

SUSANNE GRAMLICH, HOLGER SCHULZ, Landau; BERIT A. KÖHNEMANN,
FRANK-UWE MICHLER, Tharandt

Mater semper certa? – Molekularbiologische Analyse einer Waschbärenpopulation (*Procyon lotor* Linné, 1758) im Müritz-Nationalpark

Schlagworte/key words: Waschbär, raccoon, *Procyon lotor*, Mikrosatellitenanalyse, microsatellite analysis, Koalitionen, male coalitions, Verwandtschaft, kinship, Elternschaftsanalyse, parentage analysis, Müritz-Nationalpark

1. Einleitung

Die molekularbiologische Analyse der Waschbärpopulation ist Teil einer wildbiologischen Forschungsstudie (www.projekt-waschbaer.de), die Nahrungs- und Reproduktionsökologie, Populationsbiologie, Raumnutzung und Sozialsystem wildlebender Waschbären im Müritz-Nationalpark in Mecklenburg-Vorpommern untersucht. Die molekularbiologische Analyse ist eine sinnvolle Ergänzung zu den Freilandarbeiten, da sie Erkenntnisse über Verwandtschaft und Sozialsystem der Population liefert, die dem Auge des Beobachters normalerweise verborgen bleiben. So war eine Elternschaftsanalyse zur Zuordnung von Muttertieren notwendig, da zwar für einige Jungtiere die Muttertiere aus Freilandbeobachtungen bekannt waren, doch andere Jungtiere nie zusammen mit einer möglichen Mutter nachgewiesen wurden. Da sich die Rüden nicht an der Jungenaufzucht beteiligen, gibt es generell keine Beobachtungen von Jungtieren mit ihren Vatertieren. 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 eines genetischen Vergleichs klären.

Ein besonderer Aspekt im Sozialverhalten der Waschbären ist die bei Rüden zu beobachtende Bildung von Koalitionen. Diese bestehen aus zwei oder mehreren Männchen, 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. Die Dauer der meisten Koalitionen ist nur auf eine Saison beschränkt, einige wenige haben über mehrere Jahre Bestand (MICHLER et al. 2004, HOHMANN 2000, GEHRT und FRITZELL 1998b, MICHLER in prep.). Koalitionen bestehen aus geschlechtsreifen Rüden verschiedener Altersklassen. Jungtiere sind nie in einer Koalition anzutreffen (GEHRT et al. 2008, GEHRT und FOX 2004). Die Bildung von Koalitionen zwischen

männlichen Tieren tritt bei Carnivoren selten auf und ist meist eine Reaktion auf eine hohe Populationsdichte (GEHRT und FOX 2004). So wird die geklumpte Verteilung der Fähen als Grund für die Bildung von Koalitionen angesehen (MICHLER et al. 2004, HOHMANN 1998). Zu zweit können Rüden ihr gemeinsames Revier besser verteidigen und sich so den Zugang zu den darin lebenden Fähen sichern (HOHMANN 2000). Da sich die Rüden nicht an der Jungenaufzucht beteiligen, ist die Aussicht auf möglichst große Paarungschancen für sie besonders wichtig, weil ihr Reproduktionserfolg allein von der Anzahl der Fähen abhängt, mit denen sie sich paaren (CLUTTON-BROCK 1989). Mit der Elternschaftsanalyse sollte deshalb zum Einen geklärt werden, wie sich der Reproduktionserfolg innerhalb einer Koalition verteilt. Zum Anderen sollte sie eine Antwort auf die Frage geben, ob Koalitionsrüden nachweislich einen höheren Fortpflanzungserfolg erzielen als Rüden, die nicht in einer Koalition leben. Darüber hinaus wurde mit der genetischen Analyse die paarweise Verwandtschaft zwischen allen adulten Tieren der Population ermittelt. Hierdurch sollte vor allem geklärt werden, welche Rolle die Verwandtschaft der Rüden bei der Bildung einer Koalition spielt, da es sowohl Berichte über Koalitionen aus unverwandten (MICHLER et al. 2004) als auch aus verwandten Rüden (GEHRT et al. 2008) gibt.

