,679
PLO-M3	4	0,440	0,453	0,090
PLO-M17	5	0,787	0,762	0,310
PLO2-123	3	0,319	0,325	0,679
PLO3-86	11	0,829	0,838	0,255
Mittelwert	6,2	0,623	0,615	

H_o = beobachtete Heterozygotie, H_e = erwartete Heterozygotie, p = Signifikanzwert

In Tabelle 3.2 wird die Allelanzahl sowie die beobachtete und erwartete Heterozygotie an den zehn Loci der hier untersuchten Population mit den Werten aus fünf anderen Waschbärpopulationen verglichen. Bei der hier untersuchten Population liegt die Allelanzahl an allen Loci außer PLOT-06 stets unter den Allelanzahlen der anderen Populationen, obwohl in zwei Fällen deutlich weniger Individuen in die Untersuchung einbezogen wurden. Besonders deutlich wird der Unterschied an PLO3-86 und an PLO2-123, an denen in den anderen Populationen mehr als die doppelte bzw. vierfache Anzahl an Allelen auftritt. An fast allen Loci liegt sowohl die beobachtete als auch die erwartete Heterozygotie unter den Vergleichswerten. Nur

bei PLO-M17 ist die beobachtete Heterozygotie etwas höher als in den anderen Populationen. Auffallend niedrig sind die Werte dagegen bei PLOT-08, PLO-M3 und PLO2-123. An diesen Loci sind weniger als die Hälfte der beprobten Tiere heterozygot. Eher geringe Abweichungen von den Vergleichswerten liegen bei PLOT-06, PLO-M2, PLO-M17 und PLO3-86 vor.

Tabelle 3.2: Vergleich der genetischen Diversität von sechs verschiedenen Waschbärpopulationen. Verglichen werden die in dieser Arbeit untersuchte Population aus dem Müritz-Nationalpark, zwei Populationen aus Ontario, Kanada (Cullingham et al. 2008) sowie je eine Population aus Indiana (Fike et al.), Illinois (Hauver 2008) und Pennsylvania (Root et al. 2009).

Locus		Müritz-Nationalpark	Cullingham et al. (2008)	St. Lawrence	Fike et al. (2007)	Hauver (2008)	Root et al. (2009)
		[n=141]	Niagara [n=292]	[n=593]	[n=29]	[n=41]	[n=185]
PLOT-02	N _A	8			10		
	H _o	0,736			0,931		
	H _e	0,741			0,837		
PLOT-05	N _A	8			13		
	H _o	0,688			0,897		
	H _e	0,648			0,895		
PLOT-06	N _A	5			4		
	H _o	0,617			0,690		
	H _e	0,562			0,687		
PLOT-08	N _A	5			6		
	H _o	0,453			0,931		
	H _e	0,499			0,783		
PLOT-10	N _A	5			9		
	H _o	0,589			0,828		
	H _e	0,591			0,815		
PLO-M2	N _A	8	12	14		12	14
	H _o	0,773	0,818	0,830		0,825	0,872
	H _e	0,785	0,857	0,857		0,860	0,868
PLO-M3	N _A	4	5	6		7	8
	H _o	0,440	0,723	0,726		0,873	0,779
	H _e	0,453	0,751	0,738		0,765	0,782
PLO-M17	N _A	5	7	7		8	7
	H _o	0,787	0,736	0,770		0,714	0,720
	H _e	0,762	0,802	0,773		0,780	0,729
PLO2-123	N _A	3	12	12		12	14
	H _o	0,319	0,760	0,835		0,825	0,890
	H _e	0,325	0,867	0,835		0,866	0,873
PLO3-86	N _A	11	25	27		24	26
	H _o	0,829	0,877	0,896		0,921	0,780
	H _e	0,838	0,928	0,896		0,901	0,908

N_A = Allelanzahl, H_o = beobachtete Heterozygotie, H_e = erwartete Heterozygotie

3.2 Elternschaftsanalysen

In Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse der Elternschaftszuordnung aufgelistet. Aufgeführt sind nur Jungtiere, denen durch Übereinstimmung der Analysen mit CERVUS und den Kenntnissen aus den Freilandbeobachtungen des „Projekt Waschbär“ eindeutig ein Elternpaar zugeordnet werden konnte. Die Mutter stimmt in allen Fällen mit der Annahme aus den Beobachtungen überein. In einigen Fällen war die Mutter vorher nicht bekannt, aber die Zuordnung durch CERVUS war eindeutig, da die betreffenden Jungtiere im Gebiet der jeweiligen Fähe gefangen wurden und die von CERVUS alternativ ermittelten möglichen Mütter nicht in Frage kommen. Insgesamt konnten 59 von 79 Jungtieren (74,7 %) sicher ein Muttertier und ein Vatertier zugeordnet werden. In 24 Fällen wurden die Eltern im 95 % Vertrauensbereich zugeordnet, in 19 Fällen im 80 % und in 16 Fällen unter dem 80 % Vertrauensbereich.

In acht Fällen stimmte der Genotyp des Jungtieres an ein oder zwei Loci nicht mit den Genotypen der Eltern überein. Andere Tiere stimmten zwar an allen Loci mit dem Jungtier überein, konnten jedoch aufgrund der Kenntnisse aus den Freilandarbeiten als Elterntiere ausgeschlossen werden.

Die „parent non-exclusion probability“ und die „parent pair non-exclusion probability“ geben die Wahrscheinlichkeit an, mit der unverwandte Tiere nicht als Mutter oder Vater bzw. Elternpaar ausgeschlossen werden. In der Hälfte der Fälle liegt die parent non-exclusion probability unter 4 %, doch es werden auch sehr hohe Werte von über 20 % erreicht (ID 5008, ID 6030, ID 6042). Die parent pair non-exclusion probability ist in allen Fällen sehr gering.

Tabelle 3.3: Auflistung aller im Müritz-Nationalpark nachgewiesenen Jungtiere, denen durch Übereinstimmung der Analysen mit CERVUS und den Kenntnissen aus den Freilandarbeiten des „Projekt Waschbär“ eindeutig ein Elternpaar zugeordnet werden konnte.

Jungtier	Muttertier	Vatertier	Parent non-exclusion probability	Parent pair non-exclusion probability	Vertrauensbereich der Elternpaar-Zuordnung
45	2003	1005	2,79 %	< 0,01 %	*
46	2003	1005	2,45 %	< 0,01 %	*
47	2003	1005	1,99 %	< 0,01 %	*
48	2003	1005	3,10 %	< 0,01 %	
49	2003	1005	1,81 %	< 0,01 %	*
100	5011	1025	4,56 %	0,05 %	
2009	2004	1003	3,57 %	< 0,01 %	*
2010	2011	1002	9,57 %	< 0,01 %	+
2016	4004	1002	15,77 %	0,07 %	*
2017	2006	1002	13,28 %	0,01 %	
2018	2004	1003	10,57 %	< 0,01 %	+
5001	2004	1003	6,78 %	< 0,01 %	*
5002	2006	1002	7,94 %	0,04 %	

Jungtier	Muttertier	Vatertier	Parent non-exclusion probability	Parent pair non-exclusion probability	Vertrauensbereich der Elternpaar-Zuordnung
5003	2001	1005	1,60 %	< 0,01 %	*
5004	2002	1005	0,83 %	< 0,01 %	*
5005	2001	1006	15,01 %	0,15 %	+
5006	2001	1006	13,12 %	0,08 %	
5007	2011	1018	3,37 %	< 0,01 %	*
5008	2011	1002	22,15 %	0,03 %	+
5009	2011	1002	9,14 %	< 0,01 %	+
5011	2001	1006	10,71 %	0,06 %	+
5013	2019	1007	5,42 %	< 0,01 %	+
5014	2016	1014	11,95 %	0,03 %	*
5015	2015	1007	9,59 %	< 0,01 %	
5016	2005	1007	6,44 %	< 0,01 %	*
5017	2020	1003	2,16 %	< 0,01 %	+
5018	2018	5007	4,29 %	< 0,01 %	*
6003	2006	1002	6,34 %	0,02 %	+
6004	2001	1005	0,90 %	< 0,01 %	*
6005	2001	1005	3,87 %	< 0,01 %	+
6007	2002	1005	0,55 %	< 0,01 %	*
6008	2003	1003	9,21 %	< 0,01 %	+
6009	2003	1003	0,78 %	< 0,01 %	*
6010	2020	1003	0,80 %	< 0,01 %	*
6011	2019	1018	4,09 %	< 0,01 %	
6015	4004	1002	7,39 %	0,01 %	*
6021	2019	1007	0,99 %	< 0,01 %	*
6023	2019	1007	1,04 %	< 0,01 %	*
6024	2019	1007	1,92 %	< 0,01 %	+
6025	2006	1018	5,90 %	< 0,01 %	+
6030	2011	1002	25,79 %	0,03 %	
6032	2018	1005	3,28 %	< 0,01 %	+
6034	2018	1005	1,41 %	< 0,01 %	+
6036	2001	1025	9,86 %	< 0,01 %	
6037	2018	1005	8,29 %	< 0,01 %	+
6038	2020	1023	4,23 %	< 0,01 %	*
6039	2020	1006	5,34 %	0,02 %	+
6042	2012	1002	19,81 %	0,07 %	
6047	2019	1019	9,64 %	0,08 %	
6048	2018	5007	7,76 %	< 0,01 %	*
6050	5015	5007	0,77 %	< 0,01 %	*
6051	5015	3026	4,95 %	< 0,01 %	
6053	2019	1004	1,84 %	< 0,01 %	
6054	2019	1004	1,84 %	< 0,01 %	
6055	5015	5007	0,33 %	< 0,01 %	+
6056	4008	1002	9,82 %	< 0,01 %	
6057	5015	5007	3,99 %	0,02 %	
6058	4006	1026	0,95 %	< 0,01 %	*
6060	6031	1004	1,96 %	< 0,01 %	+

* = strict (95 %), + = relaxed (80 %), leeres Feld = < 80 %; grau = Mutter war nicht aus Beobachtungen bekannt

Die 20 Jungtiere, denen nur ein oder gar kein Elterntier sicher zugeordnet werden konnte, sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. In allen Fällen, in denen die Mutter ermittelt werden konnte, stimmt sie mit den Kenntnissen aus den Freilandarbeiten des „Projekt Waschbär“ überein. Für zwei Jungtiere kommen mehrere Tiere als Vater in Frage, die weder aufgrund der genetischen Daten noch durch die Beobachtungen als Elterntier ausgeschlossen werden können. In diesen Fällen wurden alle potentiellen Väter aufgeführt. Hier ist auch die parent non-exclusion probability vergleichsweise hoch. Zwölf Jungtieren konnte nur eine Mutter zugeordnet werden, da entweder keiner der beprobten Rüden eine ausreichende genetische Übereinstimmung zeigte, um diesen sicher als Vater zuzuordnen, oder genetisch zum Jungtier passende Rüden aufgrund der Beobachtungen als Vater ausgeschlossen wurden. Auffallend ist hier die hohe parent non-exclusion probability bei Jungtier 6017. Bei den Jungtieren 2014 und 6031 kommen die aufgeführten Rüden zwar als Vater in Frage, stimmen aber an zwei Loci nicht mit den Jungtieren überein. Da die Zuordnung also relativ unsicher ist, wurden diese Jungtiere nicht in der oberen Tabelle aufgeführt. Jungtier 6041 ist das einzige Tier, dem nur ein Vater zugeordnet werden konnte. Den Tieren 6043, 6044 und 2022 konnte weder eine Mutter noch ein Vater zugeordnet werden. Bei diesen Tieren handelt es sich wahrscheinlich um Einwanderer oder Durchzügler aus einem anderen Gebiet.

Tabelle 3.4: Liste aller im Müritz-Nationalpark nachgewiesenen Jungtiere, denen nur ein oder kein Elterntier zugeordnet werden konnte. Weitere Erläuterungen im Text.

