



Universität Koblenz-Landau, Campus Landau, Institut für
Umweltwissenschaften
Studiengang Diplom-Umweltwissenschaften

**Analyse der Verwandtschaftsbeziehungen
und des individuellen Fortpflanzungserfolges in einer
Waschbärpopulation (*Procyon lotor*, L.1758)
im Müritz-Nationalpark (Mecklenburg-Vorpommern)**

DIPLOMARBEIT

vorgelegt von
Anja Peter

1. Prüfer: Dr. Holger Schulz

Universität Koblenz-Landau, Campus Landau, Institut für Umweltwissenschaften

2. Prüfer: Prof. Dr. Ralf Schulz

Universität Koblenz-Landau, Campus Landau, Institut für Umweltwissenschaften

Landau, September 2009

Diese Diplomarbeit wurde gefördert durch

- die Dr. Gustav Bauckloh Stiftung - Gemeinnützige Stiftung zur Förderung des Natur- und Tierschutzes, Dortmund
- sowie von der Paul und Yvonne Gillet-Stiftung, Edenkoben

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Untersuchungsorganismus.....	3
2.2 Untersuchungsgebiet, Aktionsraumüberlappungen und Sozialsystem ..	5
2.3 Mikrosatellitenanalyse	7
2.4 Ziel dieser Arbeit.....	7
3 Material und Methoden	9
3.1 Probenumfang und Probennahme	9
3.2 Labormethoden.....	10
3.2.1 DNA-Extraktion mit NucleoSpin Tissue Kit	10
3.2.2 DNA-Konzentration mit NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer ..	11
3.2.3 Amplifizierung.....	11
3.2.4 Fragmentlängenbestimmung	14
3.3 Auswertung.....	15
4 Ergebnisse	17
4.1 Genetische Diversität.....	17
4.2 Heterozygotie.....	17
4.3 Hardy-Weinberg-Test	19
4.4 Abstammungsanalyse	19
4.5 Hauptkomponentenanalyse	24
4.6 Relatedness.....	26
4.7 Mehrfachvaterschaft bei Wüfen.....	31
5 Diskussion	33
5.1 Genetische Diversität und genetische Variabilität	33
5.2 Abstammungsanalyse	35
5.3 Mehrfachvaterschaft bei Wüfen.....	39
5.4 Fazit.....	40

Abkürzungsverzeichnis

BP	Basenpaare
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLS	Samples Loading Solution
TBE	Tris-Borat- EDTA-Puffer

Abbildungsverzeichnis

Deckblatt-Hintergrundbild: Waschbär (Quelle: <http://www.projekt-waschbaer.de/stand-der-wissenschaft/>)

Abb. 1: Waschbär (Foto: Projekt Waschbär)	3
Abb. 2: Waschbärfähe mit Jungtier (Foto: Projekt Waschbär).....	3
Abb. 3: Lage des Untersuchungsgebietes Nationalpark-Müritz; (Quelle: www.nationalpark-mueritz.de/?id=25&file=karte&lang, Datum des Abrufs: 17.09.09).....	5
Abb. 4: Probennahme, Waschbär (ID 5002) in Narkose (Quelle: http://www.projekt-waschbaer.de/forschungsschwerpunkte/ Datum des Abrufs: 29.08.09)	9
Abb. 5: Foto Gelelektrophorese – charakteristische Banden des Locus PLO-M3, in der ersten Bahn ist jeweils die DNA-Leiter zu erkennen.....	14
Abb. 6: Beispiel für ein Elektropherogramm; der blaue Peak zeigt ein homozygotes Tier mit einem Allel von 295 BP; die schwarzen Peaks zeigen ein heterozygotes Tier mit zwei deutlichen eigenständigen Peaks mit einem Allel mit 303 BP und ein Allel mit 311 BP. Der Size-Standard ist rot dargestellt.	16
Abb. 7: PCA aller Waschbärindividuen	24
Abb. 8: PCA der Koalitionen aus Tabelle 10; die einzelnen Koalitionen sind in Farben unterteilt. Rot = Koalition 1, grün = Koalition 2, blau = Koalition 3.	25

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Liste der verwendeten Mikrosatelliten-Paare.	12
Tab. 2: PCR-Programm	13
Tab. 3: Allelhäufigkeiten pro Locus; Die Anzahl der Individuen beträgt 93.	17
Tab. 4: Beobachtete und erwartete Heterozygotiewerte	17
Tab. 5: Genetische Variabilität untersuchter Waschbärpopulationen: Waschbärpopulation vom Müritz-Nationalpark (93 Individuen), Cullingham et al. (2006) (80 Individuen), Cullingham et al. (2008) (Niagara-Tiere: 292 Individuen, St. Lawrence-Tiere: 587 Individuen) und Fike et al. (2007) (29 Individuen) sowie Hauver (2008) (52 Individuen) im Vergleich.	18
Tab. 6: Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	19
Tab. 7: Ergebnistabelle der von Cervus ermittelten Mütter- und Väterkandidaten und den Kandidaten aus Beobachtungen und Vermutungen (mündlich, Frank Michler).....	20
Tab. 8: Ergebnistabelle nach CERVUS nach Eingabe der bekannten Muttertiere um die Vätertierkandidaten zu ermitteln; bei den Tieren, bei denen keine Angabe des Muttertieres steht, wurde keine Annahme getroffen.....	22
Tab. 9: Ergebnisse der Parent Pair Analyse durch CERVUS 3.0.....	23
Tab. 10: Bekannte Koalitionen einiger Waschbären, die in die PCA eingesetzt wurden.	25
Tab. 11: Koalitionen, die bei den Voruntersuchungen des Projekt Waschbär beobachtet wurden; in einer Reihe stehen jeweils die Tier-ID's der bekannten Koalitionen	26
Tab. 12: Auflistung der bekannten Waschbär-Würfe; einzelne Würfe wurden in Kästchen eingeteilt.	27
Tab. 13: Tabelle der Ergebnisse der Relatednesswerte r der bekannten Koalitionen	28
Tab. 14: Ergebnistabelle 1 des U-Test nach Mann & Whitney der Relatedness- Werte aller Tiere im Vergleich zu den Relatedness-Werten der Koalitionen	29
Tab. 15: Ergebnistabelle 2 des U-Test nach Mann & Whitney der Relatedness- Werte aller Tiere im Vergleich zu den Relatedness-Werten der Koalitionen	30
Tab. 16: Ergebnistabelle 1 des U-Test nach Mann & Whitney der Relatedness- Werte aller Tiere im Vergleich zu den Relatedness-Werten der Würfe.....	30
Tab. 17: Ergebnistabelle 2 des U-Test nach Mann & Whitney der Relatedness- Werte aller Tiere im Vergleich zu den Relatedness-Werten der Würfe.....	30
Tab. 18: Tabelle der bekannten einzelnen Würfe mit den zugehörigen Muttertierkandidaten (CERVUS-Berechnung und Annahme aus den Voruntersuchungen) sowie den ermittelten wahrscheinlichsten Vätertierkandidaten; die einzelnen Würfe sind jeweils in ein Kästchen geschrieben.	31
Tab. 19: Fragmentlängen der Waschbärenproben an den Loci PLO-M3, PLO- M2, PLO-M17, PLOT-10.....	48
Tab. 20: Fragmentlängen der Waschbärenproben an den Loci PLO-M3, PLO- M2, PLO-M17, PLOT-10.....	49
Tab. 21: Fragmentlängen der Waschbärenproben an den Loci PLOT-06, PLOT- 08, PLO2-123, PLO3-86	50
Tab. 22: Fragmentlängen der Waschbärenproben an den Loci PLOT-06, PLOT- 08, PLO2-123, PLO3-86	51

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zur Analyse der Verwandtschaftsbeziehungen und des individuellen Fortpflanzungserfolges einer Waschbärpopulation des Müritz-Nationalparks wurde durchgeführt im Rahmen des „Projekt Waschbär“, einer wildbiologischen Forschungsstudie, bei der grundlegende Daten zur Populationsökologie und zum Raum- und Sozialverhalten des Waschbären aufgenommen werden. Der Waschbär (*Procyon lotor*) zählt als heimische Tierart nach Bundesnaturschutzgesetz (BNatSchG §10 Abs. 2 Nr..5b) seit über 70 Jahren zu den Tieren Deutschlands und zeigt ein weites Verbreitungsgebiet. Als Untersuchungsgebiet diente der Müritz-Nationalpark, hier besonders der Seehraner Teil. Der Müritz-Nationalpark befindet sich im Nordosten Deutschlands in Mecklenburg-Vorpommern. Um die telemetrischen Daten zu vervollständigen, wurde in dieser Arbeit eine genetische Analyse durchgeführt. Es wurden 93 Tiere, hiervon 40 Jungtiere und 53 adulte Tiere, an acht Loci analysiert. Hierfür wurde zuerst eine Gewebeprobe entnommen, anschließend die DNA extrahiert und im Folgenden mittels PCR an acht Loci amplifiziert. Im Anschluss wurde eine Fragmentlängenanalyse durchgeführt. Mit deren Ergebnissen wurden Allelanzahl, Allelhäufigkeiten, erwartete und beobachtete Heterozygotie, Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und Relatednesswerte berechnet und Abstammungsanalysen durchgeführt. Es wurden im Mittel 7,75 Allele gefunden. Die Loci weichen nicht signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab. Für die beobachtete Heterozygotie ergaben sich durchschnittliche Werte von 0,603 und für die erwartete Heterozygotie ein Wert von 0,633. Da der beobachtete Wert höher als der erwartete war, kann man davon ausgehen, dass ein genetischer Austausch stattfindet. Sowohl die Allelanzahlen als auch die Heterozygotiewerte liegen im Mittel ungefähr gleich mit anderen Studien. Durch die Mikrosatellitenanalyse sollen weitere Aufschlüsse gebracht werden über das komplexe Sozialsystem der dortigen Waschbärpopulation. Mittels Abstammungsanalysen wurde versucht eindeutige Elterntiere der Jungtiere festzulegen. Es ließen sich wahrscheinliche Elterntierkandidaten nennen, auch konnten bereits vermutete Muttertiere mit bestimmten Wahrscheinlichkeiten bestätigt werden. Ebenso wurde mithilfe einer

Parentage-Analyse auch versucht Mehrfachvaterschaften innerhalb einzelner Würfe festzustellen. Hierbei kamen mehrere Vaterkandidaten für die einzelnen Würfe in Frage, die auch mittels manueller Auswertung nicht ausgeschlossen werden konnten. In den telemetrischen Voruntersuchungen wurde auch beobachtet, dass sich immer wieder Koalitionen von Rüden bilden. Warum sich diese Koalitionen bilden ist noch weitgehend unerforscht. In dieser Studie wurde versucht anhand der Relatedness-Werte eine Aussage darüber zu treffen, ob diese Koalitionen sich zufällig bilden oder ob es einen eventuellen Verwandtschaftshintergrund gibt. Es ließen sich genetische Ähnlichkeiten einzelner Tiere feststellen, aber auch Koalitionen, die geringere genetische Ähnlichkeiten aufwiesen. So scheint der genetische Faktor nicht zwingend der entscheidende Faktor für eine derartige soziale Bindung zu sein.