2. Material und Methoden

Beim Untersuchungsgebiet handelt es sich um das Serrahner Teilgebiet des Müritz-Nationalparks im südlichen Mecklenburg-Vorpommern. Dieses stellt aufgrund der großflächigen Buchenbestände sowie zahlreicher Moore und Seen ein Idealhabitat für Waschbären dar, in welchem sie neben einem großen Nahrungsangebot auch zahlreiche Rückzugsmöglichkeiten finden (KÖHNEMANN und MICHLER 2009, ENGELMANN et al. 2011).

Probenahme

Den narkotisierten Tieren wurde Gewebe mittels einer Hautstanze (Biopsy Punch Ø 6 mm, Kruse®) entnommen und bis zur Bearbei-

tung im Labor in einem mit Ethanol (99,8 %) gefüllten 2 ml Reaktionsgefäß im Kühl- oder Gefrierschrank aufbewahrt. Zur Entnahme der Speichelproben wurde ein Beprobungsset (Voigtländer®, nerbe plus®) verwendet. Die Haarproben wurden bis zur Verwendung in Briefumschlägen bei -20 °C aufbewahrt. Eine ausführliche Darstellung der angewandten feldökologischen Methoden findet sich bei KÖHNEMANN und MICHLER (2009).

Mikrosatellitenanalyse

Zur Extraktion der DNA aus Gewebe-, Haar- und Speichelproben wurde das NucleoSpin® Tissue-Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Extraktion folgte dem Protokoll des Herstellers mit zwei Änderungen. Zum Einen erfolgte die Eluierung der DNA, abweichend vom Standard-Protokoll, in zwei Schritten mit jeweils 50 µl Pufferlösung. Zum anderen wurde bei den Haarproben auf ein mehrmaliges Gefrieren und Auftauen der Proben vor Beginn der Extraktion verzichtet. Die DNA-Konzentration der Extrakte wurde mit dem NanoDrop Spektralphotometer ND-1000 (peqlab, Erlangen) bestimmt. Für den Einsatz in der PCR wurden die DNA-Extrakte auf eine Konzentration von 20 ng/µl verdünnt. Extrakte mit einer Konzentration unter 20 ng/µl wurden unverdünnt eingesetzt.

In der PCR wurden acht tetranukleotide Mikrosatellitenloci (PLOT-06, PLOT-08, PLOT-10, FIKE et al. 2007; PLO-M2, PLO-M3, PLO-M17, PLO2-123, PLO3-86, CULLINGHAM et al. 2006) und zwei dinukleotide Mikrosatellitenloci (PLOT-02, PLOT-05, FIKE et al. 2007) vervielfältigt. Um die PCR-Produkte für die spätere Detektion mit einem Fluoreszenzfarbstoff markieren zu können, wurden alle Forward-Primer mit einer M13-Sequenz versehen, an die sich ein farbmarkierter M13 Primer anlagern konnte (BOUTIN-GANACHE et al. 2001). Für die PCR mit 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 einge-