Jungtier	Muttertier	Vatertier	Parent non-exclusion probability	Vertrauensbereich der Elternzuordnung
2014	2013	1016?	20,55 %	
2021	2012	unbekannt	9,69 %	*
2022	Einwanderer?			
5010	2005	unbekannt	4,67 %	*
5012	2001	unbekannt	1,45 %	
6017	4004	unbekannt	26,76 %	+
6018	4004	unbekannt	1,12 %	*
6020	2001	unbekannt	1,36 %	*
6028	2020	unbekannt	10,22 %	
6029	2020	unbekannt	6,61 %	
6031	2019	1022?	7,02 %	
6033	2020	unbekannt	8,25 %	
6035	2019	unbekannt	6,22 %	
6040	2020	1006 oder 1023	11,92 %	+
6041	unbekannt	1002	0,07 %	*
6043	Einwanderer/Durchzügler			
6044	Einwanderer/Durchzügler			
6046	2020	1025 oder 3026	10,60 %	
6049	2018	unbekannt	7,93 %	
6052	2018	unbekannt	1,57 %	*

* = strict (95 %), + = relaxed (80 %), leeres Feld = < 80 %

3.3 Individueller Fortpflanzungserfolg und Mehrfachvaterschaften

Auf der Basis der beiden oberen Tabellen folgt in Tabelle 3.5 eine Übersicht über die Elterntiere der einzelnen Würfe, geordnet nach den Fähen. Hieraus kann man ablesen, welche der Tiere sich nachweislich fortgepflanzt haben und mit welchem Erfolg. Insgesamt konnten für 20 der beprobten Fähen und 16 der beprobten Rüden eine Mutter- bzw. Vaterschaft nachgewiesen werden. Einige Fähen weisen eine vergleichsweise hohe Anzahl an Jungtieren auf, z. B. die Fähen 2001, 2019 und 2020. In 16 Fällen konnte einer Fähe nur ein Jungtier pro Jahr nachgewiesen werden. Bei den Rüden wurden für die Tiere 1005, 1002 und 1003 die meisten Vaterschaften ermittelt.

Fast alle Fähen haben sich in aufeinanderfolgenden Jahren mit unterschiedlichen Rüden gepaart. Ausnahmen sind die Fähen 2011, 2020 und 4004, bei denen Jungtiere aus verschiedenen Jahren denselben Vater besitzen. Bei einigen Rüden zeigt sich, dass sie sich im selben Jahr mit mehreren Fähen fortgepflanzt haben. Im Jahr 2006 hat sich Rüde 1005 nachweislich mit zwei verschiedenen bekannten Fähen fortgepflanzt (2001 und 2002), mit drei bekannten Fähen haben sich Rüde 1003 (mit 2003, 2004, 2020) und Rüde 1002 (mit 2006, 2011 und 4004) gepaart. Im Jahr 2007 haben sich die Rüden 1018 (mit 2006 und 2011), 1007 (mit 2005 und 2019) und 1002 (mit 2011 und 4004) mit je zwei bekannten Fähen fortgepflanzt. Im Jahr 2008 hat sich Rüde 1002 mit den Fähen 2011 und 2012 gepaart, Rüde 1005 mit den Fähen 2003 und 2018. Im Jahr 2009 konnte nur für den Rüden 5007 eine Vaterschaft in zwei verschiedenen Würfen (Fähe 2018 und Fähe 5015) nachgewiesen werden. Die Rüden 1002, 1003, 1005, 1007 und 1018 haben sich auf diese Weise mit Fähen unterschiedlicher Matrilinearitäten fortgepflanzt. In keinem Fall tritt die Paarung eines Rüden mit seiner Tochter auf.

In zehn Würfen (grau unterlegt) gibt es Hinweise auf eine Mehrfachvaterschaft. Bei den Fähen 2011, 2019 (Jahr 2009) und 5015 konnten alle Väter eindeutig ermittelt werden. Im Wurf ($n = 5$) der Fähe 2001 ist der Vater der Jungtiere 5012 und 6020 zwar unbekannt, aber Rüde 1006, welcher der Vater der drei Geschwister (5005, 5006, 5011) ist, kann als Vater ausgeschlossen werden. Ebenso ist im Wurf ($n = 4$) der Fähe 2018 der Vater der Jungtiere 6049 und 6052 unbekannt, aber Rüde 5007 (Vater der Geschwister 5018 und 6048) kann nicht der Vater dieser Tiere sein. In den Würfen der Fähen 2005, 2019 (Jahr 2008), 2020 und 4004 kann jeweils ausgeschlossen werden, dass alle Jungtiere denselben Vater haben.

Tabelle 3.5: Übersicht über die Elterntiere der im Untersuchungszeitraum (2006 - 2010) im Müritz-Nationalpark beprobten Würfe, geordnet nach Fähen und Geburtsjahr der Jungtiere. Die graue Unterlegung bei den Rüden weist auf eine Mehrfachvaterschaft hin.

Fähen	Rüden	Jungtiere	Jahr	
2001	1005	5003	2006	
	1005	6004		
	1005	6005		
	1006	5005	2007	
	1006	5006		
	1006	5011		
	unbekannt	5012		
	unbekannt	6020		
1025	6036	2008		
2002	1005	5004	2006	
	1005	6007		
2003	1003	6008	2006	
	1003	6009		
	1005	45	2008	
	1005	46		
	1005	47		
	1005	48		
1005	49			
2004	1003	2009	2006	
	1003	2018		
	1003	5001		
2005	unbekannt	5010	2007	
	1007	5016		
2006	1002	2017	2006	
	1002	5002		
	1002	6003		
	1018	6025		2007
2011	1002	2010	2006	
	1018	5007	2007	
	1002	5008		
	1002	5009		
	1002	6030	2008	
2012	unbekannt	2021	2006	
	1002	6042	2008	
2013	1016?	2014	2006	
2015	1007	5015	2007	
2016	1014	5014	2007	
2018	1005	6032	2008	
	1005	6034		
	1005	6037		
	5007	5018		2009
	5007	6048		
	unbekannt	6049		
unbekannt	6052			

Fähen	Rüden	Jungtiere	Jahr
2019	1018	6011	2006
	1007	5013	2007
	1007	6021	
	1007	6023	
	1007	6024	
	1022	6031	2008
	unbekannt	6035	
	1019	6047	2009
	1004	6053	
	1004	6054	
2020	1003	6010	2006
	1003	5017	2007
	unbekannt	6028	
	unbekannt	6029	
	unbekannt	6033	
	1023	6038	2008
	1006	6039	
	1006 oder 1023	6040	
1025 oder 3026	6046		
4004	1002	2016	2006
	1002	6015	2007
	unbekannt	6017	
	unbekannt	6018	
4006	1026	6058	2010
4008	1002	6056	2009
5011	1025	100	2009
5015	5007	6050	2009
	3026	6051	
	5007	6055	
	5007	6057	
6031	1004	6060	2010

3.4 Matrilinien

Zum Nachweis, dass sich durch die Philopatrie der Fähen Matrilinien ausbilden, erfolgte ein Vergleich der mit KINGROUP ermittelten paarweisen r -Werte innerhalb der Gruppe der Rüden und der Fähen mit dem t -Test. Abbildung 3.1 zeigt den Boxplot der r -Werte von Rüden und Fähen. Die Spannweite ist in beiden Gruppen gleich, doch der Mittelwert der r -Werte liegt bei den Fähen (0,0472) höher als bei den Rüden (-0,0140). Im t -Test wird ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den Werten festgestellt. Dies zeigt eindeutig, dass die Fähen untereinander näher verwandt sind als die Rüden.

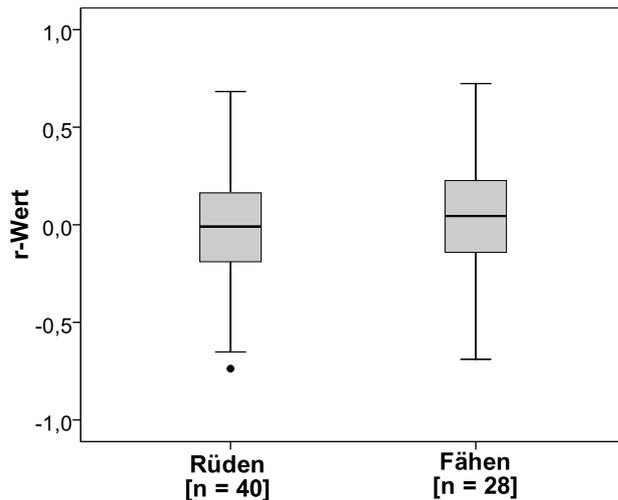


Abbildung 3.1: Boxplot des Vergleichs der paarweisen r-Werte adulter Rüden und Fähen aus dem Müritz-Nationalpark.

Die von GenAlEx ermittelten AI_c -Werte von Rüden und Fähen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede untersucht. In Abbildung 3.2 kann man erkennen, dass der Mittelwert der AI_c -Werte bei den Rüden (-0,355) deutlich unter dem der Fähen (0,52) liegt. Der U-Test zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten von Rüden und Fähen ($U = 373$, $p = 0,014$).

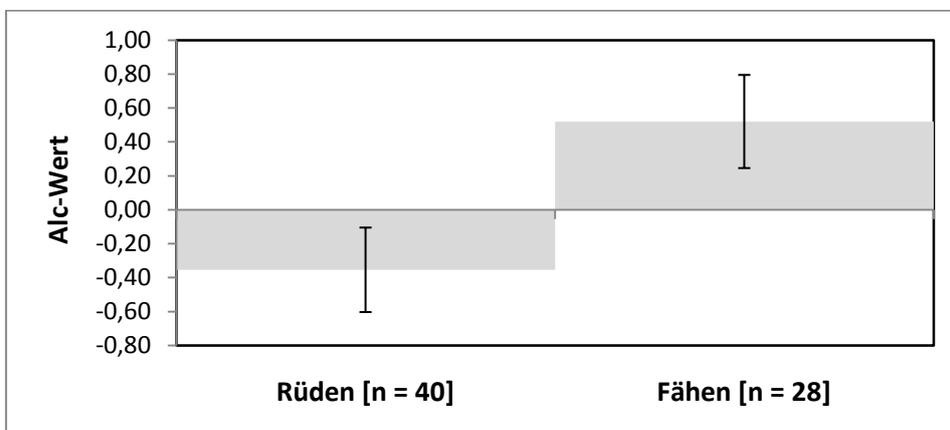


Abbildung 3.2: Vergleich der AI_c -Werte adulter Rüden und Fähen aus dem Müritz-Nationalpark.

Die Abbildung 3.3 zeigt ein Histogramm der von GenAlEx ermittelten AI_c -Werte für Fähen und Rüden. Aus dem Diagramm kann man erkennen, dass bei der Mehrzahl der Fähen der AI_c -Wert im positiven Bereich liegt, während bei der Mehrzahl der Rüden die AI_c -Werte im negativen Bereich liegen. Bei beiden Geschlechtern gibt es jedoch auch Ausnahmen. So zeigen einige Fähen deutlich negative (Minimum -2,81) und einige Rüden deutlich positive (Maximum 2,674) AI_c -Werte. Dies lässt zum einen darauf schließen, dass einige Rüden ihr

Revier nahe ihrem Geburtsgebiet etablieren. Zum anderen wird der Anschein erweckt, dass auch einige Fähen abwandern.

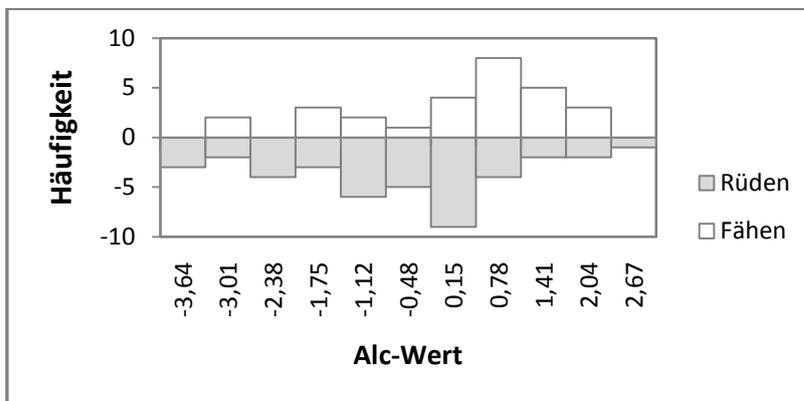


Abbildung 3.3: Histogramm der AI_c -Werte adulter Rüden und Fähen aus dem Müritz-Nationalpark.

Zur Feststellung, ob bei den Fähen ein Zusammenhang zwischen genetischer und geographischer Distanz vorliegt, wurde in GenAlEx ein Mantel-Test mit den paarweisen genetischen und geographischen Distanzen durchgeführt. Wie Abbildung 3.4 verdeutlicht, ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen geographischer und genetischer Distanz ($R_{xy} = 0,025$, $p = 0,31$).