2 Einleitung

2.1 Untersuchungsorganismus

Seit dem letzten Jahrhundert zählt man den Nordamerikanischen Waschbär (*Procyon lotor*, Linné 1758) zum festen Bestandteil der heimischen Raubsäugerfauna (Lutz 1996). Er gehört zur Klasse der Säugetiere (Mammalia), Ordnung der Raubtiere (Carnivora) und der Familie der Kleinbären (Procyonidae).

Zur Geschichte der Waschbären in Deutschland ist zu sagen, dass eine erste erfolgreiche Einbürgerung des Waschbären am Edersee in Nordhessen 1934 erfolgte und deren Nachkömmlinge Mitteldeutschland und die Anrainerstaaten Deutschlands bevölkerten (Hohmann and Bartussek 2005). Durch einen Bombenangriff östlich von Berlin kamen im Jahre 1945 25 Käfigtiere frei und besiedelten den Raum Brandenburg und Vorpommern (Hohmann and Bartussek 2005). Heutzutage findet man eine freilebende mitteleuropäische Population und der Waschbär gilt als naturalisiert und wird zum festen Bestandteil der europäischen Fauna gezählt (Michler 2003). Laut Bundesnaturschutzgesetz (BNatSchG § 10 Abs. 2 Nr. 5b) hat der Waschbär nach bundesdeutschem Recht den Status „heimische Art“ erreicht.



Abb. 1: Waschbär (Foto: Projekt Waschbär)

Der Waschbär ist wie die meisten anderen Arten der *Procyonidae* nachtaktiv und seine Anwesenheit in naturnahen Habitaten wird durch die versteckte Lebensweise selten bemerkt (Kampmann 1975).



Abb. 2: Waschbärfähe mit Jungtier (Foto: Projekt Waschbär)

In europäischen Breiten findet die Reproduktionsphase der Waschbären ungefähr Anfang Februar statt, wobei die Waschbärweibchen dann für wenige Tage empfängsbereit sind und werden zu diesem Zeitpunkt von mehreren Männchen begattet (Muschik 2008). Die juvenilen Rüden weisen im Gegensatz zu den juvenilen Waschbärweibchen eine verzögerte Geschlechtsreife auf, d.h. drei bis vier Monate nach der ersten Ranz (Fritzell 1978b). Normalerweise reproduzieren Waschbären einmal im Jahr (Muschik 2008). Im Mittel werden 3-4 Jungtiere geboren, nachdem die Tiere ca. 63 Tage ausgetragen haben; diese werden mindestens vier Monate gesäugt und innerhalb der ersten Monate halten sie sich in der Wurfhöhle auf (Muschik 2008). Nachdem sie ihren Wurfplatz verlassen haben, streifen sie mit ihrer Mutter umher, um so das Gebiet und geeignete Schlafplätze und Ressourcenquellen kennen zu lernen, wobei die Rüden an der Aufzucht nicht beteiligt sind (Muschik 2008).

In der Literatur findet man Angaben, dass der Waschbär neben diesen Mutterfamilien als Einzelgänger beschrieben wird (Muschik 2008) und dass Territorien der Männchen die Streifgebiete von ca. zwei bis drei Weibchen umfassen. Ergebnisse in Amerika zeigen, dass Waschbärmännchen im subtropischen Texas und bei Dichten von 4 bis 12 Individuen/100 ha Gruppenterritorien aufweisen. Gehrt und Fritzell (1999) beschreiben eine Gruppe von Waschbären als „male-social-group“, hier können bis zu sechs

Männchen zusammenleben (Gehrt and Fritzell 1999). Ebenso lebten Waschbären in Solling in engen sozialen Verbänden, vor allem fiel der Zusammenhalt zwischen Rüden auf (Hohmann and Bartussek 2005). Mehrere Rüden-Pärchen haben sich gebildet, was auch in der untersuchten Population im Müritz-Nationalpark beobachtet wurde (Michler, mündlich). Die einzelnen Gruppenterritorien beinhalten die Lebensräume von 7 bis 12 Weibchen (Michler and Köhnemann 2009). Dadurch dass die Nahrungsressourcen fleckenhaft auftreten, bilden die weiblichen Waschbären Ansammlungen und dies ermöglicht eine hohe Weibchenzahl. Waschbärweibchen kehren immer wieder zu ihrer Geburtskolonie zurück (Michler and Köhnemann 2009). Daher kommt es bei den Aggregationen in Texas vermutlich vornehmlich zu Weibchen, die einen hohen Verwandtschaftsgrad aufweisen, wohingegen die Männchen dieser Gruppe einen geringen Verwandtschaftsgrad aufweisen (Michler and Köhnemann 2009). Vereinzelt können auch solitäre Rüden auftreten, diese haben aber keinen Zugang zu den Weibchen (Michler and Köhnemann 2009). In der Literatur findet man Angaben, dass die geklumpfte Verteilung von Waschbärinnen sowie eine hohe Synchronität der weiblichen Sexualzyklen eine Monopolisierung aller Weibchen durch ein einzelnes dominantes Männchen unmöglich macht. Aus diesem Grunde sind Koalitionsbildungen unter männlichen Waschbären von Vorteil (Michler and Köhnemann 2009).

Das „Projekt Waschbär“ (www.projekt-waschbaer.de) wurde 2006 ins Leben gerufen, um die Bewegungen und Lebensweisen des Waschbären im Gebiet Müritz-Nationalpark zu dokumentieren. Initiatoren dieses Projektes sind Dipl.-Biol. Berit Köhnemann und Dipl.-Biol. Frank Michler. Es werden Daten zur Populationsökologie, zum Raum- und Sozialverhalten des Waschbären aufgenommen und ausgewertet; es sollen Aufschlüsse über das komplexe Sozialsystem der Waschbären gegeben werden. Um die aufgenommen Raumnutzungsdaten besser zu verstehen, werden molekularbiologische Untersuchungen angeschlossen.

Somit sollen die in dieser Diplomarbeit durchgeführten molekularbiologische Analysen der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der betrachteten Population Aufschlüsse über die Sozioethologie geben, indem durch Abstammungsanalyse Aussagen getroffen werden sollen über mögliche

Elterntiere und Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb beobachteter Koalitionen sowie über mögliche Mehrfachvaterschaften bei Würfen.

2.2 Untersuchungsgebiet, Aktionsraumüberlappungen und Sozialsystem

Als Untersuchungsgebiet diente der Müritz-Nationalpark, hier besonders der Sehrraner Teil. Der Müritz-Nationalpark befindet sich im Nordosten Deutschlands in Mecklenburg-Vorpommern. Er umfasst eine Gesamtfläche von 322 km² und ist somit auf die Landfläche bezogen der größte deutsche Nationalpark (www.nationalpark-mueritz.de).

Sowohl im 6200 ha große Sehrraner Teilgebiet als auch auf den angrenzenden Flächen von Carpin fanden die telemetrischen Voruntersuchungen statt (Muschik 2008).