setzt, um bessere Ergebnisse zu erzielen. Die PCR wurde mit einem Reaktionsvolumen von 15 μl durchgeführt bestehend aus 1 μl bzw. 2 μl DNA-Extrakt, 0,3 μl 10 pmol/ μl Forward-Primer, je 0,15 μl 100 pmol/ μl Reverse-Primer bzw. M13-Primer (VBC-Biotech, Wien), 3 μl 5x PCR-Puffer, 0,75 μl 25 mM MgCl_2 , 0,075 μl GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison WI), 0,3 μl 10 mM dNTP Mix (Fermentas, St. Leon-Rot) und 9,53 μl bzw. 8,28 μl ddH₂O. Zur Durchführung der PCR wurde ein Primus 96 advanced® Thermocycler (peqlab, Erlangen) verwendet. Das PCR-Programm bestand aus den Schritten: erste Denaturierung 2 min bei 95 °C; 40 Zyklen aus Denaturierung 30 s bei 95 °C, Annealing 30 s mit je nach Primer variierender Temperatur, Strangverlängerung 30 s bei 72 °C; abschließende Strangverlängerung 5 min bei 72 °C. Zur Bestimmung der Fragmentlängen wurde das CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Krefeld) verwendet. Das Auslesen der Fragmentlängen aus den Elektropherogrammen erfolgte im Programm CEQ 8000 Series Genetic Analysis System Software Version 9.0.25 (Beckman Coulter, Krefeld). Eine detaillierte Beschreibung der Methoden findet sich in GRAMLICH (2011).

Statistische Auswertung

Um Aussagen über die genetische Diversität der untersuchten Waschbärpopulation zu treffen, wurde 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 für jedes Jungtier wurde ebenfalls CERVUS 3.0 eingesetzt. CERVUS ermittelt auf Basis der Genotypen und Allelhäufigkeiten in der Population die wahrscheinlichsten Elterntiere aus einem Pool möglicher Elternkandidaten. Ein Vorteil von CERVUS ist, dass das Programm Genotypisierungsfehler bei der Zuordnung der Elterntiere berücksichtigt. So werden Tiere nicht von vornherein als Eltern ausgeschlossen, wenn sie nicht an allen Loci mit dem Jungtier übereinstimmen.

Das Programm KINGROUP Version 2 (KONOVALOV et al. 2004) wurde verwendet, um den Verwandtschaftsgrad zweier Individuen zu ermitteln.

Der Verwandtschaftsgrad wird in Form von relatedness-Werten (r-Werte) ausgegeben. Die r-Werte 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 von 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. Zur Feststellung von Unterschieden zwischen zwei Fallgruppen wurden der t-Test oder der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Um Unterschiede zwischen mehreren Fallgruppen festzustellen, wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt.

3. Ergebnisse

Genetische Diversität

Insgesamt wurden 141 Waschbären (74 Rüdchen, 67 Fähen) genotypisiert. Davon konnten 139 Individuen an allen zehn Loci genotypisiert werden und zwei Individuen nur an sieben bzw. neun Loci.

Keiner der Loci zeigte eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Mit durchschnittlich 6,2 Allelen pro Locus (Min.: 3, Max.: 11) und einer beobachteten Heterozygotie von 0,623 weist die Waschbärenpopulation des Müritz-Nationalparks im Vergleich mit Populationen im ursprünglichen Verbreitungsgebiet einen moderaten Polymorphiegrad auf. So ermittelte HAUVER (2008) in ihrer Studie an einer Population in Illinois eine beobachtete Heterozygotie von 0,76 und eine durchschnittliche Anzahl von 10,6 Allelen pro Locus. In den beiden von CULLINGHAM et al. (2008) untersuchten Populationen in Ontario betrug die durchschnittliche Anzahl an Allelen pro Locus 14,6 bzw. 16,1 und die beobachtete Heterozygotie lag bei 0,815.

Elternschaftszuordnung, Paarungssystem, Mehrfachvaterschaften

Insgesamt konnten 59 von 79 Jungtieren (74,7 %) sicher ein Muttertier und ein Vätertier zugeordnet werden. 12 Tieren konnte nur ein Muttertier zugeordnet werden, bei einem Tier konnte nur das Vätertier ermittelt werden. Bei vier Tieren war das Muttertier sicher, aber das Vätertier konnte entweder nicht sicher zugeordnet werden oder es kamen mehrere Rüden als Vater in Frage. Für drei Jungtiere konnte kein Elterntier ermittelt werden.