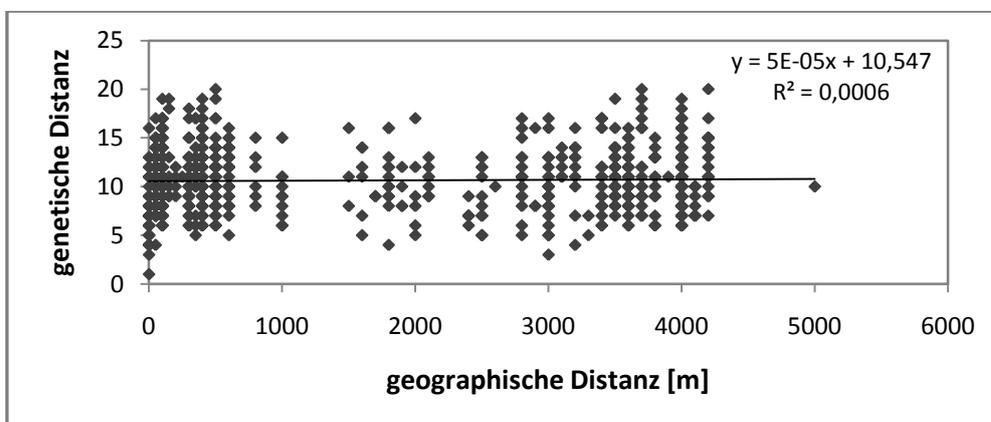


Abbildung 3.4: Beziehung zwischen genetischer und geographischer Distanz bei adulten Fähen [$n = 41$] im Müritz-Nationalpark.

3.5 Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Koalitionen der Rüden

Es sollte getestet werden, ob Koalitionsrüden einen engeren Verwandtschaftsgrad besitzen als Rüden, die nicht in einer Koalition leben. Die Rüden können drei unterschiedlichen Typen von Bündnissen zugeordnet werden. Es gibt die festen Koalitionen, welche stets aus zwei Rüden bestehen, die über eine Saison eine feste Bindung zueinander aufweisen. Daneben treten

temporäre Koalitionen auf, die ebenfalls aus zwei Rüden bestehen, welche aber eine eher lockere soziale Bindung zueinander besitzen. Als dritten Typ gibt es Gruppenterritorien, die drei oder mehr Rüden umfassen, deren Aktionsräume überlappen, die aber untereinander nur lockere Bündnisse ausbilden (Michler in prep.).

Abbildung 3.5 zeigt den Boxplot der r-Werte der vier untersuchten Gruppen. Das 75 %-Perzentil ist in allen Gruppen sehr ähnlich (Mittelwert 0,12). Beim Median zeigen sich jedoch kleinere Abweichungen zwischen den Gruppen. Nur bei den temporären Koalitionen liegt der Median leicht im positiven Bereich. Bei den anderen Gruppen nimmt er dagegen negative Werte an und liegt bei den engen Koalitionen vergleichsweise tief. Bei den Gruppenterritorien ist die Spannweite zwischen dem größten und dem kleinsten r-Wert im Vergleich zu den anderen beiden Bündnistypen sehr groß. Bei den engen Koalitionen ist die Spannweite dagegen am kleinsten und der höchste r-Wert liegt nur bei 0,25. Die r-Werte innerhalb der temporären Koalitionen erreichen Werte von bis zu 0,35 und liegen damit in einem Bereich naher Verwandtschaft. Auffällig ist auch der Ausreißer bei den temporären Koalitionen, der auf eine besonders enge Verwandtschaft zweier Rüden hinweist.

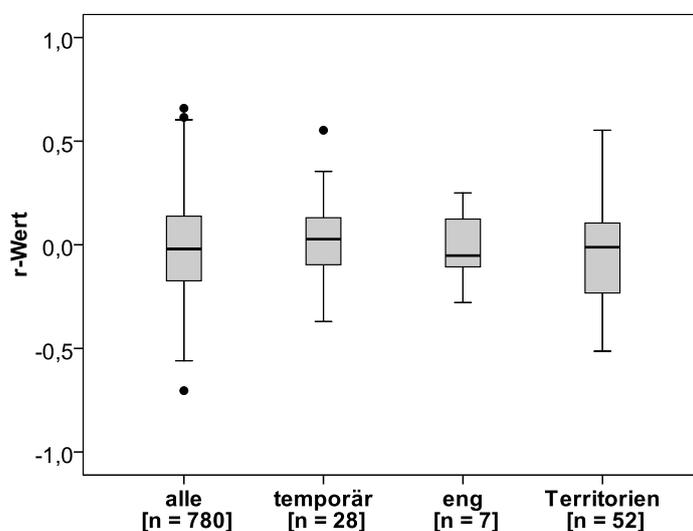


Abbildung 3.5: Boxplot zum Vergleich der r-Werte aller Rüden sowie der unterschiedlichen im Müritznationalpark beobachteten Bündnistypen. n gibt die Anzahl der paarweisen Vergleiche in jeder Fallgruppe an.

Um festzustellen, ob die im Boxplot ersichtlichen Unterschiede zwischen den r-Werten der vier Gruppen signifikant sind, wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Keine der vier Gruppen zeigt einen signifikanten Unterschied zu einer anderen Gruppe ($p = 0,676$).

3.6 Fortpflanzungserfolg und Zugehörigkeit zu einer Koalition

Es sollte geklärt werden, wie sich die Zugehörigkeit zu einer festen Koalition auf den Fortpflanzungserfolg eines Rüden auswirkt. Um eine Aussage über die Verteilung der Anzahl an Vaterschaften innerhalb einer Koalition zu treffen, sind in Tabelle 3.6 alle Koalitionen aufgelistet, die für eine Interpretation des Fortpflanzungserfolges im jeweiligen Jahr relevant sind. Alle anderen Rüden lebten in lockeren oder keinen Bündnissen.

Auffällig ist in Tabelle 3.6, dass sich immer nur einer der in Koalition lebenden Rüden fortgepflanzt hat, während für den Koalitionspartner in keinem Fall eine Vaterschaft nachgewiesen werden konnte. In manchen Koalitionen ist der erfolgreiche Koalitionspartner der ältere Rüde, in anderen Koalitionen der jüngere Rüde. Bei den Rüden 1003, 1005 und 1017 zeigt sich zudem, dass sie in aufeinanderfolgenden Jahren unterschiedliche Koalitionspartner hatten.

Tabelle 3.6: Übersicht über den Fortpflanzungserfolg der an einer festen Koalition beteiligten Rüden. Die Koalitionen hatten jeweils bis zur Ranz des genannten Jahres bestand. Der ältere Rüde ist immer zuerst aufgeführt.

Jahr der Ranz	Koalition	Anzahl Jungtiere
2007	1003	1
	1005	0
2008	1003	0
	1006	1
	1005	8
	1017	0
2009	1005	0
	1025	1
	1017	0
	5007	5

Zum Vergleich des Fortpflanzungserfolgs zwischen Koalitionsrüden und Rüden, die in lockeren Bündnissen leben, enthält Tabelle 3.7 eine Übersicht, wie viele Jungtiere den Rüden in den einzelnen Jahren zugeordnet werden konnten sowie die Anzahl der Fähen, von denen die Jungtiere stammen. Die Koalitionsrüden sind durch kursive Schrift kenntlich gemacht. In den Jahren 2008 und 2009 entfällt die größte Anzahl an Jungtieren auf einen in Koalition lebenden Rüden. Daneben gibt es in diesen Jahren aber auch einen Rüden, der trotz Zugehörigkeit zu einer Koalition keinen großen Fortpflanzungserfolg zeigt. So weisen im Jahr 2007 fast alle Rüden, die nicht Teil eines Bündnisses waren, eine größere Anzahl an Jungtieren auf als der Koalitionsrüde. Es lässt sich folglich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Koalitionszugehörigkeit und Fortpflanzungserfolg feststellen. Damit übereinstimmend zeigt auch ein

Vergleich der Durchschnittlichen Anzahl an Jungtieren je Rüde, dass auf Koalitionsrüden im Mittel etwa ein Jungtier mehr entfällt ($3,2$ Jungtiere $\pm 1,4$) als auf nicht-Koalitionsrüden (2 Jungtiere $\pm 0,4$), doch es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (t-Test, $p > 0,05$). Berücksichtigt wurden nur Rüden, die mindestens einen Nachkommen hatten. Bei der Anzahl der Verpaarungen zeigt sich, dass sich Rüden, die nicht in einer Koalition lebten, mit genauso vielen oder sogar mehr Fähen erfolgreich fortgepflanzt haben, wie Koalitionsrüden. So haben sich im Jahr 2007 einige nicht-Koalitionsrüden mit mehr Fähen erfolgreich gepaart als der Koalitionsrüde. Daneben treten in allen Jahren aber auch viele nicht-Koalitionsrüden auf, die sich nur mit einer Fähe erfolgreich fortgepflanzt haben. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Koalitionszugehörigkeit und der Anzahl erfolgreicher Verpaarungen lässt sich somit nicht erkennen. Entsprechend ergibt auch der U-Test keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$) zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich der Anzahl erfolgreicher Verpaarungen. Das Jahr 2006 wurde nicht in die Berechnungen einbezogen, da die Freilandarbeiten in diesem Jahr erst nach der Reproduktionsphase begannen und deshalb noch keine Daten über bestehende Koalitionen vorlagen.

Tabelle 3.7: Übersicht über den Fortpflanzungserfolg der einzelnen Rüden im Müritz-Nationalpark in den vier Untersuchungsjahren. Rüden, die in einer festen Koalition lebten, sind kursiv gedruckt.

Jahr	Rüde	Anzahl Jungtiere	Anzahl Verpaarungen
2006	1002	5	3
	1003	6	3
	1005	5	2
	1016	1	1
	1018	1	1
2007	1002	3	2
	<i>1003</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
	1006	3	1
	1007	6	3
	1014	1	1
2008	1018	2	2
	1002	3	3
	<i>1005</i>	<i>8</i>	<i>2</i>
	<i>1006</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
	1022	1	1
2009	1023	1	1
	1025	1	1
	1002	1	1
	1004	2	1
	1019	1	1
	<i>1025</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
3026	1	1	
<i>5007</i>	<i>5</i>	<i>2</i>	

3.7 Vergleich von DNA-Extrakten aus Haar- und Speichelproben

In 22 Fällen wurde die DNA aus Haarproben extrahiert, in 7 Fällen aus Speichelproben. Die durchschnittliche DNA-Konzentration des Extraktes war bei den Speichelproben mit $8 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 3,3$ etwas geringer als bei den Haarproben mit $13,3 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 2,2$. Sowohl die DNA-Konzentration der Haar- als auch die DNA-Konzentration der Speichelproben unterscheidet sich damit signifikant (U-Test, $p < 0,001$) von der DNA-Konzentration der Gewebeproben ($96,7 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 9,5$). In der Reinheit des DNA-Extraktes gab es dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen Gewebe-, Haar- und Speichelproben.

Mit der aus Speichelproben extrahierten DNA konnte kein Tier vollständig genotypisiert werden, da der längste Mikrosatellit (PLO2-123) in keinem Fall amplifiziert wurde. Je drei Tiere konnten an neun bzw. acht Loci genotypisiert werden, ein Tier nur an sechs Loci. Mit der aus Haarproben extrahierten DNA konnten dagegen 20 Tiere an allen Loci genotypisiert werden. Ein Tier konnte nur an neun, ein anderes nur an sieben Loci genotypisiert werden.

Von sieben Tieren lagen sowohl Haar- als auch Speichelproben vor. Hier können die Ergebnisse der Genotypisierung direkt verglichen werden. Bei sechs Tieren stimmte der mit der DNA aus Haarproben ermittelte Genotyp mit dem aus Speichelproben ermittelten Genotyp an allen Loci überein, wobei die DNA-Konzentration bei den Haarproben stets höher war als bei den Speichelproben. Bei einem Tier stimmte der Genotyp zwischen Haar- und Speichelprobe an einem Locus nicht überein. Bei der Haarprobe wurden in allen drei Wiederholungen beide Allele des heterozygoten Tieres amplifiziert, bei der Speichelprobe immer nur eines der Allele. Haar- und Speichelprobe besaßen in diesem Fall die gleiche DNA-Konzentration von etwa $6 \text{ ng}/\mu\text{l}$. In einem weiteren Fall lagen von einem Tier eine Haar- und eine Gewebeprobe zum Vergleich vor. Der Genotyp des Tieres stimmte bei Haar- und Gewebeprobe an allen Loci überein, obwohl die Haarprobe eine eher geringe DNA-Konzentration von etwa $3,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ besaß.