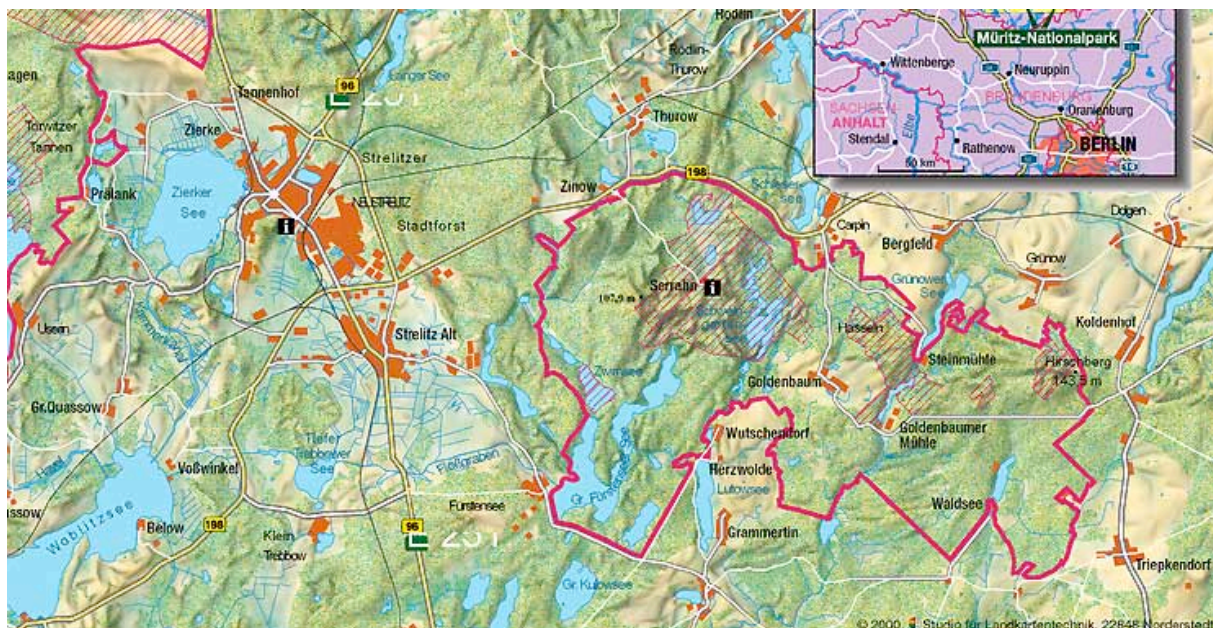


Abb. 3: Lage des Untersuchungsgebietes Nationalpark-Müritz; (Quelle: www.nationalpark-mueritz.de/?id=25&file=karte&lang, Datum des Abrufs: 17.09.09)

Aufgrund seines großen Reichtums an Feuchtlebensräumen (wie Moor- und Sumpfgebiet, Stauwassersenkungen, Sölle, 5 große Seen) und einer hohen Dichte an Nahrungs-, Schlaf- und Wurfplätzen stellt der Müritz Nationalpark, insbesondere der Sehrraner Teil, einen Raum mit sehr guten Lebensbedingungen für Waschbären dar (Köhnemann 2007). Das Gebiet das

vorwiegend von den untersuchten Waschbären genutzt wird, setzt sich zusammen aus 19% Grünland/Ackerland, 15% Gewässerstrukturen, 1% Zivilisationsstrukturen und 65% Wald (v.a. Rotbuchenbestände gefolgt von Kiefer, Birke, Fichte und sonstige (Muschik 2008). Der große Serrahnsee (größtes Verlandungsmoor im Untersuchungsgebiet) ist zu zwei Drittel verlandet und ist gekennzeichnet von Schilf- und Röhrichtkomplexen. Der Schweingartensee mit 47 m Tiefe, dient als Binnenentwässerungssee für angrenzende Moore mit flachen Uferbereichen. Dieser ist umgeben von Schilf und toten Birken. Ebenso findet man kleinere Inseln, die mit dem Schilfgürtel das Festland verbinden, wodurch diese Gebiete zu wichtigen Rückzugsplätzen der Waschbären werden. Das Niedermoor „Große Rieg“ besteht aus wässrigen Erlenbuchenwäldern, sowie aus Resten ehemaliger Feuchtwiesen. Feuchtsenken, Tümpel, Weiher und Sölle finden sich zwischen den Ortschaften Carpin und Goldenbaum. Wichtige Lebensstrukturen für die Waschbären sind Gräben, Bäche und Seenkette, da die einzelnen Feuchtgebiete so verbunden sind und die Waschbären sich so im Flachwasserbereich bewegen können (Köhnemann 2007; Muschik 2008).

Durch ein saisonal geprägtes Nahrungsangebot im Müritz-Nationalpark kommt es an den Ressourcenquellen zu vorübergehenden Aggregationen, wodurch sich auch die Streifgebiete einzelner Waschbären überlappen (Köhnemann 2007). Im untersuchten Gebiet zeigten Voruntersuchungen, dass die Aktionsräume einiger Waschbären weitgehend übereinstimmen und sich Koalitionen von Rüden bildeten (Köhnemann 2007). Während eines bestimmten Untersuchungszeitraumes zeigte sich ein Überlappungsgrad von 90 % der Streifgebietsfläche zweier Rüden; ebenso deutlich wurde, dass sie, durch nächtliche Ortungen sichtbar gemacht, zeitlich synchron umherstreifen (Köhnemann 2007). Diese Zweierkoalition wurde zeitweise noch von einem dritten Rüden begleitet (Köhnemann 2007). Hier ist es jetzt fraglich, ob sich diese Koalitionen aus Zufall zusammengefunden haben oder ob es sich bei dieser Verbindung eventuell um verwandte Tiere handelt, da immer wieder solche Koalitionen beobachtet werden. Eventuell begünstigt die Verwandtenselektion (kin selection) die Bildung von sozialen Beziehungen, bei der Tiere ihren Verwandten helfen und es zur Weitergabe des eigenen Erbgutes kommt. Somit ist es notwendig, um eine Aussage über die

Sozialstruktur der Waschbären im Müritz-Nationalpark zu treffen, eine Verwandtschaftsanalyse durchzuführen.

2.3 Mikrosatellitenanalyse

Anhand der Mikrosatellitenanalyse können aus verschiedenen unbekannten Individuen Verwandtschaften zugeordnet werden. Die Mikrosatelliten ermöglichen eine Zuordnung der Elternschaften und eine Wahrscheinlichkeitsberechnung der Verwandtschaft.

Mikrosatelliten sind kurze Abschnitte von sehr kurzen, nicht codierender Nukleotidsequenzen. Die Anzahl der Nukleotidsequenzen variiert zwischen Individuen oft stark, wodurch man von einem hohen Polymorphismus spricht (Schreiber and Lehmann 1997). Die repetitiven Sequenzen bestehen aus tandemartig hintereinander angeordneten, kurzen DNA-Motiven von wenigen Basen (Brown 2002). Dadurch eignen sie sich ideal als molekulare Marker zur Untersuchung des Genflusses. Als überwiegend kodominante Marker haben sie meistens einen biparentalen Vererbungsmodus. Dadurch sind sie insbesondere für Elternschaftsanalysen geeignet. Da die überwiegende Zahl von Mikrosatelliten wohl funktionslos ist, werden Häufigkeiten der Genotypen bei Mikrosatelliten vermutlich sehr gering durch Selektion verändert (BFH-Nachrichten 2007).

2.4 Ziel dieser Arbeit

Mit Hilfe von hochvariablen Mikrosatelliten versuche ich, verschiedene Fragestellungen zum sehr komplexen und variablen Sozialsystem der hier untersuchten Waschbären zu beantworten. In der Literatur findet man Arbeiten, die den Waschbär als Einzelgänger beschreiben bis hin zum Gruppentier.

Freilandökologische Untersuchungen von Gehrt (1994) und Hohmann (1998) zeigen erste Erkenntnisse zur Soziodynamik koalierender Rüden (Muschik 2008). Im Zuge der wildbiologischen Forschungsstudie „Projekt Waschbär“ im Müritz Nationalpark (Mecklenburg-Vorpommern) traten anhand der im Jahre 2007/2008 erhobenen Telemetriedaten Fragen und Vermutungen zum Sozialsystem der dortigen Waschbärpopulation auf. Um dieses Sozialsystem

nun hinreichend zu erforschen und zu interpretieren und um genaue Aussagen über die Verwandtschaftsbeziehungen zu machen, wurden Gewebeproben von telemetrisch untersuchten Tieren entnommen und mittels Fragmentlängenbestimmung auf Verwandtschaftsverhältnisse hin in dieser Arbeit überprüft. Dies wurde im Labor mittels molekularbiologischer Marker durchgeführt. Mikrosatelliten sind hochvariable Marker, die aus tandemartig hintereinander angeordneten kurzen DNA-Motiven von wenigen Basen bestehen. Sie weisen einige Charakteristika auf, wodurch sie sich hervorragend eignen als molekulare Marker zur Untersuchung von Elternschaftsanalysen. Folgende Fragestellungen, die sich diesen Voruntersuchungen mittels radiotelemetrischen Untersuchungen und Schlafplatzbeobachtungen ergeben haben, spielen hierbei eine bedeutsame Rolle: Zum einen stellt sich die Frage, wer die Vätertiere und Muttertiere der untersuchten Jungtiere sind. Ein weiterer zu betrachtender Gesichtspunkt ist, vorausgesetzt die beschriebenen Elternschaften stimmen zu, inwieweit kann man eine Aussage über den Fortpflanzungserfolg der einzelnen Tiere treffen. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Reproduktionserfolg und Alter? Weiterhin werde ich versuchen Aussagen darüber zu treffen, ob die Mitglieder der einzelnen Koalitionen miteinander verwandt sind. Weiterhin stellt sich die Frage ob Mehrfachvaterschaften bei den Würfen vorliegen.

3 Material und Methoden

3.1 Probenumfang und Probennahme

Der Stichprobenumfang betrug 93 Waschbären, von denen 40 Jungtiere waren und 53 adulte Tiere. Die adulten Tiere gliederten sich in 29 weibliche und 24 männliche Tiere, die als Mutter- bzw. Vatertiere in Betracht kamen.

Die Probennahme wurde von Mitarbeitern vor Ort des „Projekt Waschbär“ (www.projekt-waschbaer.de) im Müritz-Nationalpark durchgeführt. Nachdem die Tiere in selbstgebauten Kastenfallen gefangen wurden, erfolgte die weitere Bearbeitung der gefangenen Waschbären (siehe Abbildung 4) direkt am Fallenstandort.