Anhand der so gewonnenen Daten über die Elternschaft der adulten Tiere können weitere Aussagen zum Paarungssystem getroffen werden. So zeigte sich, dass sich die meisten Fähen in aufeinanderfolgenden Jahren mit unterschiedlichen Rüden gepaart haben. Nur 3 der 9 Fähen, die in verschiedenen Jahren Nachwuchs hatten, haben sich wiederholt mit demselben Rüden gepaart. Einige Rüden haben sich im selben Jahr mit bis zu drei Fähen fortgepflanzt. Trotz großer räumlicher Nähe hat sich in keinem Fall ein Rüde mit seiner Tochter gepaart. In 10 von 18 Würfen mit mehreren Wurfgeschwistern (55 %) gibt es Hinweise auf eine Mehrfachvaterschaft. In drei dieser Würfe konnten alle Vätertiere ermittelt werden. In den

restlichen sieben Würfen konnte nicht für jedes Jungtier ein Vätertier ermittelt werden, doch es kann ausgeschlossen werden, dass alle Jungtiere vom selben Vätertier stammen.

Verwandtschaftsverhältnisse in den Koalitionen der Rüden

Es sollte getestet werden, ob Koalitionsrüden einen engeren Verwandtschaftsgrad besitzen als Rüden, die nicht in einer Koalition leben. Die Rüden wurden dafür drei unterschiedlichen Typen von Bündnissen zugeordnet. 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.).

Die paarweisen r -Werte als Maß der genetischen Verwandtschaft zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Abb. 1; Kruskal-Wallis-Test, $p > 0,05$).

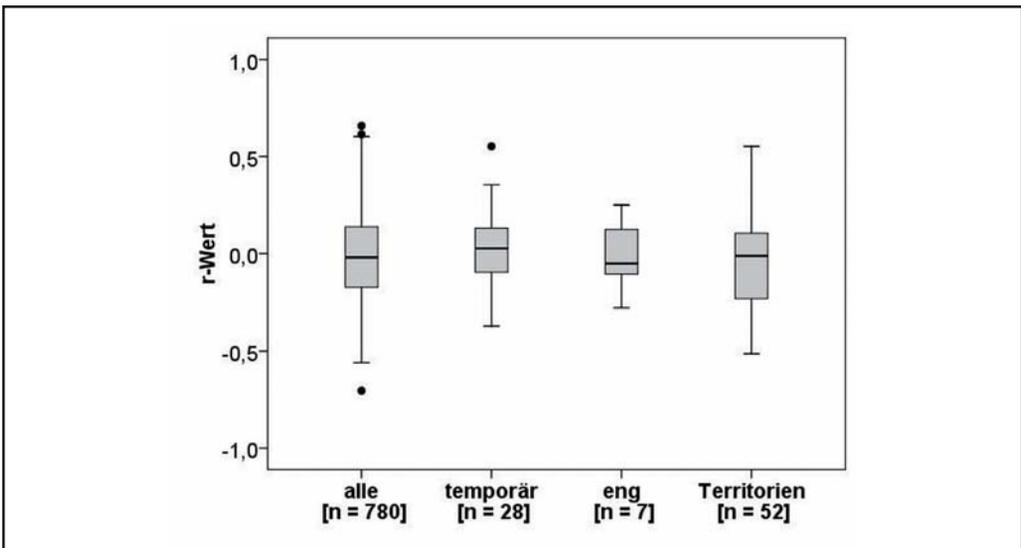


Abb. 1 Boxplot zum Vergleich der r -Werte aller Rüden sowie der unterschiedlichen im Müritz-Nationalpark beobachteten Bündnistypen. „n“ gibt die Anzahl der paarweisen Vergleiche in jeder Fallgruppe an.

Fortpflanzungserfolg und Zugehörigkeit zu einer Koalition

Abschließend sollte noch geklärt werden, ob sich die Zugehörigkeit zu einer Koalition auf den Fortpflanzungserfolg eines Rüden auswirkt. Aus den Daten (Tabelle 1) geht hervor, 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.