4. Diskussion

4.1 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Waschbären wurden Mikrosatelliten verwendet, da diese aufgrund ihrer biparentalen Vererbung besonders geeignet für Elternschaftsanalysen sind. Mikrosatelliten weisen im Vergleich zu anderen Bereichen des Genoms zwar eine höhere Mutationsrate auf, diese ist allerdings immer noch so gering, dass selbst große Datensätze nur wenige Mutationen enthalten, welche zu einer Inkompatibilität zwischen den Genotypen der Eltern und Jungtiere führen (Ellegren 2000, Jones und Ardren 2003). Mikrosatelliten sind empfindlich gegenüber geringer Quantität und Qualität der DNA, wie dies bei DNA-Extrakten aus Haaren oder Speichel vorkommt (Broquet et al. 2006). Durch Allelic dropout und die Amplifikation von Artefakten kann es zu Fehlern bei der Genotypisierung von Individuen kommen (Taberlet et al. 1999, Blouin 2003). Um diese Fehler erkennen zu können, wurden PCR und Fragmentlängenanalyse in dreifacher Wiederholung ausgeführt. Eine größere Anzahl an Genotypisierungsfehlern kann ausgeschlossen werden, da diese zu einer signifikanten Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht führen (Jones und Ardren 2003), was an keinem der zehn Loci beobachtet wurde. Auch die Übereinstimmung der Genotypen der sieben durch Haar- und Speichelproben genotypisierten Individuen zeigt, dass sich auch mit geringem DNA-Gehalt des Extraktes sichere Ergebnisse erzielen lassen. Schließlich ist es unwahrscheinlich, dass bei zwei auf unterschiedliche Weise gewonnenen Proben die gleichen Genotypisierungsfehler auftreten.

In den meisten Fällen wurde die DNA aus Gewebeproben extrahiert, weshalb der DNA-Extrakt dieser Proben eine hohe DNA-Konzentration besaß. Hier spielen eigentliche Genotypisierungsfehler kaum eine Rolle. Falsche Genotypen können dennoch durch Laborfehler, wie vor allem einer fehlerhaften Interpretation der Peaks bei der Auswertung der Elektropherogramme, entstehen. Das Auftreten von fehlerhaften Genotypen kann also weder bei Haar- und Speichelproben noch bei Gewebeproben völlig ausgeschlossen werden. Deshalb wurden Individuen nicht von vornherein als Eltern ausgeschlossen, wenn sie an einem Locus nicht mit dem Jungtier übereinstimmten.

4.2 Genotypisierungserfolg mit DNA aus Haar- und Speichelproben im Vergleich

Vor allem mit der aus Haarproben gewonnenen DNA ließen sich bei der Genotypisierung gute Ergebnisse erzielen. So konnten fast alle Tiere vollständig genotypisiert werden. Deutlich schlechtere Ergebnisse wurden mit der aus Speichel extrahierten DNA erreicht. Hier

konnte kein Tier an allen Loci genotypisiert werden, da vor allem die längeren Mikrosatelliten nicht amplifiziert wurden. Dies lässt darauf schließen, dass die aus Speichel extrahierte DNA in Folge der Lagerung in stärkerem Maße degradiert ist als die aus Haarwurzeln gewonnene DNA.

Beim Vergleich der Genotypen von Tieren, für die sowohl eine Haar- als auch eine Speichelprobe vorlag, wurde bei einer Speichelprobe ein Allelic dropout an einem Locus festgestellt. Auch in einer Studie von Gagneux et al. (1997) zu Genotypisierungsfehlern bei DNA aus nicht-invasiv gewonnenen Proben war Allelic dropout vor allem ein Problem bei DNA-Extrakten aus Speichelproben sowie einzelnen Haaren. Durch die Verwendung von mindestens 60 Haarfollikeln je Tier in der DNA-Extraktion sollte der DNA-Gehalt des Extraktes maximiert und somit das Auftreten von Genotypisierungsfehlern, wie Allelic dropout, einem der Hauptprobleme bei der Genotypisierung mit Mikrosatelliten bei geringem DNA-Gehalt (Bellemain et al. 2005), reduziert werden.

Nur von einem Tier lag eine Gewebeprobe zum Vergleich mit der Haarprobe vor. Mit der aus der Haarprobe gewonnenen DNA konnte das Tier vollständig genotypisiert werden und die Ergebnisse stimmten an allen Loci mit dem Genotyp der Gewebeprobe überein, obwohl die Haarprobe eine eher geringe DNA-Konzentration aufwies. Dieses Beispiel zeigt, dass sich auch mit der DNA aus Haarproben sichere Ergebnisse erzielen lassen. Allerdings kann aus diesem einen Fall nicht auf eine fehlerfreie Genotypisierung aller Individuen, für die nur Haarproben vorlagen, geschlossen werden.

4.3 Auswertung mit den Programmen CERVUS und KINGROUP

Da die zehn verwendeten Loci im Vergleich mit anderen Populationen einen eher moderaten Polymorphiegrad aufweisen, stellt sich die Frage, wie gut die genetischen Daten für die Elternschaftszuordnung mit CERVUS und die Verwandtschaftsanalyse mit KINGROUP geeignet sind. Delgado et al. (2008) haben in Zuge ihrer Studie zu Vaterschaften in einer Wildschweinpopulation den Erfolg anderer Studien bei der Elternschaftszuordnung verglichen und festgestellt, dass weniger als zehn Marker bzw. weniger informative Marker ausreichen, um Elternschaft und sogar Mehrfachvaterschaften mit einer ausreichenden Sicherheit nachzuweisen. Ein Problem in der vorliegenden Arbeit war jedoch das Auftreten von Geschwistern und unverwandten adulten Tieren mit ähnlichem Genotyp wie die wahren Eltern. Jene wurden von CERVUS oft fälschlicherweise als die wahrscheinlichsten Eltern angegeben und konnten nur aufgrund der Kenntnisse aus den Freilandbeobachtungen des „Projekt Waschbär“ als Eltern ausgeschlossen werden. Dies verdeutlicht, dass die zehn verwendeten Loci aufgrund der rela-

tiv geringen genetischen Diversität nicht in allen Fällen ausreichend waren, um die richtigen Eltern zuzuordnen. Für eine rein auf genetischen Daten basierende Elternzuordnung ohne Ergänzung durch Beobachtungen müssten also noch mehr Marker verwendet werden, um eine größtmögliche Sicherheit der Zuordnung zu erreichen.

Ein Vorteil von CERVUS ist, dass das Programm bei entsprechender Parametereingabe Genotypisierungsfehler bei der Zuordnung der Eltern berücksichtigt. So werden Tiere nicht von vornherein als Eltern ausgeschlossen, wenn sie an einem Locus nicht mit dem Jungtier übereinstimmen, und die Elternzuordnung liegt dennoch im angegebenen Vertrauensbereich. Als Parameterwert für die Fehlerrate bei der Genotypisierung wurde der voreingestellte Wert von 1 % beibehalten, da Vergleichswerte aus anderen Studien etwa in diesem Bereich lagen. So geben Fernando et al. (2003) die Fehlerrate bei aus Blut extrahierter DNA mit 0,4 % an. Gagneux et al. (1997) berechneten in ihrer Untersuchung eine Fehlerrate von < 1 % bei aus mehreren Haarfollikeln extrahierter DNA. Der in CERVUS eingegebene Parameterwert für den Anteil fehlerhafter Genotypen wirkt sich auf die Berechnung des kritischen Δ -Wertes und damit auf den Vertrauensbereich, in dem die Zuordnung eines Elterntieres liegt, aus. Für die vorliegende Untersuchung lagen bereits Kenntnisse über mögliche Elterntiere vor und der Vertrauensbereich war somit nicht das alleinige Kriterium für eine sichere Zuordnung. Darum war der Einbezug von Genotypisierungsfehlern in die Analysen wichtiger als deren exakter Anteil.

In KINGROUP sind keine Eingaben zu fehlerhafter Genotypisierung möglich. Deshalb kann es vorkommen, dass aufgrund von Genotypisierungsfehlern die Verwandtschaft zweier Individuen über- oder unterschätzt wird. Laut Blouin (2003) benötigt man 30 bis 40 Mikrosatelliten um mit Programmen wie KINGROUP den r -Wert zweier Individuen sicher zu ermitteln. Mit weniger Loci sollte es aber möglich sein, den durchschnittlichen r -Wert einer Gruppe mit ausreichender Sicherheit zu bestimmen. Statistische Tests, welche die Mittelwerte verschiedener Gruppen vergleichen, können also angewandt werden.

4.4 Genetische Diversität

Die Ergebnisse machen deutlich, dass die untersuchte Population im Vergleich zu den Populationen aus den USA und Kanada, dem ursprünglichen Verbreitungsgebiet der Waschbären (Gehrt 2003), eine geringere genetische Diversität aufweist. So ist die Anzahl der Allele an fast allen untersuchten Loci geringer als in den anderen Populationen. Selbst in den Fällen, in denen die Anzahl beprobter Individuen kleiner war, wurden in den Vergleichspopulationen

mehr Allele nachgewiesen. An fast allen Loci liegen zudem die beobachtete und die erwartete Heterozygotie unter den Vergleichswerten. An drei der verwendeten Loci ist weniger als die Hälfte der Tiere heterozygot. Die geringere genetische Diversität der Population im Müritz-Nationalpark ist auf die kleine Anzahl der Individuen der Gründerpopulation zurückzuführen. Da sich an keinem der zehn Loci eine signifikante Abweichung zwischen beobachteter und erwarteter Heterozygotie zeigt, befindet sich die Waschbärpopulation im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Sie erfüllt damit die für das Zustandekommen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts notwendigen Voraussetzungen wie Panmixie, eine große, geschlossene Population mit keiner bzw. vernachlässigbarer Migration, Mutation und Selektion (Frankham et al. 2003).

4.5 Elternschaftszuordnung

Für die folgende Diskussion ist die Kenntnis von Bedeutung, dass es im Zuge der Freilandarbeiten des „Projekt Waschbär“ gelungen ist, während des gesamten Untersuchungszeitraumes nahezu alle etablierten Waschbären des Untersuchungsgebietes zu beproben (Michler in prep.). Der hohe Erfassungsgrad schafft ideale Voraussetzungen für eine Elternschaftsanalyse. Mehr als der Hälfte der Jungtiere konnten mit CERVUS beide Elterntiere innerhalb des vorgegebenen Vertrauensbereichs zugeordnet werden. Der Abgleich mit den Kenntnissen aus den Freilandarbeiten des „Projekt Waschbär“ bestätigte zudem die Richtigkeit der Zuordnung. Bei allen Zuordnungen unter 80 % Vertrauensniveau wurden von CERVUS falsche Elternkandidaten als wahrscheinlichste Eltern zugeordnet, weshalb das wahre Elternpaar im Vertrauensniveau unter 80 % liegt. Die falschen Eltern konnten nur aufgrund der Beobachtungen ausgeschlossen werden. Zu einer fehlerhaften Elternzuordnung kommt es, da einige Tiere ähnliche Genotypen wie die wahren Eltern aufweisen. Die geringe genetische Diversität der Population und die daraus resultierende enge Verwandtschaft vieler Individuen erschweren folglich eine eindeutige Elternschaftszuordnung. Des Weiteren zeigte sich, dass in einigen Fällen der Genotyp des Jungtieres nicht an allen Loci mit den Genotypen der Eltern übereinstimmte. Hier liegt wahrscheinlich eine fehlerhafte Genotypisierung vor, die dazu führt, dass den wahren Eltern eine geringere Wahrscheinlichkeit der Elternschaft zugewiesen wird. Eine Zuordnung innerhalb eines bestimmten Vertrauensbereichs gibt aufgrund dieser Probleme also nicht alleinige Sicherheit über die Richtigkeit der Elternzuordnung.

Obwohl in allen Fällen in Tabelle 3.3 und 3.4 die Elternzuordnung als sicher betrachtet werden kann, treten bei der parent non-exclusion probability teilweise hohe Werte auf. Diese kommen zustande, da aufgrund der vergleichsweise geringen genetischen Diversität der Popu-

lation Tiere mit ähnlichen Genotypen auftreten und die zehn Loci in diesen Fällen nicht ausreichen, um falsche Eltern auszuschließen. Der hohe Wert der parent non-exclusion probability bei Jungtier 6017 erklärt sich damit, dass dieses Tier nur an sieben Loci genotypisiert werden konnte. Hierdurch fallen drei Loci weg, anhand derer Elternkandidaten ausgeschlossen werden können, weshalb automatisch mehr Tiere als Eltern in Frage kommen.