Abb. 4: Probennahme, Waschbär (ID 5002) in Narkose (Quelle: <http://www.projekt-waschbaer.de/forschungsschwerpunkte/> Datum des Abrufs: 29.08.09)

Genauere Beschreibungen zu den Fang- und Markierungsmethoden sowie zur Telemetrie finden sich bei Köhnmann (2007). Nachdem den Tieren ein Anästhetikum verabreicht wurde, konnten die Tiere besendert, vermessen und markiert werden. Jedem Tier wurde eine eigene vierstellige

Identifikationsnummer (ID) zugewiesen. Für meine Laboranalyse wurden Gewebeproben des Lutealmuskels mittels einer Hautstanze (Biopsy Punch ø 6mm, Kruuse®) entnommen, die umgehend in ein 2 ml Probengefäß mit 99,9% vergälltem Ethanol (Roth) überführt wurden. Nach weiteren Untersuchungen, die für diese Diplomarbeit nicht relevant sind, wurden die Waschbären in eine separate, mit Heu gefüllte Aufwachkiste gelegt, aus der die Tiere nach Erwachen aus der Narkose wieder freigelassen wurden (Köhnemann 2007).

3.2 Labormethoden

3.2.1 DNA-Extraktion mit NucleoSpin Tissue Kit

Die DNA-Isolation aus den Hautstanze-Proben wurde mit dem NucleoSpin Tissue Kit von Machery Nagel durchgeführt. Zunächst wurden die noch vorhandenen Haare so gut wie möglich entfernt und anschließend etwa 20 mg Lutealmuskelgewebe mit dem Skalpell zerkleinert und 10 Minuten im Trockenschrank bei 50 °C vollständig vom Ethanol befreit. Dann wurde nach dem Standard-Protokoll von Machery Nagel fortgefahren (siehe Anhang A2 Protokolle). Es zeigte sich bei vorherigen Testproben, dass es ergiebiger ist, nach der Lyse in einer Proteinase K / SDS Lösung bei 70°C die Proben kurz zu zentrifugieren, um die noch vorhandenen Haare ab zu zentrifugieren. Der Überstand wurde in ein neues Probengefäß überführt und mittels Zugabe eines chaotropischen Salzes und Ethanol wurde die in Lösung befindliche DNA an die Silikatmembran gebunden. Um Verunreinigungen zu entfernen wurden zwei Waschküreten durchgeföhrt. Anschließend eluierte man die DNA in einem schwach alkalischen Puffer. An dem Standardprotokoll von Machery Nagel wurde der Elutionsschritt verändert, indem die Proben nach 5minütiger Inkubationszeit 2mal mit 50 µl BE-Puffer eluierte, so dass am Ende 100 µl DNA-Lösung vorlagen.

3.2.2 DNA-Konzentration mit NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer

Im Anschluss an die Extraktion wurde die DNA-Konzentration mit dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (PqLab) bei Wellenlängen von 230 nm bis 300 nm bestimmt. Die Konzentration bei der Ausgabe des NanoDrop ND-1000 in ng/μl bezieht sich auf die Absorption bei 260 nm. 1 μl der Probe wurden direkt auf die Messoberfläche pipettiert. Durch die Oberflächenspannung entsteht eine Flüssigkeitssäule zwischen den optischen Fasern des Spektralphotometers, die den Messweg darstellt. Als Qualitätskriterium wurde die Reinheit der DNA-Lösung berechnet aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm. Wenn dieses Verhältnis einem Wert zwischen 1,8 und 2 annahm, konnte die DNA als „rein“ angesehen werden und für weitere Arbeitsschritte verwendet werden (siehe Anhang A2 Protokolle). Das Isolat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.3 Amplifizierung

Zunächst wurden alle DNA-Proben auf eine Konzentration von 20 ng/μl mit ddH₂O verdünnt, da die vorliegenden Konzentrationen zwischen 30 und 400 ng/μl betrugen. Bei der Auswahl an Mikrosatelliten griff ich auf bereits bekannte Primersequenzen zurück (Cullingham, Kyle et al. 2006; Fike, Drauch et al. 2007), die eine hohe Allelzahl aufwiesen.

Von den insgesamt getesteten 15 Primerpaaren erwiesen sich 8 als brauchbar, die in Tabelle 1 aufgelistet sind. Keine Ergebnisse lieferten die Primer PLO3-117, PLO-M15, PLO2-117, PLO3-71, PLO-M20 und PLO3-C (Cullingham, Kyle et al. 2006) sowie PLOT-14 (Fike, Drauch et al. 2007).

Die PCR wurde mit dem Thermocycler Primus 96 von PqLab in einem Ansatz mit dem Gesamtvolumen von 15 μl durchgeführt bestehend aus 1 μl DNA [20 ng/μl], 3 μl PCR-Puffer [5 x] (Promega), 0,75 μl MgCl₂ [1,5 mM] (Promega), 0,12 μl dNTPs [25 mM/l] (Fermentas), 0,075 μl Taq [5 u/μl] (Promega), 0,15 μl fluoreszenzmarkiertem M13-Primer und Reverse-Primer [jeweils 100 pmol/μl], 0,3 μl Forward-Primer [10 pmol/μl] und 9,455 μl ddH₂O. Zur späteren Detektion

der PCR-Produkte wurde an jeden Forward Primer die M13-Sequenz CACGACGTTGTAAAACGAC angehängen. Dieser konnte sich dann an den fluoreszenzmarkierten M13-Primer anlagern. Die Farbstoffe Cy5 (blau), Cy5.5 (grün) und Cy7 (schwarz), mit denen die einzelnen Primer kombiniert wurden, sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Diese Farbstoffe wurden mit den einzelnen Primern kombiniert, damit ein Multiplex-Ansatz durchgeführt werden konnte und somit bis zu 3 Proben zusammen angesetzt werden konnten und dann in der Auswertung farblich auseinander gehalten wurden anhand der unterschiedlichen Farbstoffe. In den Tabellen sind die einzelnen Primer-Sequenzen ohne die angehängte M13-Sequenz aufgeführt.

Tab. 1: Liste der verwendeten Mikrosatelliten-Paare.

Locus	Primer-Sequenz (5'-3')	Farbstoff	T _a [°C]	Allel-Größe [Bp]	Referenz
PLO-M2	F:GGAAAACACAGAGAGACGG R:CTTGGCACAGAGCAGAATCC	Cy 7	56	281–329	Cullingham et al.. (2006)
PLO-M3	F:CTCCCATCTTCCTCTTTTCG R:GTTGACAATTGCAGGACCAC	Cy 5	56	266–286	Cullingham et al.. (2006)
PLO-M17	F:CTGCTGAGTAAGGAGTAAGG R:TCCCCTGTACATATTCAGGC	Cy 7	56	284–354	Cullingham et al.. (2006)
PLOT-06	F:TAGCATGCAACTCCTCATCC R:TGGAGAGAAAATCCCACAGAC	Cy 7	63	161–173	Fike et al.. (2007)
PLOT-08	F:TGTCTGTTAGACCACAGAAGTCC R:ATTAAATATAATAGGACAGGGTGTGC	Cy 5.5	63	236–256	Fike et al.. (2007)
PLOT-10	F:ACTCTTGCCTGGACTCATCC R:ATGCCAATCAGGCTCATACC	Cy 5.5	63	146–178	Fike et al.. (2007)
PLO2-123	F:GTCTACTCAGTGCATAGCATTGTGC R:TTCCTGCAATGTCCTCTAACTG	Cy 5.5	56	579–619	Cullingham et al.. (2006)
PLO3-86	F:GATTGATAGATTAATTGGTCTTAACTTCC R:CTGGATTATAAATCTGGCAAGAGCC	Cy 7	56	301–460	Cullingham et al.. (2006)

F: forward; R = reverse; T_a = Annealing-Temperatur

Zur Optimierung des PCR-Protokolles, d. h. um die bestmögliche Annealing-Temperatur zu ermitteln, wurde ein Vortest (Gradienten-PCR-Lauf) durchgeführt. Ausgehend von der Annealing-Temperaturangabe des Herstellers wurde eine Gradienten-PCR laufen lassen in jeweils 2,5°C Schritten ober-/und unterhalb der vorgegebenen Annealing-Temperatur. Aus diesem Vortest ergab sich die Annealing-Temperatur, die in Tabelle 1 aufgelistet ist.

Das angewendete PCR-Programm ist in Tabelle 2 aufgelistet.

Tab. 2: PCR-Programm

	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Zyklen
	95	2:00	1
1. Denaturierung	95°C	0:30	40
2. Annealing	x	0:30	
3. Extending	72	0:30	
	72	5:00	1
Abkühlen	8	Bis ∞	1

x = 56 oder 63°C (Annealingtemperatur wurde je nach Primerpaar variiert, siehe Tabelle X)

Zur Überprüfung der PCR-Amplifikation wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Mülhardt 2000) aufgetrennt. Hierzu wurden 2 %ige Agarosegele aus 1 g Agarose (Peqlab), 50 ml TBE-Puffer [0,5 x] (Zusammensetzung siehe Anhang) und 3 µl Ethidiumbromid [10 µg/ml] (Roth) verwendet. 10 µl des erhaltenen PCR-Produktes wurden zusammen mit 2 µl Ladepuffer (Zusammensetzung siehe Anhang) auf das Gel aufgetragen, das in einer Gelkammer (Labnet) gefüllt mit 0,5 x TBE-Puffer lag. Die Elektrophorese lief 45 Minuten bei 90 V. Zur Größenabschätzung lief pro Reihe eine 100-Bp

Leiter (Roth) mit. Anschließend wurde unter UV-Licht das Gel betrachtet und ein Foto gemacht, wie in Abbildung 5 dargestellt. Für die Fragmentlängenanalyse, d.h. die Bestimmung der Längen der einzelnen Mikrosatelliten-Allele, wurden alle Proben verwendet, die deutliche Banden in dem erwarteten Bereich aufwiesen. Proben, die keine Banden zeigten, mussten erneut in einer PCR wiederholt werden.