Zum Vergleich des Fortpflanzungserfolgs zwischen Koalitionsrüden und Rüden, die in lockeren Bündnissen leben, enthält Tabelle 2 eine Übersicht, wie viele Jungtiere den Rüden in den einzelnen Jahren zugeordnet werden konnten sowie die Anzahl der Fähen, von denen die Jungtiere stammen. 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 Koali-

tion keinen großen Fortpflanzungserfolg zeigt. 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 ($3,2 \text{ Jungtiere} \pm 1,4$) als auf nicht in einer Koalition lebende Rüden ($2 \text{ Jungtiere} \pm 0,4$), doch es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (t-Test, $p > 0,05$). Berücksichtigt wurden allerdings nur Rüden, die mindestens einen Nachkommen hatten. Auch bei der Anzahl der Verpaarungen zeigt sich, dass sich Rüden, die nicht

Tabelle 2 Übersicht über den Fortpflanzungserfolg der einzelnen Rüden im Müritz-Nationalpark in drei Untersuchungsjahren. Rüden, die in einer festen Koalition lebten, sind kursiv gedruckt.

Tabelle 1 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 (Rüden ID)	Anzahl Jungtiere
2007	1003	1
	1005	0
2008	1003	0
	1006	1
	1005	8
2009	1017	0
	1005	0
	1025	1
	5007	5

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

in einer Koalition lebten, mit genauso vielen oder sogar mehr Fähen erfolgreich fortgepflanzt haben wie Koalitionsrüden. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Koalitionszugehörigkeit und der Anzahl erfolgreicher Verpaarungen lässt sich somit nicht erkennen. Entsprechend ergibt auch der U-Test keinen signifikanten Unterschied (U-Test, $p > 0,05$) zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich der Anzahl erfolgreicher Verpaarungen.

Diskussion

Elternschaftsordnung, Paarungssystem, Mehrfachvaterschaften

Im Zuge der Freilandarbeiten des „Projekt Waschbär“ ist es gelungen, während des gesamten Untersuchungszeitraumes nahezu alle etablierten Waschbären des Untersuchungsgebietes zu beproben (MICHLER in prep.). Der hohe Erfassungsgrad schafft ideale Voraussetzungen für eine Elternschaftsanalyse. So konnten mehr als der Hälfte der Jungtiere mit CERVUS beide Elterntiere zugeordnet werden. Insgesamt konnten 95 % ($n = 75$) aller Jungtiere ein Muttertier und 78 % ($n = 62$) ein Vattertier 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 Muttertiere als Vattertiere zugeordnet werden, da vermutlich 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 leben, Proben genommen werden.

Die Ergebnisse machen 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, da hier nur die Tiere erfasst werden, bei denen die Paarung erfolgreich war.

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 (ROY NIELSEN und NIELSEN 2007, GEHRT und FRITZELL 1997).

Dementsprechend konnte in 55 % der Würfe mit mehreren Wurfgeschwistern eine Mehrfachvaterschaft festgestellt werden. Auch ROY NIELSEN und NIELSEN (2007) konnten in ihrer Studie an freilebenden Waschbären in Illinois bei mehreren Würfen eine Mehrfachvaterschaft nachweisen. 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 %.