Einigen Jungtieren konnte aus verschiedenen Gründen nur ein oder gar kein Elterntier sicher zugeordnet werden. In manchen Fällen ist die Zuordnung der Mutter sicher, für den Vater kommen aber mehrere Tiere in Frage. Die möglichen Väter passen genetisch auch in Kombination mit der sicheren Mutter gleich gut zum jeweiligen Jungtier. Auch durch die Beobachtungen konnte kein Tier ausgeschlossen werden, da beide Zugang zu der sicher zugeordneten Fähe hatten. In diesen Fällen wären mehr genetische Marker notwendig gewesen, um ein Tier als Elterntier zuzuordnen.

In vielen Fällen konnte die Mutter sicher zugeordnet werden, aber unter den beprobten Rüden konnte kein passender Vater ausfindig gemacht werden. Einige Rüden passen zwar genetisch zu den Jungtieren, wurden aber aufgrund der Freilandbeobachtungen als Vater ausgeschlossen, da sie nicht im Gebiet des Muttertieres lebten oder schon vor der jeweiligen Reproduktionsphase verendet waren. Alle im Gebiet der Mutter lebenden Rüden, unter denen der Vater der Jungtiere vermutet wurde, konnten in diesen Fällen aufgrund der genetischen Daten sicher als Vater ausgeschlossen werden. In allen Fällen sind die genetischen Unterschiede zwischen dem vermuteten Vater und dem Jungtier so groß, dass sie nicht allein durch eine fehlerhafte Genotypisierung erklärt werden können. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen passender Väter ist, dass die Jungtiere von Rüden stammten, die während der Reproduktionsphase im Rahmen von Exkursionen in das Untersuchungsgebiet emigrierten und dieses wieder verlassen haben und nicht beprobt wurden.

Jungtier 6031 wurde der Rüde 1022 als Vater zugeordnet, obwohl er an zwei Loci nicht mit dem Jungtier übereinstimmt. Da die betreffenden Loci bei den übrigen Tieren nicht auffallend anfällig für eine fehlerhafte Genotypisierung waren, ist die Zuordnung des Vaters in diesem Fall eher unsicher. Da der Rüde aber im Gebiet der Mutter lebt wurde er dennoch als möglicher Vater aufgeführt. Gleiches gilt für Jungtier 2014 und Rüde 1016.

Jungtier 6041 war zwar mit einer Fähe (ID 2012) regelmäßig auf Bildern einer Fotofalle zu sehen, doch diese Fähe konnte anhand der genetischen Daten sicher als Mutter ausgeschlossen werden. Auch bei anderen möglichen Müttern stimmten die Genotypen von Jungtier und Fähe nicht überein. Außerdem wäre mit den betreffenden Fähen der Rüde 1002 nicht mehr als Va-

ter in Frage gekommen, obwohl er sehr sicher der Vater ist. Aus diesen Gründen wurde die Mutter als unbekannt angegeben.

Bei den Jungtieren 6043 und 6044 handelt es sich um junge Rüden, die im November bzw. Dezember gefangen wurden. Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Tieren um Einwanderer oder Durchzügler aus einem anderen Gebiet handelt, da juvenile Rüden bereits im Herbst beginnen aus ihrem Geburtsgebiet abzuwandern (Cullingham et al. 2008, Michler und Köhneemann 2010). Ob die Fähe 2022 tatsächlich in das Untersuchungsgebiet eingewandert ist ist fraglich, da für Fähen nie eine Wanderung über größere Distanzen nachgewiesen wurde (Michler und Köhneemann 2010).

Insgesamt konnten 95 % (n = 75) aller Jungtiere eine Mutter und 78 % (n = 62) ein Vater zugeordnet werden. Der Erfolg der Elternschaftsanalyse mit CERVUS liegt damit deutlich über dem der vergleichbaren Studie von Hauver (2008) mit 36 % zugeordneten Müttern und 27 % zugeordneten Vätern und der Studie von Roy Nielsen und Nielsen (2007) mit 49 % zugeordneten Müttern und 37 % zugeordneten Vätern. Es konnten mehr Mütter als Väter zugeordnet werden, da einige Rüden aufgrund ihrer Wanderungen das Untersuchungsgebiet wieder verlassen haben, bevor sie beprobt werden konnten. Dagegen konnten offensichtlich von fast allen Fähen, die aufgrund der Philopatrie dauerhaft im Untersuchungsgebiet lebten, Proben genommen werden.

4.6 Individueller Fortpflanzungserfolg

In der Übersicht der Eltern der einzelnen Würfe in Tabelle 3.5 wird deutlich, dass sich sowohl Rüden als auch Fähen während der Ranz mit mehreren Partnern paaren. Auf welchen Anteil der Tiere dies zutrifft lässt sich aus den genetischen Daten nicht erkennen. Grundsätzlich kann man bei der untersuchten Population aber nicht mehr von einem rein polygynen sondern durchaus von einem promiskuitiven Paarungssystem sprechen, wie es auch in anderen Populationen beobachtet wurde (Gehrt und Fritzell 1997, Roy Nielsen und Nielsen 2007).

Die unterschiedliche Anzahl an Jungtieren erklärt sich bei den Fähen neben dem unterschiedlichen Alter und unterschiedlich langer Lebensdauer dadurch, dass nicht immer alle Jungen eines Wurfes beprobt wurden. So besteht bei vielen Fähen der Wurf nur aus einem Jungtier, während die Angaben über die durchschnittliche Wurfgröße bei Waschbären in freier Wildbahn zwischen 2,5 und 3,5 Jungen pro Wurf liegen (Hohmann und Bartussek 2005). Die

Jungtiere wurden also entweder nicht gefangen oder sind verendet, bevor sie beprobt werden konnten, da die Mortalität bei jungen Waschbären hoch ist (Gehrt 2003).

Auch bei den Rüden spielt die Lebensdauer und damit die Zahl der erlebten Ranzzeiten sowie die Aufenthaltsdauer im Untersuchungsgebiet eine Rolle bei der Anzahl der Vaterschaften. So handelt es sich bei den Rüden 1005, 1003 und 1002, für welche die meisten Vaterschaften nachgewiesen wurden, um Tiere mit langer Lebensdauer, die sich schon lange im Untersuchungsgebiet befinden. Eine unterschiedliche Anzahl an Vaterschaften kann aber auch ein Hinweis auf die Dominanz eines Rüden innerhalb einer Koalition oder eines Gruppenterritoriums sein. So hat sich immer nur einer der an einer Koalition beteiligten Rüden fortgepflanzt, was auf das Bestehen einer Rangordnung hindeutet. Allerdings entfiel der Fortpflanzungserfolg nicht in allen Fällen auf den älteren und damit vermuteten dominanten Rüden. Das Vorhandensein einer Hierarchie lässt sich aber auch daran erkennen, dass sich die Zusammensetzung der Koalitionen in jedem Jahr ändert. Egalitäre Bündnisse, deren Partner die gleichen Chancen auf Fortpflanzung haben, sollten dagegen von längerer Dauer sein (Gehrt und Fritzell 1999). Gehrt und Fritzell (1999) haben die Kontakte zwischen Rüden und Fähen während der Ranz beobachtet und festgestellt, dass es in jeder Gruppe (die genauen Zugehörigkeiten zu Koalitionen wurden nicht ermittelt) einen Rüden gab, der eine höhere Kontaktrate zu Fähen hatte als die übrigen Gruppenmitglieder. Sie vermuten deshalb ebenfalls eine Hierarchie innerhalb der Bündnisse der Rüden. Die Ausbildung von Bündnissen und das Festlegen einer Rangordnung außerhalb der Paarungszeit könnte auch dazu dienen, schwerere Kämpfe zwischen Rüden während der Ranz zu verhindern (Gehrt et al. 2008).

Den Fortpflanzungserfolg eines Rüden anhand der Anzahl der Jungtiere zu bestimmen kann zu falschen Ergebnissen führen, da die Anzahl der Nachkommen nicht allein vom Verhalten der Rüden bestimmt wird, sondern noch von weiteren Faktoren abhängt (z. B. Wurfgröße, Erfahrung des Muttertiers, Mortalität durch Krankheiten oder Unfälle). Deshalb wurde zusätzlich noch die Anzahl der erfolgreichen Verpaarungen betrachtet, da diese von den Rüden direkt beeinflusst wird. Über die Anzahl der Verpaarungen bzw. die Anzahl der Jungtiere sollte festgestellt werden, ob die Zugehörigkeit zu einer Koalition eine signifikant positive Auswirkung auf den Reproduktionserfolg eines Rüden hat. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Zugehörigkeit zu einer Koalition weder signifikant auf die Anzahl der Verpaarungen noch auf die Anzahl der Jungtiere auswirkt. Die Steigerung des Reproduktionserfolgs scheint also nicht der Grund für die Bildung einer Koalition zu sein. Bisher gibt es keine weitere Studie an Waschbären, die den individuellen Fortpflanzungserfolg eines Rüden mit der Zugehörigkeit zu einer Koalition in Verbindung bringt.

4.7 Mehrfachvaterschaften

Bei zehn Würfen gab es Hinweise auf eine Mehrfachvaterschaft. In zwei Würfen war diese aber nicht völlig sicher. Im Wurf der Fähe 2019 (Jahr 2008) konnte Jungtier 6031 der Vater nicht mit Sicherheit zugeordnet werden. Möglicherweise besitzen beide Jungtiere denselben unbekanntes Vater. Bei Fähe 4004 ist die Zuordnung des Rüden 1002 als Vater von 6015 sicher, während jener als Vater für die beiden anderen Jungen ausgeschlossen wird. Der Ausschluss beruht möglicherweise auf fehlerhaften Genotypen der Jungtiere. Die DNA wurde in beiden Fällen aus Haarproben extrahiert und der DNA-Extrakt wies eine eher geringe DNA-Konzentration auf. Im Wurf der Fähe 2020 (Jahr 2008) ist es unwahrscheinlich, dass die Wurfgeschwister von drei verschiedenen Vätern stammen. Auch hier kann es sein, dass den Jungtieren aufgrund von Genotypisierungsfehlern ein falscher Vater zugeordnet wurde.

Auch Roy Nielsen und Nielsen (2007) konnten in ihrer Studie in mehreren Würfen eine Mehrfachvaterschaft nachweisen. Die Werte sind allerdings nicht direkt vergleichbar, da aufgrund des geringeren Erfolgs bei der Elternschaftsanalyse bei Roy Nielsen und Nielsen (2007) nur für fünf Würfe beide Eltern ermittelt werden konnten. Hauver (2008) gibt den in ihrer Arbeit ermittelten Anteil an Würfen mit Mehrfachvaterschaften mit 83 % an. Dieser Wert ist um vieles höher als der hier ermittelte Wert von 55 %. Die Diskrepanz zwischen den Werten lässt sich vor allem durch die unterschiedliche Populationsdichte erklären, die bei der von Hauver (2008) untersuchten Population um etwa das zehnfache höher liegt als im Müritznationalpark. Aufgrund der hohen Populationsdichte kommt es zu einer höheren Begegnungsrate zwischen Rüden und Fähen und damit zu mehr Paarungsmöglichkeiten (Roy Nielsen und Nielsen 2007).

Promiskuität mit den daraus resultierenden Mehrfachvaterschaften ist eine Verhaltensweise von Tieren, die darauf abzielt, möglichst viele Jungtiere großzuziehen (Ślaska und Jeżewska 2008). Die Vorteile der Paarung mit mehreren Individuen sind für Rüden und Fähen allerdings unterschiedlich. Da sich die Rüden nicht an der Jungenaufzucht beteiligen, können sie ihren Reproduktionserfolg nur steigern, indem sie sich mit möglichst vielen Fähen paaren (Clutton-Brock 1989). Als Nebeneffekt besitzen Wurfgeschwister dann unterschiedliche Väter. Weibliche Tiere können durch die Paarung mit mehreren Partnern möglicherweise die Vaterschaft der Jungtiere verschleiern um Kindsmord zu verhindern (Hrdy 1979). Dies trifft nur auf Arten zu, bei denen der Verlust der Jungtiere zu einer weiteren Fortpflanzungsmöglichkeit führt. Zwar wird bei Waschbären durch den frühen Verlust des ersten Wurfs ein zweiter Östrus ausgelöst (Gehrt und Fritzell 1996), aber Kindsmord durch Rüden konnte nie

zweifelsfrei nachgewiesen werden (Hohmann und Bartussek 2005, Hauver 2008). Das Verhindern von Kindsmord ist also nicht das naheliegendste Motiv für die Polyandrie der Fähen. Eine weitere wichtige Funktion der Mehrfachvaterschaften ist die Verhinderung von Inzucht (Hauver 2008). Da die Fähen philopatrisch sind und auch adulte Rüden über mehrere Jahre recht stabile Reviere besetzen (Gehrt 2003) kann es dazu kommen, dass im Revier eines Rüden sehr viele mit ihm verwandte Fähen leben. Durch die Paarung mit möglichst vielen Rüden aus ihrer Umgebung können die Fähen also verhindern, dass die Jungtiere in höherem Maß ingezüchtet sind (Hauver 2008).