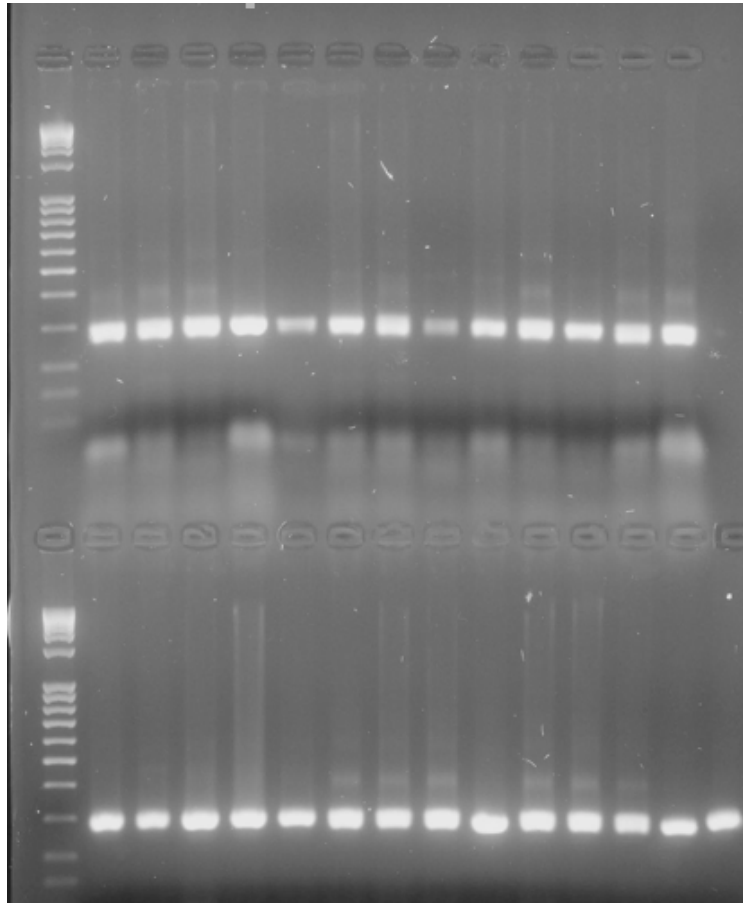


Abb. 5: Foto Gelelektrophorese – charakteristische Banden des Locus PLO-M3, in der ersten Bahn ist jeweils die DNA-Leiter zu erkennen.

3.2.4 Fragmentlängenbestimmung

Die Fragmentlängenbestimmung wurde mit dem Gerät CEQ 8000 Genetic Analysis System von Beckman Coulter durchgeführt. Die DNA-Fragmente wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Als Protokoll wurde das GenomeLab™ Fragment Analysis Protocol von Beckman Coulter (siehe Anhang) angewendet. Hiervon abweichend wurden pro Reihe 240 µl SLS (Beckman Coulter) und 4 µl Size-Standard 400 bzw. 600 (Beckman Coulter)

verwendet. Es wurden Multiplex-Ansätze gewählt mit bis zu drei Farbstoffen, wobei die einzelnen Primer immer mit derselben Farbe kombiniert wurden um mögliche Schwankungen auszugleichen. Von den PCR-Produkten, die mit Cy 5 markiert waren, wurde jeweils 1 µl verwendet, von den mit Cy 5.5 und Cy 7 markierten jeweils 2 µl, da diese Konzentration in Vorversuchen die besten Ergebnisse zeigten. Die Fragmentlängenbestimmung wurde von allen Proben drei Mal wiederholt.

3.3 Auswertung

Die Bestimmung der Fragmentlängen erfolgte mit der Software CEQ 8000 Series Genetic Analysis System Software V9.0 (Beckman Coulter). Das Gerät ermittelt genaue Fragmentlängen. Ein Beispiel für ein Elektropherogramm stellt Abbildung 6 dar. An den Peaks konnten die Fragmentlängen der jeweiligen Allele abgelesen werden. Hier sieht man die Allele dreier Loci. Der Größenstandard ist rot dargestellt. Als Peaks gewertet wurden nur diejenigen, die eine hohe Intensität zeigten und nach diesem Maximum einen starken Abfall der Kurve aufwiesen.

Nun wurden die ermittelten Fragmente der jeweiligen Loci zur weiteren Auswertung in eine Tabelle (siehe Anhang) überführt. Zuerst wurde die genetische Diversität untersucht. Mittels des Programmes GenAlEx 6.1 (Peakall and Smouse 2006) wurde die Anzahl der Allele, die beobachtete und erwartete Heterozygotie berechnet. Um die Häufigkeiten der Heterozygoten festzustellen, erfolgte der Test auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit dem Programm ARLEQUIN 3.11 (Schneider, Roessli et al. 2000).

Ebenso wurden die Ergebnisse der Allelverteilung der einzelnen Waschbären in das Programm CERVUS 2.0 (Marshall, Slate et al. 1998; Kalinowski, Taper et al. 2007) zwecks Analyse der Allelfrequenzen und der Verwandtschaftsanalysen eingegeben. Zunächst erfolgte im Programm CERVUS 2.0 eine Simulation der Abstammungsanalyse, welche die Aussagefähigkeit der benutzen Auswahl an Markern überprüft. Diese Simulation wird auch benötigt, um weitere Abstammungsanalysen durchzuführen wie Maternity und Paternity Analysis. Hier wird dann die korrekte Zuweisung der Mutter bzw. des Vaters zu den Jungtieren zunächst ohne eine vorherige Annahme der Verwandtschaftsbeziehungen überprüft. Im Anschluss

wurden einige Annahmen von Muttertieren getroffen um dann die Väter zu analysieren.

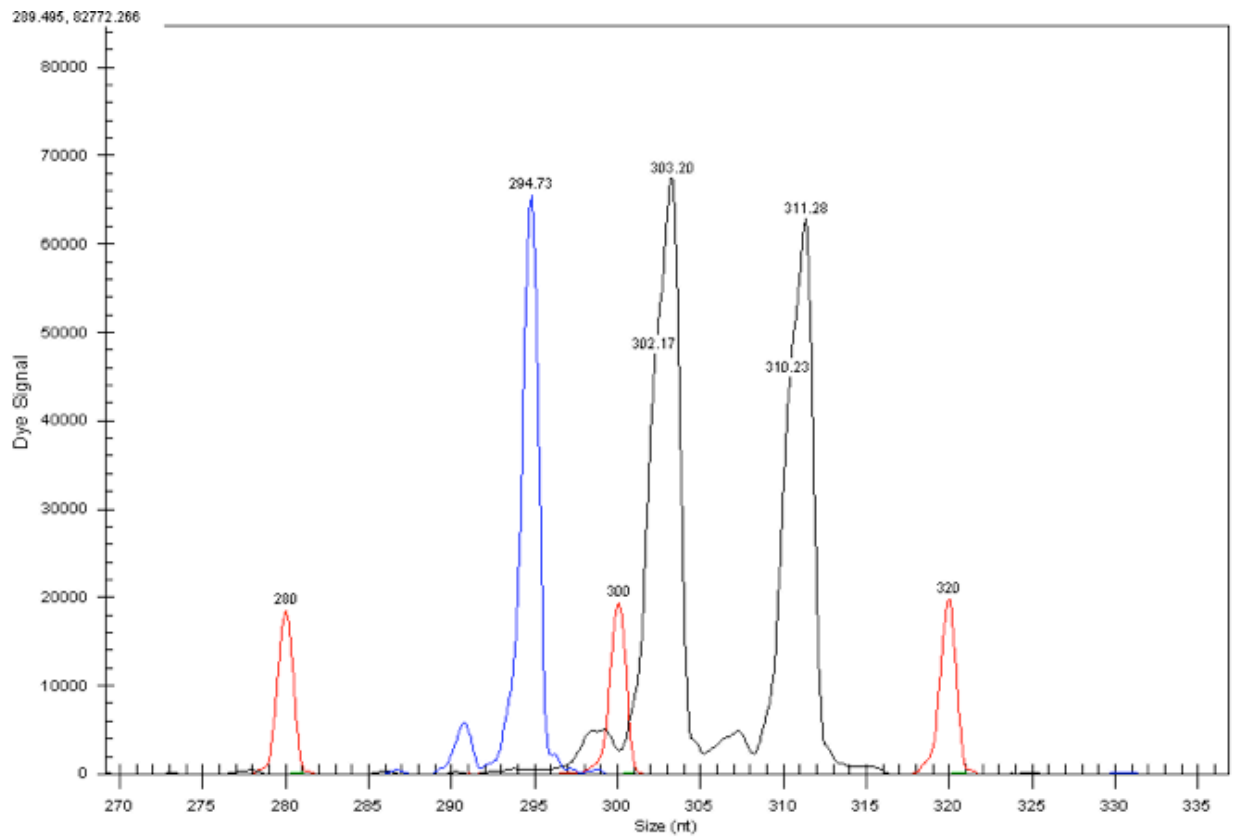


Abb. 6: Beispiel für ein Elektropherogramm; der blaue Peak zeigt ein homozygotes Tier mit einem Allel von 295 BP; die schwarzen Peaks zeigen ein heterozygotes Tier mit zwei deutlichen eigenständigen Peaks mit einem Allel mit 303 BP und ein Allel mit 311 BP. Der Size-Standard ist rot dargestellt.

Im Programm KINGROUP v2_090501 (Konovalov, Manning et al. 2004) wurden die Daten eingelesen, um die Relatedness-Werte zu ermitteln und dann in dem Programm PASW Statistics 17.0 (Version 17.0.2) auf Normalverteilung zu prüfen und einen U-Test durchzuführen.

4 Ergebnisse

4.1 Genetische Diversität

Insgesamt wurden 93 Waschbären an 8 Mikrosatelliten-Loci untersucht. In nachfolgender Tabelle 3 ist die Anzahl der gefundenen Allele pro Locus aufgelistet. Die einzelnen Werte variieren von 4 bis 20. Im Durchschnitt werden 7,75 Allele pro Primerpaar beobachtet.