Der Unterschied zwischen diesem und dem in dieser Studie ermittelten Anteil lässt sich vor allem durch die unterschiedliche Populationsdichte erklären, die bei der von HAUVER (2008) untersuchten urbanen Waschbärpopulation um etwa das zehnfache höher liegt (RILEY et al. 1998) als die im Müritz-Nationalpark ermittelte Dichte von 4–6 Individuen/100 ha (MICHLER et al. 2008). 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 JEZEWSKA 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. Eine weitere wichtige Funktion der Mehrfachvaterschaften könnte die Verhinderung von Inzucht sein (HAUVER 2008). Da die Fähen philopatrisch sind und auch adulte Rüden über mehrere Jahre recht stabile Reviere besetzen (GEHRT und FRITZELL 1998a), 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 Inzucht verhindern (HAUVER 2008). Da allerdings keine Paarung zwischen einem Rüden und seiner Tochter beobachtet wurde, scheint es noch andere Mechanismen zu geben, die Inzucht verhindern. Da den Fähen keine direkten Vorteile (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 genauen Gründe für eine Paarung mit mehreren Partnern sind bei Waschbären allerdings noch unbekannt.

Verwandtschaftsverhältnisse in den Koalitionen der Rüden

Die Rolle der Verwandtschaft bei der Bildung von Koalitionen wurde bereits in mehreren anderen Studien diskutiert (GEHRT et al. 2008, GEHRT und FOX 2004, MICHLER et al. 2004). Neu in der vorliegenden Arbeit ist die weitere Unterteilung der Bündnisse in feste und temporäre Koalitionen sowie Gruppenterritorien. Die Ergebnisse zeigen, dass die in einer Koalition oder einem Gruppenterritorium lebenden Rüden bis auf wenige Ausnahmen nicht besonders nah miteinander verwandt sind. Dies lässt den Schluss zu, dass nahe Verwandtschaft nicht der Grund für die Bildung einer Koalition ist. Auch GEHRT und FOX (2004) folgern, dass es sich bei den Koalitionsrüden zumindest 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 Aufeinan-

dertreffen 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 kamen zu dem Ergebnis, dass die Koalitionen nicht generell aus nah verwandten Rüden bestehen. Damit unterscheiden sich Waschbären von anderen Arten, wie z. B. Löwen (PACKER et al. 1991) oder Geparden (CARO 1994), bei denen die Koalitionen aus verwandten männlichen Tieren bestehen.

Fortpflanzungserfolg und Zugehörigkeit zu einer Koalition

Bei den in einer engen Koalition aus zwei Rüden lebenden Tieren scheint sich nur einer der Rüden erfolgreich zu paaren. Dies deutet auf das Bestehen einer Rangordnung hin. 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 FOX (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 Rangord-

nung außerhalb der Paarungszeit kann 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 alleinige 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.

Zusammenfassung

141 Waschbären aus einer freilebenden Population im Müritz-Nationalpark wurden an 10 Microsatellitenloci genotypisiert. Die genetischen Daten wurden dazu verwendet den Jungtieren Elterntiere zuzuordnen, um hieraus Erkenntnisse über den Reproduktionserfolg der adulten Tiere zu gewinnen.

Des Weiteren wurde anhand der Daten der Verwandtschaftsgrad unter adulten Tieren bestimmt. Aufgrund des hohen Erfassungsgrades konnten 95 % (n = 75) aller Jungtiere ein Muttertier und 78 % (n = 62) ein Vattertier zugeordnet werden.

Die Ergebnisse lassen erkennen, dass sich sowohl Rüden als auch Fähen während der Ranz mit mehreren Partnern paaren, was auf ein

promiskuitives Paarungssystem schließen lässt. Bei den aus zwei Rüden bestehenden Koalitionen hat sich in allen Fällen nur ein Rüde erfolgreich fortgepflanzt.

Im Vergleich mit Rüden, die nicht in Koalitionen leben, wiesen Koalitionsrüden weder einen höheren Reproduktionserfolg (t-Test, $p > 0,05$) noch eine größere Anzahl an Verpaarungen (U-Test, $p > 0,05$) auf. Die Zugehörigkeit zu einer Koalition scheint folglich keinen Einfluss auf den Reproduktionserfolg zu haben. Wie die Ergebnisse der Verwandtschaftsanalyse zeigen, sind Koalitionsrüden in der Regel nicht nah miteinander verwandt. Verwandtschaftliche Nähe ist also nicht der Grund für die Bildung einer Koalition.