Da den Fähen keine direkten Vorteile, wie z. B. Hilfe bei der Aufzucht der Jungtiere, durch die Paarung mit mehreren Rüden entstehen, können noch indirekte genetische Vorteile als Erklärung herangezogen werden (Jennions und Petrie 2000). Darunter fallen Effekte wie Sicherstellung der Befruchtung, Schutz gegen die Unfruchtbarkeit eines Rüden und Steigerung der genetischen Diversität der Jungtiere, welche aber alle eher als nebensächlich eingestuft werden (Wolff und Macdonald 2004). Viel wichtiger scheint die Sicherstellung einer möglichst hohen Kompatibilität von mütterlichem und väterlichem Genotyp zu sein, da Inkompatibilität zu einem frühen Verlust eines Embryos führt und somit eine große Auswirkung auf den Fortpflanzungserfolg einer Fähe hat (Zeh und Zeh 1996). Die tatsächlichen Gründe für eine Paarung mit mehreren Partnern sind bei Waschbären allerdings noch unbekannt.

4.8 Matrilinien der Fähen und Wanderung der Rüden

Aufgrund ihres philopatrischen Verhaltens etablieren die meisten jungen Fähen ihr Revier im Revier der Mutter oder mit großen Überlappungen zu diesem. Bei von Mitarbeitern des „Projekt Waschbär“ markierten Fähen betrug die Distanz zwischen dem Geburtsort der Fähen und dem Wurfplatz, den sie zur Geburt ihrer ersten Jungtiere wählten, zwischen 100 und 2900 m. Fähen verlagern ihr Streifgebiet also über kurze Distanzen, doch keine einzige beobachtete Fähe hat das Untersuchungsgebiet ganz verlassen (Michler und Köhnemann 2010). Da sich dieser Vorgang über viele Generationen fortsetzt, kommt es lokal zur Ausbildung von Matrilinien, innerhalb derer viele nah verwandte Fähen in räumlicher Nähe zueinander auftreten (Gehrt und Fritzell 1998a, Hohmann 2000). Rüden dagegen wandern meist über größere Distanzen und etablieren ihr Revier in einem Gebiet mit fremden Fähen (Gehrt und Fritzell 1998a, Hohmann und Bartussek 2005). Da die Wanderung der Rüden ungerichtet verläuft, ist es unwahrscheinlich, dass nah verwandte adulte Rüden in räumlicher Nähe zueinander auftreten (Gehrt et al. 2008).

Aufgrund dieses Verhaltens sollten die in einer Population lebenden Fähen untereinander näher verwandt sein als die Rüden. Dies wurde durch einen Vergleich der r -Werte von Fähen und Rüden mit dem t -Test nachgewiesen, der einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Werten zeigt. Einen weiteren Hinweis auf die Abwanderung der Rüden liefern die mit GenAlEx ermittelten AI_c -Werte. Die AI_c -Werte der Rüden unterscheiden sich signifikant von den AI_c -Werten der Fähen. Ein solch signifikanter Unterschied in den AI_c -Werten zwischen beiden Geschlechtern ist auf das Vorhandensein von Immigranten in der Population zurückzuführen (Favre et al. 1997). Auch Ratnayeke et al. (2002) kommen in ihrer Untersuchung zur genetischen Verwandtschaft innerhalb einer Waschbärpopulation in Tennessee zu dem Ergebnis, dass sich die adulten Fähen innerhalb der Population genetisch ähnlicher sind als die adulten Rüden. In einer von Cullingham et al. (2008) in Kanada durchgeführten Studie zum Wanderungsverhalten von Waschbären zeigten die Fähen im Mittel doppelt so hohe r -Werte, wie die Rüden. Die Abwanderung der Rüden und die Ausbildung von Matrilineen lassen sich also anhand der genetischen Daten eindeutig nachweisen.

Wie das Histogramm in Abbildung 3.3 verdeutlicht gibt es aber auch einige Rüden, die nah miteinander verwandt sind. In der untersuchten Waschbärpopulation wurde der Fall eines juvenilen Rüden (ID 5007) dokumentiert, der sein Revier in großer Nähe zu seinem Geburtsgebiet etabliert hat (Schäuble 2009, Michler und Köhneemann 2010). Relativ geringe zurückgelegte Entfernungen, insbesondere bei der Wanderung von juvenilen Rüden, wurden auch in der Untersuchung von Cullingham et al. (2008) festgestellt.

Bei manchen Fähen treten niedrige AI_c -Werte auf, wie sie sonst nur bei eingewanderten Rüden zu finden sind. Dass die betreffenden Fähen über lange Distanzen eingewandert sind kann allerdings als Ursache für die niedrigen Werte ausgeschlossen werden, da eine Abwanderung von weiblichen Tieren nie beobachtet wurde (Gehrt und Fritzell 1998a, Michler und Köhneemann 2010). Bei der Betrachtung des Genotyps der Fähen fällt allerdings auf, dass sie alle ein bis drei Allele besitzen, die in der untersuchten Population äußerst selten vorkommen. Aufgrund dieser Allele erhalten die Fähen AI_c -Werte wie Tiere, die tatsächlich nicht aus der Population stammen, obwohl sie im Untersuchungsgebiet geboren sind. Wahrscheinlich stammen die Fähen also von Rüden ab, die aus weiter entfernten Gebieten ein- oder durchgewandert sind.

4.9 Zusammenhang zwischen genetischer und geographischer Distanz bei Fähen

Fähen innerhalb einer Matrilinie sollten sich genetisch ähnlicher sein als Fähen zwischen den Matrilinien. Da sich die Fähen in räumlicher Nähe zu ihren Müttern niederlassen und sich damit auch in der Nähe anderer weiblicher Verwandter (Schwestern, Tanten, Cousinen, Großmütter) befinden, sollte zudem ein positiver Zusammenhang zwischen genetischer und geographischer Distanz bestehen (Ratnayeke et al. 2002). Ein solcher Zusammenhang konnte für die hier untersuchte Waschbärpopulation allerdings nicht nachgewiesen werden. In der Studie von Roy Nielsen und Nielsen (2007) ergab sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen genetischer und geographischer Distanz. Ratnayeke et al. (2002) konnten dagegen einen positiven Zusammenhang feststellen. Die Ursachen für das Fehlen eines Zusammenhangs zwischen genetischer und geographischer Distanz liegen im promiskuitiven Paarungssystem und im Abwanderungsverhalten der Rüden (Ratnayeke et al. 2002). Aufgrund des promiskuitiven Paarungssystems paaren sich die Rüden während der Ranz mit mehreren Fähen. Paaren sie sich dabei mit Fähen unterschiedlicher Matrilinien, wie dies auch in der untersuchten Population der Fall war, kommen Halbgeschwister in verschiedenen Matrilinien vor. Ebenso paaren sich wandernde adulte Rüden mit Fähen, die weit voneinander entfernt leben. Dies hat zur Folge, dass es Halbschwestern gibt, die in größerer räumlicher Entfernung zueinander leben (Ratnayeke et al. 2002). Ein ähnlicher Effekt tritt auf, wenn Brüder in verschiedene Richtungen wandern (Roy Nielsen und Nielsen 2007). Daneben sind sich aufgrund der geringen genetischen Diversität auch unverwandte Fähen in der Population genetisch relativ ähnlich. Wenn sich Fähen, wie beobachtet, in einem Jahr bzw. in aufeinanderfolgenden Jahren mit verschiedenen Rüden paaren, dann sind die Schwestern eines Wurfes bzw. der Würfe verschiedener Jahre keine Voll- sondern Halbschwestern. Dies führt dazu, dass nah beieinander lebende Fähen weniger verwandt sind, als sie es theoretisch sein müssten. Zusammengenommen verwischen all diese Effekte die Beziehung zwischen genetischer und geographischer Distanz. Ein anderer Grund für das Fehlen der vermuteten Beziehung kann auch die Größe des Untersuchungsgebietes sein. Möglicherweise sind die betrachteten Distanzen zu gering um eine „isolation by distance“ nachweisen zu können.

4.10 Verwandtschaft der Rüden innerhalb einer Koalition

Die Rolle der Verwandtschaft bei der Bildung von Koalitionen wurde bereits in mehreren anderen Studien diskutiert (Michler et al. 2004, Gehrt und Fox 2004, Gehrt et al. 2008). Neu in der vorliegenden Arbeit ist die weitere Unterteilung der Bündnisse in feste und temporäre

Koalitionen sowie Gruppenterritorien. In allen Gruppen liegt der Großteil der r -Werte im niedrigen Bereich, was zeigt, dass die meisten Rüden, die in einer Koalition leben, nicht nah miteinander verwandt sind. In jeder Gruppe streuen die r -Werte zwar auch in einen Bereich, der auf nahe Verwandtschaft schließen lässt, doch dies sind eher Ausnahmen. Ein signifikanter Unterschied im Verwandtschaftsgrad zwischen den Bündnistypen konnte nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigen also, dass die meisten in einer Koalition oder einem Gruppenterritorium lebenden Rüden nicht besonders nah miteinander verwandt sind, obwohl auch einige Rüden mit einem hohen Verwandtschaftsgrad auftreten. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass nahe Verwandtschaft nicht der Grund für die Bildung einer Koalition ist.

Auch Gehrt und Fox (2004) kommen zum Schluss, dass es sich bei den Koalitionsrüden nicht um Wurfgeschwister handeln kann, da die meisten an einer Koalition beteiligten Rüden unterschiedlichen Altersklassen angehören. Des Weiteren sind die Autoren der Auffassung, dass das Abwanderungsverhalten der Rüden ein Aufeinandertreffen nah verwandter adulter Rüden verhindert. In ihrer Untersuchung haben Gehrt und Fox (2004) allerdings keine genetischen Tests durchgeführt, um die tatsächliche Verwandtschaft der Rüden zu klären. Michler et al. (2004) dagegen haben die Verwandtschaft von Koalitionsrüden aus der Stadt Kassel genetisch untersucht und festgestellt, dass diese nicht miteinander verwandt sind. Auch Gehrt et al. (2008) haben die Verwandtschaft zwischen Koalitionsrüden bei einer Waschbärpopulation in Texas genetisch untersucht. Bei ihnen traten zwar ebenfalls genetisch ähnliche Rüden in einer Koalition auf, doch auch sie kommen zu dem Ergebnis, dass die Koalitionen nicht generell aus nah verwandten Rüden bestehen. Gehrt et al. (2008) konnten zudem einen marginal signifikanten, positiven Zusammenhang zwischen Verwandtschaft und Dauer der Koalition nachweisen. Ein solcher Zusammenhang besteht bei den hier untersuchten Rüden anscheinend nicht, da sich die Werte zwischen festen und temporären Koalitionen nicht signifikant unterscheiden.

5. Fazit und Ausblick

Es hat sich gezeigt, dass die zehn Loci in Kombination mit der geringen genetischen Diversität nicht ausreichend waren, um eine rein auf genetischen Daten basierende Elternchaftsanalyse durchzuführen. In vielen Fällen waren die Kenntnisse aus den Freilandarbeiten unerlässlich für eine sichere Zuordnung. Für eine weitere Analyse mit Mikrosatelliten können noch die bereits beschriebenen Primer PLOT-01, PLOT-11 und PLOT-13 getestet werden, die allerdings schon in der Arbeit von Fike et al. (2007) eine geringe Allelzahl und/oder Heterozygotie aufwiesen.

Dennoch konnten mit Hilfe der Marker wichtige Aspekte des Sozialsystems geklärt werden, für die Beobachtungen allein nicht ausreichen. Darunter fallen die Aufdeckung von Mehrfachvaterschaften innerhalb eines Wurfs und das Feststellen des Verwandtschaftsgrades innerhalb der Koalitionen sowie zwischen Rüden und Fähen.