Tab. 3: Allelhäufigkeiten pro Locus; Die Anzahl der Individuen beträgt 93.

Locus	Anzahl der Allele pro Locus
PLO-M3	5
PLO-M2	10
PLO-M17	5
PLOT-10	5
PLOT-06	7
PLOT-08	6
PLO2-123	4
PLO3-86	20

4.2 Heterozygotie

Tab. 4: Beobachtete und erwartete Heterozygotiewerte

Locus	H _o	H _e
PLO-M3	0,495	0,492
PLO-M2	0,817	0,793
PLO-M17	0,828	0,759
PLOT-10	0,645	0,613
PLOT-06	0,624	0,542
PLOT-08	0,484	0,454
PLO2-123	0,290	0,297
PLO3-86	0,882	0,870

	H _o	H _e
Mean	0,633	0,603
SE	0,072	0,069

H_o = beobachtete Heterozygotie; H_e = erwartete Heterozygotie

Tabelle 4 zeigt die beobachtete Heterozygotie und die erwartete Heterozygotie pro Locus. Die beobachtete Heterozygotie reicht von 0,290 (PLO2-123) bis 0,882 (PLO3-86) und beträgt im Mittel über alle Loci 0,633.

Die erwartete Heterozygotie reicht mit dem niedrigsten Wert bei PLO2-123 mit 0,297 bis 0,870 bei PLO3-86. Im Mittel über alle Loci beträgt die erwartete Heterozygotie 0,603.

In Tabelle 5 ist die genetische Variabilität dieser Waschbärpopulation des Müritz-Nationalparkes der zweier anderen Untersuchungen (Cullingham, Kyle et al. 2006; Fike, Drauch et al. 2007) gegenübergestellt.

Tab. 5: Genetische Variabilität untersuchter Waschbärpopulationen: Waschbärpopulation vom Müritz-Nationalpark (93 Individuen), Cullingham et al. (2006) (80 Individuen), Cullingham et al. (2008) (Niagara-Tiere: 292 Individuen, St. Lawrence-Tiere: 587 Individuen) und Fike et al. (2007) (29 Individuen) sowie Hauver (2008) (52 Individuen) im Vergleich.

Locus		untersuchte Population	Cullingham et al (2006)	Cullingham et al (2008) Niagara	St. Lawrence (2007)	Hauver (2008)
PLO-M3	N _A	5	6	5	6	7
	H _o	0,495	0,675	0,723	0,726	0,873
	H _e	0,492	0,758	0,751	0,738	0,765
PLO-M2	N _A	10	12	12	14	12
	H _o	0,817	0,900	0,818	0,830	0,825
	H _e	0,793	0,887	0,857	0,857	0,860
PLO-M17	N _A	5	6	7	28	8
	H _o	0,828	0,688	0,736	0,884	0,714
	H _e	0,759	0,793	0,802	0,896	0,780
PLOT-10	N _A	5			9	
	H _o	0,645			0,828	
	H _e	0,613			0,815	
PLOT-06	N _A	7			4	
	H _o	0,624			0,690	
	H _e	0,542			0,687	
PLOT-08	N _A	6			6	
	H _o	0,484			0,931	
	H _e	0,454			0,783	
PLO2-123	N _A	4	11	12	12	12
	H _o	0,290	0,813	0,760	0,835	0,825
	H _e	0,297	0,848	0,876	0,835	0,866
PLO3-86	N _A	20	23	25	27	24
	H _o	0,882	0,925	0,877	0,896	0,921
	H _e	0,870	0,934	0,928	0,896	0,901

N_A = Anzahl gefundener Allele in der Population; H_o = beobachtete Heterozygotie;
H_e = erwartete Heterozygotie.

4.3 Hardy-Weinberg-Test

In Tabelle 6 sind die Signifikanzen der Abweichung der 8 Loci vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht dargestellt. Nur bei PLO-M3 zeigen sich signifikante Werte, was darauf hindeutet, dass ein Heterozygotendefizit an diesem Loci vorliegt. Alle anderen Loci weisen keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht auf.

Tab. 6: Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Locus	Probability	Signifikanz
PLO-M3	0,000	***
PLO-M2	0,796	ns
PLO-M17	0,279	ns
PLOT-10	0,455	ns
PLOT-06	0,579	ns
PLOT-08	0,985	ns
PLO2-123	0,995	ns
PLO3-86	0,561	ns

ns=nicht signifikant, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

4.4 Abstammungsanalyse

Zuerst erfolgte mittels dem Programm CERVUS 2.0 (Marshall, Slate et al. 1998; Slate, Marshall et al. 2000; Kalinowski, Taper et al. 2007) eine Simulation der Abstammungsanalyse, die dann für die Maternity und Paternity Analyse genutzt wird. Man findet die Jungtiere mit den wahrscheinlichsten zugehörigen Elterntierkandidaten. Das Programm lief zuerst ohne Angabe von bekannten oder eventuellen Elterntieren. Die „estimated proportion of candidate parents“ wurde mit 80 % angegeben. Alle Individuen wurden typisiert an allen Loci mit einer Error-Rate von 0,01. Das Konfidenzniveau (strict) betrug 95 % und (relaxed) 80 %. Es wurden 10000 Simulationen laufen gelassen.

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse, die bei der Dateneingabe in CERVUS 2.0 erstellt wurden sowie mündlichen Angaben von Frank Michler aus den Voruntersuchungen vom Projekt Waschbär, die aus ihren Telemtriedaten und Beobachtungen entstanden sind, zusammengestellt. Rot markierte Tiere stimmten in Cervus und in Annahme überein.

Tab. 7: Ergebnistabelle der von Cervus ermittelten Mütter- und Väterkandidaten und den Kandidaten aus Beobachtungen und Vermutungen (mündlich, Frank Michler)

Offspring ID	Candidate mother ID		Candidate father ID	parent non-exclusion probability
	Cervus	Annahme aus Vorversuchen		
45	2003	2003	1005	4,58%
46	2003	2003	1005	2,78%
47	2018	2003	1005	2,00%
48	2007	2003	1005	4,50%
49	2003	2003	1005	2,64%
4005	2012		1007	0,94%
5001	2004	2004	1003	7,25%
5002	2017	2006	1006	6,62%
5003	2001	2001	1021	2,17%
5004	2002	2002	1005	1,07%
5005	2001	2001	1012	26,05%
5006	2001	2001	1012	26,05%
5007	2011	2011	1008	8,10%
5008	2010	2011	1002	28,13%
5009	2010	2011	1002	16,45%
5010	2005		1009	4,41%
5011	2013	2001	1006	21,27%
5012	2001	2001	1010	3,98%
5013	2007	2019	1002	14,26%
5014	2016	2016	1014	14,28%
5015	2004		1017	5,48%
5016	2005	*2005*	1007	8,77%
5017	2018	2020	1009	2,64%
6011	2012		1014	8,53%
6020	2001	2001	1010	6,54%
6026	2008		1009	27,10%
6028	2011		1015	19,23%
6029	2018		1013	12,52%
6030	2016	*2011*	1022	19,76%
6031	2006	*2011*	3005	5,89%
6032	2001	*2018*	1005	5,20%
6033	2013		3014	7,17%
6034	2018	*2018*	1009	5,16%
6035	2016		3010	3,29%
6036	2001	2001	1013	15,47%
6037	2021	*2018*	1006	7,48%
6038	2013	*2020*	1001	8,22%
6039	2013	*2020*	1006	6,51%
6040	2015	2020	1006	12,68%
6041	2017	*2011*2012*	1002	0,22%
6042	2015	*2011*2012*	1006	14,59%

Da die Ergebnisse von CERVUS 3.0 mit den Annahmen von Frank Michler zum Teil abwichen, wurde eine manuelle Auswertung der einzelnen Tiere durchgeführt und die einzelnen Loci verglichen, um eindeutig die Elterntiere zu bestimmen beziehungsweise um Elterntiere auszuschließen.

In der Tabelle sind die ID-Nummern der einzelnen Jungtiere genannt, die Anzahl der untersuchten Loci, die Ergebnisse der Dateneingabe in Cervus sowie die einzelne Wahrscheinlichkeitsangabe, welche darstellt wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass bei der Zuordnung der einzelnen Kandidaten Fehler gemacht wurden.

Anschließend wurde in dem Programm CERVUS ein neuer Datensatz eingegeben mit den aus den Voruntersuchungen sich ergebenden bekannten Muttertieren (Michler, mündliche Mitteilung), um die Trefferwahrscheinlichkeit der Vätertierkandidaten zu erhöhen. In folgender Tabelle 8 sind die Annahmen für die Dateneingabe dargestellt.

Tab. 8: Ergebnistabelle nach CERVUS nach Eingabe der bekannten Muttertiere um die Vattertierkandidaten zu ermitteln; bei den Tieren, bei denen keine Angabe des Muttertieres steht, wurde keine Annahme getroffen.