Summary

Mater semper certa? – Molecular biological analysis of a raccoon population (*Procyon lotor* Linné, 1758) in the Müritz National Park

141 raccoons of a free-ranging population in the Müritz National Park were genotyped at 10 microsatellite loci. Genetic data was used to assign parents to the sampled offspring to gain insight into the reproductive success of the adult animals.

Further, relatedness among adult animals was estimated on the basis of genetic data. Due to the high proportion of individuals sampled a dam could be assigned to 95 % (n = 75) of the young and a sire to 78 % (n = 62).

Results show that males as well as females mated with multiple mates, indicating a promiscuous mating system. In any observed male coalition, only one of the two males involved has mated successfully.

In comparison with solitary males, coalition forming males neither had an increased reproductive success (t-test, $p > 0,05$) nor did they mate with more females (U-test, $p > 0,05$). Hence the formation of a coalition does not appear to have an impact on reproductive success. Kinship analysis showed that male coalitions are not generally composed of close kins. Thus relatedness is not the reason for forming a coalition.

Literatur

- BLOUIN, M.S. (2003): DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. – *TREE* **18**/10: 503–511.
- BOUTIN-GANACHE, I.; RAPOSO, M.; RAYMOND, M.; DESCHÉPER, C.F. (2001): M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analysis performed with two different allele-sizing methods. – *Biotechniques* **31**/1: 24–28.
- CARO, T.M. (1994): Cheetahs of the Serengeti Plains: Group living in an asocial species. – Chicago.
- CLUTTON-BROCK, T.H. (1989): Mammalian mating systems. – *Proc. R. Soc. Lond. B* **236**: 339–372.
- CULLINGHAM, C.I.; KYLE, C.J.; WHITE, B.N. (2006): Isolation, characterization and multiplex genotyping of raccoon tetranucleotide microsatellite loci. – *Mol. Ecol. 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. – *Mol. Ecol.* **17**: 4874–4886.
- ENGELMANN, A.; KÖHNEMANN, B. et MICHLER, F.-U. (2011): Analyse von Exkrementen gefangener Waschbären (*Procyon lotor* L., 1758) aus dem Müritz-Nationalpark (Mecklenburg-Vorpommern) unter Berücksichtigung individueller Parameter. – *Beitr. Jagd- u. Wildforsch.* **36**: 587–604.
- 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.
- FIKE, J.A.; DRAUCH, A.M.; BEASLEY, J.C.; DHARMARAJAN, G.; RHODES J. O.E. (2007): Development of 14 multiplexed microsatellite loci for raccoons *Procyon lotor*. – *Mol. Ecol. Notes* **7**/3: 525–527.
- GEHRT, S.D.; FOX, L.B. (2004): Spatial patterns and dynamic interactions among raccoons in eastern Kansas. – *Southwest. Nat.* **49**/1: 116–121.
- GEHRT, S.D.; FRITZELL, E.K. (1997): Sexual differences in home ranges of raccoons. – *J. Mammal.* **78**/3: 921–931.
- GEHRT, S.D.; FRITZELL, E.K. (1998a): Duration of familial bonds and dispersal patterns for raccoons in south Texas. – *J. Mammal.* **79**/3: 859–872.
- GEHRT, S.D.; FRITZELL, E.K. (1998b): Resource distribution, female home range dispersion and male spatial interactions: group structure in a solitary carnivore. – *Anim. Behav.* **55**: 1211–1227.