Als Quelle für die DNA ist Gewebe für eine, abgesehen von Laborfehlern, sichere Genotypisierung zweifellos am besten geeignet. Bei der Wahl zwischen Haar- und Speichelproben sind Haarproben vorzuziehen. Hier kann, wenn die Haarfollikel gut erhalten sind, der DNA-Gehalt des Extraktes durch die Verwendung von bis zu 80 Follikeln maximiert werden. Hieraus resultiert ein größerer Genotypisierungserfolg mit geringerer Fehlerrate als bei Speichelproben.

Durch die vorliegende Arbeit konnten wertvolle Erkenntnisse zur Verwandtschaftsstruktur und zum Sozialsystem der im Müritz-Nationalpark lebenden Waschbärpopulation gewonnen werden. Einige Fragen konnten geklärt werden, doch andere, wie die genauen Gründe für die Bildung von Koalitionen oder für das promiskuitive Paarungssystem, sind noch offen. Da die Freilandarbeiten des „Projekt Waschbär“ weitgehend abgeschlossen sind, ist vor allem noch Raum für weitere molekularbiologische Analysen, die dabei helfen können, das im Freiland beobachtete Verhalten der Waschbären besser zu verstehen. Ein Vorschlag wäre eine weitere genetische Analyse mit mehr Markern, durch die der genaue Verwandtschaftsgrad zweier Individuen ermittelt werden kann.

6. Literaturverzeichnis

Ahnert, F. (1996): Einführung in die Geomorphologie. 1. Auflage, Ulmer, Stuttgart.

Bellemain, E., Swenson, J.E., Tallmon, D., Brunberg, S., Taberlet, P. (2005): Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: four methods for brown bears. – *Conservation Biology*, Vol. 19, No. 1, [150-161].

Bibelriether, H. (Hrsg. 1997): Naturland Deutschland. Freizeitführer Nationalparke und Naturlandschaften. Kosmos, Stuttgart.

Blouin, M.S. (2003): DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. – *TRENDS in Ecology and Evolution*, Vol. 18, No. 10, [503-511].

Boutin-Ganache, I., Raposo, M., Raymond, M., Deschepper, C.F. (2001): M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analysis performed with two different allele-sizing methods. – *Biotechniques*, Vol. 31, No. 1, [24-28].

Broquet, T., Ménard, N., Petit, E. (2007): Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. – *Conservation Genetics*, 8, [249-260].

Chamberlain, M.J., Leopold, B.D. (2002): Spatio-temporal relationships among adult raccoons (*Procyon lotor*) in central Mississippi. – *The American Midland Naturalist*, 148, [297-308].

Clutton-Brock, T.H. (1989): Mammalian mating systems. – *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 236, [339-372].

Cullingham, C.I., Kyle, C.J., White, B.N. (2006): Isolation, characterization and multiplex genotyping of raccoon tetranucleotide microsatellite loci. – *Molecular Ecology Notes*, 6(4), [1030-1032].

Cullingham, C.I., Pond, B.A., Kyle, C.J., Rees, E.E., Rosatte, R.C., White, B.N. (2008): Combining direct and indirect genetic methods to estimate dispersal for informing wildlife disease management decisions. – *Molecular Ecology*, 17, [4874-4886].

Delgado, R., Fernández-Llario, P., Azevedo, M., Beja-Pereira, A., Santos, P. (2008): Paternity assessment in free-ranging wild boar (*Sus scrofa*) – Are littermates full-sibs? – *Mammalian Biology*, 73, [169-176].

Ellegren, H. (2000): Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. – *Trends in Genetics*, Vol. 16, Nr. 12, [551-558].

Excoffier, L., Laval, G., Schneider S. (2005): Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. – *Evolutionary Bioinformatics online*, 1, [47-50].

Favre, L., Balloux, F., Goudet, J., Perrin, N. (1997): Female-biased dispersal in the monogamous mammal *Crocidura russula*: evidence from field data and microsatellite patterns. – *Proceedings of the Royal Society London B*, 264, [127-132].

- Fike, J.A., Drauch, A.M., Beasley, J.C., Dharmarajan, G., Rhodes Jr, O.E. (2007): Development of 14 multiplexed microsatellite loci for raccoons *Procyon lotor*. – *Molecular Ecology Notes*, 7(3), [525-527].
- Fernando, P., Vidya, T.N.C., Rajapakse, C., Dangolla, A., Melnick, D.J. (2003): Reliable Noninvasive Genotyping: Fantasy or Reality? – *Journal of Heredity*, 94(2), [115-123].
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. (2003): *Introduction to conservation genetics*. 3. print, Cambridge University Press, Cambridge.
- Fritzell, E.K. (1978): Aspects of raccoon (*Procyon lotor*) social organization. – *Canadian Journal of Zoology*, 56, [260-271].
- Gagneux, P., Boesch, C., Woodruff, D.S. (1997): Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. – *Molecular Ecology*, 6, [861-868].
- Gehrt, S.D. (2003): Raccoon and allies. In: Feldhamer, G.A., Thompson, B.C., Chapman, J.A. (eds.), *Wild mammals of North America. Biology, management and conservation*. 2nd ed., University Press, Baltimore.
- Gehrt, S.D., Fox, L.B. (2004): Spatial patterns and dynamic interactions among raccoons in eastern Kansas. – *The Southwestern Naturalist*, Vol. 49, No. 1, [116-121].
- Gehrt, S.D., Fritzell, E.K. (1996): Second estrus and late litters in raccoons. – *Journal of Mammalogy*, 77(2), [388-393].
- Gehrt, S.D., Fritzell, E.K. (1997): Sexual differences in home ranges of raccoons. – *Journal of Mammalogy*, 78(3), [921-931].
- Gehrt, S.D., Fritzell, E.K. (1998a): Duration of familial bonds and dispersal patterns for raccoons in south Texas. – *Journal of Mammalogy*, 79(3), [859-872].b
- Gehrt, S.D., Fritzell, E.K. (1998b): Resource distribution, female home range dispersion and male spatial interactions: group structure in a solitary carnivore. – *Animal Behaviour*, 55, [1211-1227].
- Gehrt, S.D., Fritzell, E.K. (1999): Behavioural aspects of the raccoon mating system: determinants of consortship success. – *Animal Behaviour*, 57, [593-601].
- Gehrt, S.D., Gergits, W.F., Fritzell, E.K. (2008): Behavioural and genetic aspects of male social groups in raccoons. – *Journal of Mammalogy*, 89(6), [1473-1480].
- Hauver, S.A. (2008): Genetic determinants of raccoon social behaviour in a highly urbanized environment. – Thesis, Ohio State University, 112 p.
- Hohmann, U. (1998): Untersuchungen zur Raumnutzung des Waschbären (*Procyon lotor* L. 1758) im Solling, Südniedersachsen, unter besonderer Berücksichtigung des Sozialverhaltens. – Dissertation an der Universität Göttingen, 153 S.

- Hohmann, U. (2000): Raumnutzung und Sozialsystem des Waschbären in Mitteldeutschland. – Wildbiologie, 3.
- Hohmann, U., Bartussek, I. (2005): Der Waschbär. 2. Auflage, Oertel + Spörer, Reutlingen.
- Hohmann, U., Hupe, K. (1998): Interspecific competition of the raccoon (*Procyon lotor*) and the wildcat (*Felis silvestris silvestris*) with regard to rest sites in Germany. – In: Thomaidis, C., Kypridemos, N. (Hrsg.): Agriculture Forestry – Game, Integrating Wildlife in Land Management, IUGB-Proceedings Thessaloniki, [361-367].
- Hrdy, S.B. (1979): Infanticide among animals: a review, classification, and examination of the implications for the reproductive strategies of females. – Ethology and Sociobiology, 1, [13-40].
- Jennions, M.D., Petrie, M. (2000): Why do females mate multiply? A review of genetic benefits. – Biological Reviews, 75, [21-64].
- Jones, A.G., Ardren, W.R. (2003): Methods of parentage analysis in natural populations. – Molecular Ecology, 12, [2511-2523].
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C. (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. – Molecular Ecology, 16, [1099-1106].
- Kampmann, H. (1975): Der Waschbär. Verbreitung, Ökologie, Lebensweise, Jagd. 1. Auflage, Paul Parey, Berlin.
- Köhnemann, B.A. (2007): Radiotelemetrische Untersuchung zu saisonalen Schlafplatznutzungen und Aktionsraumgrößen adulter Waschbären (*Procyon lotor* L., 1758) in einer Moor- und Sumpflandschaft im Müritz-Nationalpark (Mecklenburg-Vorpommern). – Diplomarbeit an der Universität Hamburg, 99 S.
- Köhnemann, B.A., Michler, F.U. (2009): Sumpf- und Moorlandschaften der nordostdeutschen Tiefebene - Idealhabitate für Waschbären (*Procyon lotor* L. 1758) in Mitteleuropa. – Beiträge zur Jagd- und Wildforschung, Bd. 34, [511-524].
- Konovalov, D.A., Manning, C., Henshaw, M.T. (2004): KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. – Molecular Ecology Notes, 4, [779-782].
- Lamprecht, Jürg (1999): Biologische Forschung von der Planung bis zur Publikation. 2. Auflage, Filander, Fürth.
- Landesamt für Forsten und Großschutzgebiete Mecklenburg-Vorpommern und Nationalparkamt Müritz und (Hrsg., 2004a): Müritz Nationalpark. Nationalparkplan - Leitbild und Ziele. Band I.
- Landesamt für Forsten und Großschutzgebiete Mecklenburg-Vorpommern und Nationalparkamt Müritz und (Hrsg., 2004b): Müritz Nationalpark. Nationalparkplan - Bestandsanalyse. Band II.

- Leicht, E. (2009): Waschbär - kleiner Feldversuch mit großer Wirkung. – AFZ der Wald, Nr. 11, [570-573].
- Lutz, W. (1981): Untersuchungen zur Nahrungsbiologie des Waschbären (*Procyon lotor*) und zum möglichen Einfluss auf andere Tierarten in seinem Lebensraum. – Dissertation an der Universität Heidelberg, 238 S.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., Pemberton, J.M. (1998): Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. – *Molecular Ecology*, 7, [639-655].
- Michler, F.U. (in prep.): Untersuchungen zur Populationsbiologie des Waschbären (*Procyon lotor* L., 1758) im Nordostdeutschen Tiefland am Beispiel des Müritz-Nationalparks (Mecklenburg-Vorpommern). – Dissertation an der Technischen Universität Dresden.
- Michler, F.U., Hohmann, U., Stubbe, M. (2004): Aktionsräume, Tagesschlafplätze und Sozialsystem des Waschbären (*Procyon lotor* Linné 1758) im urbane Lebensraum der Großstadt Kassel (Nordhessen). – *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung*, Bd. 29, [257-273].
- Michler, F.U., Köhneemann, B.A., Gabelmann, K., Schäuble, D., Ortmann, S. und Muschik, I. (2008): Waschbärforschungsprojekt im Müritz-Nationalpark – Untersuchungen zur Populationsökologie des Waschbären (*Procyon lotor* L., 1758) im Müritz-Nationalpark (Mecklenburg-Vorpommern). Zwischenbericht 2007. – 15. Jagdbericht für Mecklenburg-Vorpommern, [19-24].
- Michler, F.U., Köhneemann, B.A. (2009): Maskierte Langfinger auf dem Vormarsch. - Waschbären in Mecklenburg-Vorpommern. Aktueller Wissensstand über potentielle Auswirkungen der Waschbärbesiedlung und Hinweise zur Bejagung. In: Stubbe, M. und Böhning, V. (Hrsg.), Neubürger und Heimkehrer in der Wildtierfauna. Halle/Saale und Damm, [51-61].
- Michler, F.U., Köhneemann, B.A., Roth, M., Speck, S., Fickel, J., Wibbelt, G. (2009): Todesursachen sendermarkierter Waschbären (*Procyon lotor* L. 1758) im Müritz-Nationalpark (Mecklenburg-Vorpommern). – *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung*, Band 34, [525-538].
- Michler, F.U., Köhneemann, B.A. (2010): Tierische Spitzenleistung - Abwanderungsverhalten von Waschbären (*Procyon lotor* L., 1758) in Norddeutschland. – *Labus* 31, [52-59].
- Mülhardt, C. (2009): *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. 6. Auflage, Spektrum, Heidelberg.
- Muschik, I. (2008): Radiotelemetrische Untersuchung zum Raum- und Sozialverhalten weiblicher Waschbären (*Procyon lotor* L.) und ihrer Jungtiere während des Winterhalbjahres im Müritz-Nationalpark (Mecklenburg-Vorpommern). – Diplomarbeit an der Ruhr-Universität Bochum, 89 S.
- Nationalparkamt Müritz 2010a. Online im Internet: http://www.muertitz-nationalpark.de/cms2/MNP_prod/MNP/de/Natur/Zahlen/index.jsp?, Abruf am 21.10.2010.
- Nationalparkamt Müritz 2010b. Online im Internet: http://www.muertitz-nationalpark.de/cms2/MNP_prod/MNP/de/Management/Waldbehandlung/index.jsp?, Abruf am 21.10.2010.