Offspring ID	Known Mother ID	Candidate Father ID	parent non-exclusion probability
45	2003	1005	4,58%
46	2003	1005	2,78%
47	2003	1005	2,00%
48	2003	1005	4,50%
49	2003	1005	2,64%
4005		1007	0,94%
5001	2004	1003	7,25%
5002	2006	1002	6,62%
5003	2001	1005	2,17%
5004	2002	1005	1,07%
5005	2001	1008	26,05%
5006	2001	1008	26,05%
5007	2011	3014	8,10%
5008	2011	1002	28,13%
5009	2011	1002	16,45%
5010		1009	4,41%
5011	2001	1010	21,27%
5012	2001	1010	3,98%
5013	2019	1007	14,26%
5014	2016	1014	14,28%
5015		1017	5,48%
5016	2005	1007	8,77%
5017	2020	1003	2,64%
6011		1014	8,53%
6020	2001	1010	6,54%
6026		1009	27,10%
6028		1015	19,23%
6029		1013	12,52%
6030	2011	1022	19,76%
6031	2011	1002	5,89%
6032	2018	1005	5,20%
6033		3014	7,17%
6034	2018	1026	5,16%
6035		3010	3,29%
6036	2001	3010	15,47%
6037	2018	1026	7,48%
6038	2020	3005	8,22%
6039	2020	1006	6,51%
6040	2020	1006	12,68%
6041	2011	1002	0,22%
6042	2011	1006	14,59%

Blau markiert: Tiere haben sich geändert nach erneuter Eingabe in CERVUS

Tab. 9: Ergebnisse der Parent Pair Analyse durch CERVUS 3.0

Offspring ID	Candidate mother ID		Candidate father ID	parent pair non-exclusion probability
	Cervus	Annahme aus Voruntersuchungen		
45	2003	2003	1005	0,0206462%
46	2003	2003	1005	0,0001667%
47	2003	2003	1005	0,0006893%
48	2003	2003	1005	0,0043611%
49	2003	2003	1005	0,0013746%
4005	2012		1024	0,0000044%
5001	2004	2004	1003	0,0029022%
5002	2017	2006	1006	0,0117619%
5003	2001	2001	1005	0,0016570%
5004	2002	2002	1005	0,0002033%
5005	2001	2001	1008	0,4757120%
5006	2001	2001	1008	0,4757120%
5007	2011	2011	3014	0,0129350%
5008	2011	2011	1002	0,0581073%
5009	2011	2011	1002	0,2714052%
5010	2005		1026	0,0015593%
5011	2012	2001	1006	0,1523145%
5012	2001	2001	1010	0,0011624%
5013	2007	2019	1007	0,0031986%
5014	2004	2016	1014	0,1138816%
5015	2015		1002	0,0108624%
5016	2005	*2005*	1007	0,0017979%
5017	2018	2020	1009	0,0006487%
6011	2011		1014	0,0032066%
6020	2001	2001	1010	0,0055192%
6026	2016		1009	0,2486239%
6028	2011		1005	0,0155843%
6029	2018		3014	0,0340204%
6030	2017	*2011*	1022	0,4430337%
6031	2017	*2011*	1026	0,0007105%
6032	2008	*2018*	1005	0,0004625%
6033	2013		3014	0,0008420%
6034	2002	*2018*	1026	0,0016678%
6035	2016		3010	0,0066898%
6036	2001	2001	3010	0,2443464%
6037	2008	*2018*	1002	0,0002670%
6038	2008	*2020*	1001	0,0031500%
6039	2013	*2020*	1006	0,0930252%
6040	2021	2020	1006	0,3367025%
6041	2019/2020	*2011*2012*	1002	0,0000164%
6042	2015	*2011*2012*	1006	0,0755597%

Blau markiert: Tiere haben sich geändert nach erneuter Eingabe in CERVUS

Wenn man die Daten erneut einer Parentage Analysis unterzieht, diesmal aber nicht einzeln eine Maternity und eine Paternity Analyse laufen lässt, sondern die Daten einer Parent Pair-Analyse unterzieht, so erhält man zum Teil abweichende Ergebnisse (siehe Tabelle 9) von der vorherigen Tabelle.

4.5 Hauptkomponentenanalyse

Mit Hilfe des Programmes Genealex 6.1 (Peakall and Smouse 2006) wurde für die Individuen eine PCA (Hauptkomponentenanalyse) durchgeführt, um eventuelle Gruppierungen zu verdeutlichen. Abbildung zeigt die Ergebnisse der PCA, wobei jedes Individuum einzeln dargestellt ist. Die Hauptkomponente erklärt 27,26% der Varianz. Die Hauptkomponente 2 erklärt 19,19% der Varianz. Zusammen erklären sie 46,44% der Varianz. Die Abbildung 7 verdeutlicht, dass keine deutlichen Aggregationen erkennbar sind.

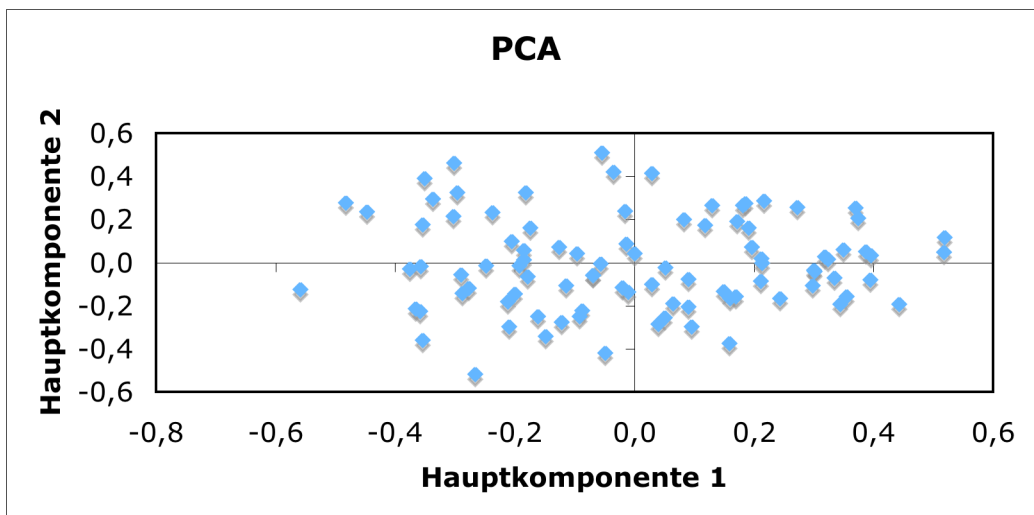


Abb. 7: PCA aller Waschbärindividuen

Abbildung 8 zeigt die PCA von drei bekannten Koalitionen, die in Tabelle aufgelistet ist.

Tab. 10: Bekannte Koalitionen einiger Waschbären, die in die PCA eingesetzt wurden.

Koalition	Individuum
1	1003
1	1024
1	1005
1	1006
1	1017
1	1015
1	1016
1	5007
2	1019
2	1020
2	1014
2	1004
2	1009
2	1010
3	1008
3	1011

In Abbildung 8 sind bekannte Koalitionen in einer PCA aufgezeigt. Auch hier sind keine deutlichen Gruppierungen oder auffällige Cluster zu erkennen. Ein zufällig ausgewähltes Individuum kann nicht sicher einer Koalition zugeordnet werden.

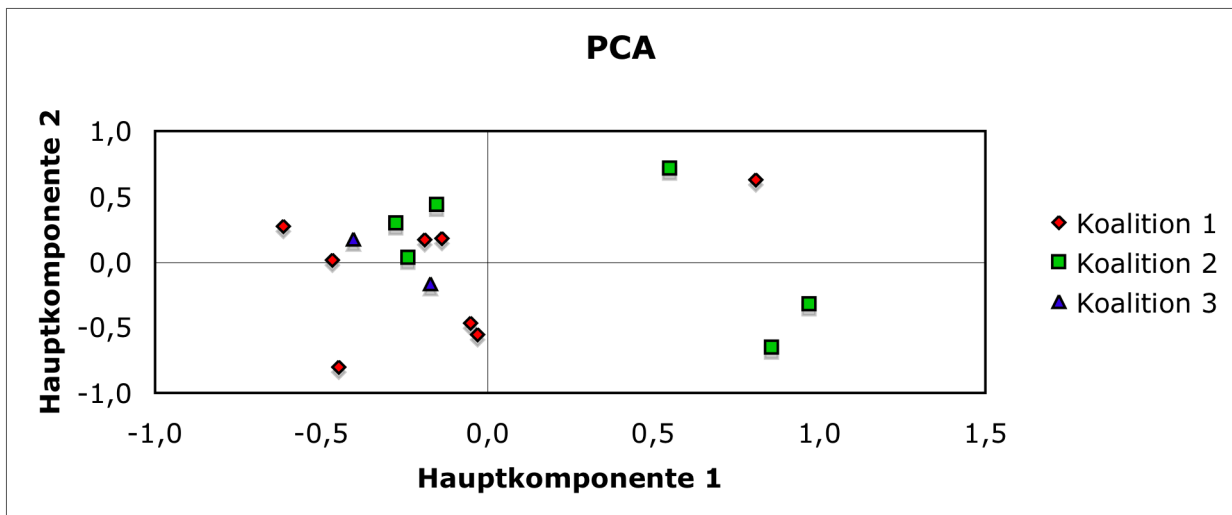


Abb. 8: PCA der Koalitionen aus Tabelle 10; die einzelnen Koalitionen sind in Farben unterteilt. Rot = Koalition 1, grün = Koalition 2, blau = Koalition 3.

4.6 Relatedness

Um die Relatedness-Werte der Genotypen aller Tiere zu berechnen, wurden die Daten in das Programm KINGROUP v2_090501 (Konovalov, Manning et al. 2004) eingelesen, um dann anschließend zu testen, ob sich die Ergebnisse aller Tiere mit den Ergebnissen der Koalitionen (siehe Tabelle 13), bzw. den Ergebnissen der Würfe hinsichtlich der Relatedness-Werte voneinander unterscheiden.

Die Koalitionen, welche im Müritz-Nationalpark anhand telemetrischer Beobachtungen beobachtet wurden, sind in Tabelle 11 aufgelistet (Michler, mündliche Mitteilung).

Tab. 11: Koalitionen, die bei den Voruntersuchungen des Projekt Waschbär beobachtet wurden; in einer Reihe stehen jeweils die Tier-ID's der bekannten Koalitionen

1003	1005	1006		
1004	1010	1019	1020	1014
1015	1003	1006	1917	1025
1008	1011			
1009	1011	1014		
1011	1008	1009		
1014	1009	1004	1019	1020
1016	1017	(wurden nur auf Foto gemeinsam gesehen)		
1017	1005	5007		
1019	1004	1014	1020	
1023	1027			
1024	1010			
1025	1005			
1026	1017			

In der Tabelle 12 sind die Tiere der einzelnen Würfe aufgelistet (Michler, mündliche Mitteilung).