- GEHRT, S.D.; GERGITS, W.F.; FRITZELL, E.K. (2008): Behavioural and genetic aspects of male social groups in raccoons. – *J. Mammal.* **89**/6: 1473–1480.
- HAUVER, S.A. (2008): Genetic determinants of raccoon social behaviour in a highly urbanized environment. – Dissertation Ohio State University, 112 S.
- HOHMANN, U. (1998): Untersuchungen zur Raumnutzung des Waschbären (*Procyon lotor* L. 1758) im Solling, Südniedersachsen, unter besonderer Berücksichtigung des Sozialverhaltens. – Dissertation Universität Göttingen, 153 S.
- HOHMANN, U. (2000): Raumnutzung und Sozialsystem des Waschbären in Mitteldeutschland. – *Wildbiologie* **3**: 1–16.
- JENNIONS, M.D.; PETRIE, M. (2000): Why do females mate multiply? A review of genetic benefits. – *Biol. Rev.* **75**: 21–64.
- KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. – *Mol. Ecol.* **16**: 1099–1106.
- KÖHNEMANN, B.A.; MICHLER, F.U. (2009): Sumpf- und Moorlandschaften der nordost-deutschen Tiefebene – Idealhabitate für Waschbären (*Procyon lotor* L. 1758) in Mitteleuropa. – *Beitr. Jagd- u. Wildforsch.* **34**: 511–524.
- KONOVALOV, D.A.; MANNIG, C.; HENSHAW, M.T. (2004): KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. – *Mol. Ecol. Notes* **4**: 779–782.
- 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 Technische Universität Dresden.
- MICHLER, F.U.; HOHMANN, U.; STUBBE, M. (2004): Aktionsräume, Tagesschlafplätze und Sozialsystem des Waschbären (*Procyon lotor* Linné 1758) im urbanen Lebensraum der Großstadt Kassel (Nordhessen). – *Beitr. Jagd- u. Wildforsch.* **29**: 257–273.
- MICHLER, F.U.; KÖHNEMANN, B.A.; GABELMANN, K.; SCHÄUBLE, D.; ORTMANN, S.; 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.
- PACKER, C.; GILBERT, D.A.; PUSEY, A.E.; O'BRIEN, S.J. (1991): A molecular genetic analysis of kinship and cooperation in African lions. – *Nature* **351**: 562–565.
- RILEY, S.P.D.; HADDIDIAN, J.; MANSKI, D.A. (1998): Population density, survival, and rabies in raccoons in an urban national park. – *Can. J. Zool.* **76**: 1153–1164.
- ROY NIELSEN, C.L.; NIELSEN, C.K. (2007): Multiple paternity and relatedness in southern Illinois raccoons (*Procyon lotor*). – *J. Mammal.* **88**/2: 441–447.
- ŚLASKA, B.; JEZEWSKA, G. (2008): Bi-paternal litter in fenn raccoon (*Nyctereutes procyonides* Gray 1834) detected by polymorphic DNA markers. – *Folia biologica* **56**: 193–195.
- WOLFF, J.O.; MACDONALD, D.W. (2004): Promiscuous females protect their offspring. – *TREE* **19**/3: 127–134.
- ZEH, J.A.; ZEH, D.W. (1996): The evolution of polyandry I: intragenomic conflict and genetic incompatibility. – *Proc. R. Soc. Lond. B* **263**: 1711–1717.

Anschriften der Verfasser:

Dipl.-Umw. SUSANNE GRAMLICH*
Dr. HOLGER SCHULZ
Universität Koblenz-Landau
Institut für Umweltwissenschaften
Forststraße 7
D-76829 Landau
E-Mail: gramlich@projekt-waschbaer.de

Dipl.-Biol. BERIT A. KÖHNEMANN*
Dipl.-Biol. FRANK-UWE MICHLER*
Technische Universität Dresden
Institut für Forstzoologie,
Arbeitsgruppe Wildtierforschung Tharandt
nstitut für Forstzoologie
Piener Straße 7
D-01737 Tharandt

* Forschungsstation „Projekt Waschbär“
Goldenbaum 38
D-17237 Carpin
Tel.: +49 (0) 39821-41382
Fax: +49 (0) 39821-41539
E-Mail: info@projekt-waschbaer.de
www.projekt-waschbaer.de