Nationalparkamt Müritz 2010c. Online im Internet: http://www.muertitz-nationalpark.de/cms2/MNP_prod/MNP/de/Management/Weltnaturerbe_Serrahn/index.jsp?, Abruf am 21.10.2010.

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

Peter, A. (2009): Analyse der Verwandtschaftsbeziehungen und des individuellen Fortpflanzungserfolges in einer Waschbärpopulation (*Procyon lotor* L., 1758) im Müritz-Nationalpark (Mecklenburg-Vorpommern). – Diplomarbeit an der Universität Landau, 60 S.

Priewert, F.W. (1961): Record of an extensive movement by a raccoon. – *Journal of Mammalogy*, 42, [113].

Queller, D.C., Goodnight, K.F. (1989): Estimating relatedness using genetic markers. – *Evolution*, 43(2), [258-275].

Ratanayeke, S., Tuskan, G.A., Pelton, M.R. (2002): Genetic relatedness and female spatial organization in a solitary carnivore, the raccoon, *Procyon lotor*. – *Molecular Ecology*, 11, [1115-1124].

Root, J.J., Puskas, R.B., Fischer J.W., Swope, C.B., Neubaum, M.A., Reeder, S.A., Piaggio, A.J. (2009): Landscape genetics of raccoon (*Procyon lotor*) associated with ridges and valleys of Pennsylvania: implications for oral rabies vaccination programs. – *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, Vol. 9, Nr. 6, [583-588].

Roy Nielsen, C.L., Nielsen, C.K. (2007): Multiple paternity and relatedness in southern Illinois raccoons (*Procyon lotor*). – *Journal of Mammalogy*, 88(2), [441-447].

Schäuble, D. (2009): Sozioethologische Studie zum Raumverhalten juvenile Waschbären (*Procyon lotor* L., 1758) und deren Mutterfamilien während der Sommermonate im Müritz-Nationalpark (Mecklenburg-Vorpommern). – Diplomarbeit an der Freien Universität Berlin, 68 S.

Ślaska, B., Jeżeweska, G. (2008): Bi-paternal litter in finn raccoon (*Nyctereutes procyonides* Gray 1834) detected by polymorphic DNA markers. – *Folia biologica*, vol. 56, No. 3-4, [193-195].

Stubbe, M. (1993): *Procyon lotor* (Linné, 1758) – Waschbär. In: Niethammer, J., Krapp, F. (Hrsg.): *Handbuch der Säugetiere Europas*. 5/I. Aula Verlag, Wiesbaden.

Taberlet, P., Waits, L.P., Luikart, G. (1999): Noninvasive genetic sampling: look before you leap. – *Trends in Ecology and Evolution*, Vol. 14, No. 8, [323-327].

Thomaschek, K. (2008): Distribution of the raccoon (*Procyon lotor* L., 1758) in Germany (hunting bag analysis) and Europe (single record data). – University of Applied Sciences Eberswalde. 76 S.

Townsend, C.R., Begon, M., Harper, J.L. (2008): *Essentials of Ecology*. Dritte Auflage, Blackwell Publishing, Oxford.

Wolff, J.O., Macdonald, D.W. (2004): Promiscuous females protect their offspring. – Trends in Ecology and Evolution, Vol. 19, No. 3, [127-134].

Zeh, J.A., Zeh, D.W. (1996): The evolution of polyandry I: intragenomic conflict and genetic incompatibility. – Proceedings of the Royal Society of London Series B, 263, [1711-1717].

7. Anhang

7.1 Verwendete Chemikalien

100 bp DNA-Leiter	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	peqlab, Erlangen
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Cy-Farbstoffe	VBC Biotech, Wien
dNTP Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
GoTaq® DNA Polymerase	Promega, Madison WI, USA
Größenstandard 400 bp/ 600 bp	Beckman Coulter, Krefeld
KCl	Riedel-de Haën, Seelze
KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe
M13-Primer	VBC Biotech, Wien
MgCl ₂	Promega, Madison WI, USA
Mineral Oil	Beckman Coulter, Krefeld
Na ₂ EDTA	Fluka, Buchs (CH)
Na ₂ HPO ₄	AppliChem, Darmstadt
NaCl	Riedel-de Haën, Seelze
PCR Puffer 5x	Promega, Madison WI, USA
Primer forward/reverse	VBC Biotech, Wien
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Sample Loading Solution	Beckman Coulter, Krefeld
Tris Base	Roth, Karlsruhe

7.2 Rezepte

10x TBE

108 g Tris Base, 55 g Borsäure, 7,48 g Na₂EDTA oder 40 ml 0,5 M EDTA ph 8,0 auf 1 l H₂O

Ladepuffer

0,25% Bromphenolblau, 40% (w/v) Saccharose;

125 mg Bromphenolblau und 20 g Saccharose mit H₂O dest. auf 50 ml auffüllen.

PBS

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄;

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ in 800 ml H₂O dest. lösen, mit HCl ph 7,4 einstellen, mit H₂O dest. auf 1 l auffüllen.

7.3 Auszug aus dem Standard-Extraktionsprotokoll für Gewebe von Macherey-Nagel

1. Probenvorbereitung

25 mg Gewebe zerkleinern und in ein 1,5 ml Tube füllen.

2. Prä-Lyse

180 µl T1-Puffer und 25 µl Proteinase K hinzugeben. Vortexen. Bei 56°C mindestens 1-3 h inkubieren. Einen Thermorüttler benutzen oder gelegentlich vortexen.

3. Lyse

Probe vortexen. 200 µl Puffer B3 zugeben, vortexen und 10 min bei 70°C inkubieren. Kurz vortexen.

4. Ethanolfällung

210 µl Ethanol (96 – 100%) zur Probe geben und vortexen.

5. Binden der DNA

Für jede Probe eine NucleoSpin® Tissue Colum in ein Auffang-Tube stecken. Probe auf die Säule geben. Für 1 min bei 11000 x g zentrifugieren. Durchfluss verwerfen.

6. Waschen der Silica-Membran

Erster Waschschritt: 500 µl Puffer BW hinzugeben. 1 min bei 11000 x g zentrifugieren. Durchfluss verwerfen. Zweiter Waschschritt: 600 µl Puffer B5 auf die Säule geben und 1 min bei 11000 x g zentrifugieren. Durchfluss verwerfen.

Zum trocknen der Membran 1 min bei 11000 x g zentrifugieren.

7. Eluieren der DNA

NucleoSpin® Tissue Colum in ein neues 1,5 ml Tube stecken und 100 µl auf 70°C erwärmten BE-Puffer auf die Säule geben. Bei Raumtemperatur 1 min inkubieren. 1 min bei 11000 x g zentrifugieren.

7.4 Auszug aus dem Standard-Extraktionsprotokoll für Haare von Macherey-Nagel

1. Probenvorbereitung

Haarwurzeln von den Haarproben abschneiden (bis zu 100) und in einem 1,5 ml Tube sammeln.

2. Prä-Lyse

180 µl Puffer T1 zu den Haarwurzeln geben und die Proben in flüssigem Stickstoff einfrieren. Proben in einem Wasserbad bei 56°C auftauen. Diesen Schritt 4 mal wiederholen. 25 µl Proteinase K zugeben, vortexen, 6-8 h oder über Nacht bei 56°C inkubieren.

Mit Schritt 3 des Standard-Protokolls fortfahren.

7.5 Auszug aus dem Standard-Extraktionsprotokoll für Speichelproben von Macherey-Nagel

1. Probenvorbereitung

Aufnehmen der Probe mit einem Wattestäbchen.

2. Prä-Lyse

Den getrockneten Kopf des Wattestäbchens in ein 2 ml Tube überführen. 400 – 600 µl PBS und 25 µl Proteinase K zugeben.

Das Volumen des PBS ist vom Material des Wattestäbchens abhängig: für Baumwolle und Dacron 400 µl, für C.E.P. 600 µl verwenden.

2 x 5 s vortexen und 10 min bei 56°C inkubieren.

2a. Trennen der Lösung von den Wattestäbchen

Alternative A: Einen NucleoSpin® Filter in ein 2 ml Tube einsetzen. Spitze des Wattestäbchens und die verbleibende Lösung in den NucleoSpin® Filter überführen. 1 min bei 11000 x g zentrifugieren. NucleoSpin® Filter verwerfen und mit dem Durchfluss weiterarbeiten.

Alternative B: So viel der Lysat-Lösung in ein 1,5 ml Tube überführen. Wattestäbchen verwerfen und mit der Lösung weiterarbeiten.

3. Lyse

Puffer B3 hinzufügen (400 oder 600 µl, abhängig vom Material des Wattestäbchens / des eingesetzten Volumens an PBS) und vortexen. Bei 70°C 10 min inkubieren.

4. Ethanol-fällung

Ethanol (96-100%) hinzugeben (400 oder 600 µl, abhängig vom Material des Wattestäbchens) und vortexen.

5. DNA binden

600 µl der Probe auf die NucleoSpin® Tissue Colum geben. 1 min bei 11000 x g zentrifugieren. Durchfluss verwerfen. In Abhängigkeit vom Volumen des Lysats ein oder zwei Mal wiederholen.

Mit Schritt 6 des Standard-Protokolls fortfahren.

7.6 Berechnung der DNA-Konzentration

Auszug aus dem Benutzerhandbuch des NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (V3.7):

Das Beer-Lambertsche Gesetz wird verwendet, um den Absorptionsgrad mit der Konzentration in Beziehung zu setzen:

$$A = E * b * c$$

A ist die Absorption in „absorbance units“ (AU), E ist der Extinktionskoeffizient mit der Einheit Liter/mol-cm, b ist die Pfadlänge in cm und c die Konzentration der absorbierenden Substanz in mol/Liter.

Zur Quantifizierung von Nukleinsäuren wird das Beer-Lambertsche Gesetz modifiziert und benutzt einen Extinktionskoeffizienten mit der Einheit ng-cm/µl. Bei der Verwendung dieses Extinktionskoeffizienten ergibt sich die geänderte Gleichung:

$$c = (A * e)/b$$

c ist die Nukleinsäure-Konzentration in ng/µl, A ist die Absorption in AU, e ist der Extinktionskoeffizient in ng-cm/µl und b ist die Pfadlänge in cm.

Der allgemein akzeptierte Extinktionskoeffizient für Nukleinsäuren ist für doppelsträngige DNA 50 ng-cm/µl.

Das NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 verwendet Pfadlängen von 0,1 cm und 0,02 cm, im Gegensatz zu Standard-Spektrophotometern, die eine Pfadlänge von 1 cm verwenden. Für Nukleinsäuren und Protein A280 wird die Absorption auf eine Pfadlänge von 1 cm umgerechnet.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Verwendung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Alle wörtlichen und sinngemäßen Zitate habe ich als solche kenntlich gemacht.

Landau, den 26.01.2011

Susanne Gramlich

Danksagung

Besonders danken möchte ich Dr. Holger Schulz, Frank Michler und Berit Köhnemann für die Betreuung dieser Arbeit. Sie alle haben durch ihr Wissen, ihre Anregungen und ihre Kritik zum Gelingen dieser Diplomarbeit beigetragen. Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Klaus Schwenk, der sich bereit erklärt hat diese Arbeit als zweiter Prüfer zu bewerten.

Auch möchte ich allen Studenten, Diplomanden und Doktoranden für die gute Zusammenarbeit im zeitweise überfüllten Labor des Geilweilerhofs danken. Besonderer Dank gilt hier Anne Schrimpf, Anne Thielsch, Karolina Kolodziej und Therese Bürgi, die bei Problemen immer sofort zur Stelle waren.

Ein Dank geht auch an alle Freunde und Verwandte, die mir während des ganzen Studiums mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für ihre Unterstützung in jeglicher Form und ihren bedingungslosen Rückhalt bei all meinen Vorhaben danken.