Tab. 12: Auflistung der bekannten Waschbär-Würfe; einzelne Würfe wurden in Kästchen eingeteilt.

Offspring ID
45
46
47
48
49
5005
5006
5011
5012
6020
5007
5008
5009
5017
6033
6032
6034
6037
6038
6039
6040

Der in KINGROUP berechnete durchschnittliche Relatedness-Wert aller Tiere lag bei -0,01. Die Werte reichten von -0,704 bis hin zu Werten von 1.

Die Verwandtschaftswerte werden auf einer Skala von -1 bis 1 angegeben, mit einem Nullwert, der anzeigt, dass die Paare annähernd durch Zufall eine Beziehung haben bei den gegebenen Allel-Häufigkeiten (Hauver 2008). Bei positiven Werten spricht man von genetischer Ähnlichkeit, je weiter entfernt von 1 umso genetisch unähnlicher sind die Individuen.

In Tabelle 13 sind die Relatednesswerte der einzelnen Individuen der bekannten Koalitionen aufgelistet. Auffallende Werte sind bei Tieren 1010 und 1020 (-0,304), 1010 und 1014 (-0,282), 1024 und 1010 (-0,323) sowie bei 1025 und 1005 (-0,223). Im Gegensatz hierzu zeigen sich positive Werte also Werte, die auf genetische Ähnlichkeit hindeuten, bei 1008 und 1011 (0,235), 1000 und 1011 (0,547), 1017 und 5007 (0,378).

Tab. 13: Tabelle der Ergebnisse der Relatednesswerte r der bekannten Koalitionen

Individuum 1	Individuum 2	r
1003	1005	-0,327
1005	1006	-0,187
1003	1006	-0,068
1004	1010	0,103
1004	1019	-0,208
1004	1020	0,228
1004	1014	-0,090
1010	1019	-0,230
1010	1020	-0,304
1010	1014	-0,282
1019	1020	0,003
1019	1014	0,033
1020	1014	-0,265
1008	1011	0,235
1009	1011	0,547
1009	1014	0,177
1011	1014	0,007
1011	1008	0,235
1011	1009	0,547
1008	1009	0,388
1014	1009	0,177
1014	1004	-0,090
1014	1019	0,033
1014	1020	-0,265
1009	1004	0,128
1009	1019	0,110
1009	1020	-0,369
1004	1019	-0,208
1004	1020	0,228
1019	1020	0,003
1016	1017	0,250
1017	1005	-0,106
1017	5007	0,378
1005	5007	-0,262
1019	1004	-0,208
1019	1014	0,003
1019	1020	0,003
1004	1014	-0,090
1004	1020	0,288
1014	1020	-0,265
1023	1027	0,173
1024	1010	-0,323
1025	1005	-0,223
1026	1017	0,350

Mit den Tieren der bekannten Würfe und den Tieren der bekannten Koalitionen (siehe Tabelle 11) verfahren, um diese dann anschließend in dem Programm

PASW Statistics 17.0 (Version 17.0.2) mit den Relatedness-Werten aller Tiere zu vergleichen. Zuerst wurde ein Test auf Normalverteilung durchgeführt, um anschließend je nach Ergebnis einen parametrischen oder nicht-parametrischen Test durchzuführen. Da der Test der Relatedness-Werte auf Normalverteilung beim Kolmogorov-Test (Signifikanzkorrektur nach Lilliefors) einen Signifikanz-Wert unter 0,05 hatte, d.h. eine signifikante Abweichung der Verteilung von der Normalverteilung hatte, konnte kein t-Test durchgeführt werden, da dieser eine Normalverteilung voraussetzt. Es wurde daher ein nicht-parametrischer Test durchgeführt, der U-Test nach Mann & Whitney (siehe Tabelle 14 bis 17). Es soll die Hypothese geprüft werden, ob die jeweiligen Gruppen aus einer Grundgesamtheit entstammen.

Tab. 14: Ergebnistabelle 1 des U-Test nach Mann & Whitney der Relatedness-Werte aller Tiere im Vergleich zu den Relatedness-Werten der Koalitionen

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
r	1,00	4278	2325,36	9947878,50
	2,00	351	2188,76	768256,50
	Gesamt	4629		

Gruppe 1: Relatedness-Werte r aller Tiere

Gruppe 2: Relatedness-Werte r der Koalitionen

Der U-Test nach Mann & Whitney vergleicht einzelne Gruppen miteinander auf Basis der Rangunterschiede. Die Werte der beiden Gruppen werden bei dieser Methode zu einer Gruppe zusammengefasst und anschließend in aufsteigender Rangfolge geordnet und so wird jedem Wert je nach Position ein Rang zugeordnet. Für beide Gruppen wird nun getrennt voneinander die Summe der Rangwerte berechnet. Die Hypothese, ob beide Gruppen der gleichen Grundgesamtheit entstammen kann nun getestet werden.

Tab. 15: Ergebnistabelle 2 des U-Test nach Mann & Whitney der Relatedness-Werte aller Tiere im Vergleich zu den Relatedness-Werten der Koalitionen

	r
Mann-Whitney-U	706480,500
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,066

r: Relatedness

Der Vergleich der Relatedness-Werte aller Tiere mit denen der Koalitionen ergab bei der Gruppe 1 (alle Tiere) einen höheren durchschnittlichen Rang (Mittlerer Rang) als bei Gruppe 2 (Koalitionen) (siehe Tabelle 14).

Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant ($> 0,05$) mit 0,066 (siehe Tabelle 15), das heißt es sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar zwischen den Werten aller Tiere und denen der Koalition. Bei einer derartigen Irrtumswahrscheinlichkeit, kann die Nullhypothese angenommen werden.

Tab. 16: Ergebnistabelle 1 des U-Test nach Mann & Whitney der Relatedness-Werte aller Tiere im Vergleich zu den Relatedness-Werten der Würfe

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
r	1,00	4278	2255,70	9649897,50
	3,00	210	2016,28	423418,50
	Gesamt	4488		

Gruppe 1: Relatedness-Werte aller Tiere

Gruppe 3: Relatedness-Werte der Würfe

Tab. 17: Ergebnistabelle 2 des U-Test nach Mann & Whitney der Relatedness-Werte aller Tiere im Vergleich zu den Relatedness-Werten der Würfe

	r
Mann-Whitney-U	401263,500
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,009

Aus Tabelle 16 ist zu entnehmen, dass Gruppe 1 (alle Tiere) einen höheren mittleren Rang aufweist als Gruppe 3 (Würfe). Da der Signifikanzwert kleiner 0,05 ist, zeigen sich hier signifikante Unterschiede zwischen den Relatedness-Werten aller Tiere und denen der Würfe (siehe Tabelle 17), d.h. die Nullhypothese muss abgelehnt werden, dass die Relatedness-Werte aller Tiere und die Relatedness-Werte der Tiere aus den Würfen aus einer Grundgesamtheit entstammen.

4.7 Mehrfachvaterschaft bei Würfen

Aus den telemetrischen Beobachtungen und Schlafplatzbeobachtungen (Michler, mündliche Mitteilung) werden die in der folgenden Tabelle 18 aufgelisteten Tiere eines Wurfes angenommen.

Tab. 18: Tabelle der bekannten einzelnen Würfe mit den zugehörigen Muttertierkandidaten (CERVUS-Berechnung und Annahme aus den Voruntersuchungen) sowie den ermittelten wahrscheinlichsten Vätertierkandidaten; die einzelnen Würfe sind jeweils in ein Kästchen geschrieben.

Offspring ID	Loci typed	Candidate mother ID		Candidate father ID	parent non-exclusion probability
		Cervus	Annahme aus Voruntersuchungen		
45	8	2003	2003	1005	4,58%
46	8	2003	2003	1005	2,78%
47	8	2003	2003	1005	2,00%
48	8	2003	2003	1005	4,50%
49	8	2003	2003	1005	2,64%
5005	8	2001	2001	1008	26,05%
5006	8	2001	2001	1008	26,05%
5011	8	2012	2001	1006	21,27%
5012	8	2001	2001	1010	3,98%
6020	8	2001	2001	1010	6,54%
5007	8	2011	2011	3014	8,10%
5008	8	2011	2011	1002	28,13%
5009	8	2011	2011	1002	16,45%
5017	8	2018	2020	1009	2,64%
6033	8	2013		3014	7,17%
6032	8	2008	*2018*	1005	5,20%
6034	8	2002	*2018*	1026	5,16%
6037	8	2008	*2018*	1002	7,48%
6038	8	2008	*2020*	1001	8,22%
6039	8	2013	*2020*	1006	6,51%
6040	8	2021	2020	1006	12,68%

Von den jeweiligen Jungtieren der einzelnen Würfe wurden die einzelnen Loci manuell ausgewertet anhand der Ergebnistabelle der ermittelten Genotypen (siehe Anhang), um jeden einzelnen Vaterkandidaten zu prüfen, ob er nicht der Vater für alle Tiere sein kann.

5 Diskussion

5.1 *Genetische Diversität und genetische Variabilität*

Insgesamt wurden 93 Waschbären an acht Mikrosatelliten-Loci untersucht. Die Anzahl der Allele (siehe Tabelle 3) liegt im Mittel bei 7,75 Allele pro Primerpaar. Die Anzahl der gefundenen Allele liegt zwischen 4 (PLO2-123) und 20 (PLO3-86). Die hier untersuchte Waschbärpopulation wich im Vergleich zu den Studien von Cullingham et al. (2006) und Fike et al. (2007) kaum ab, wie in Tabelle 5 sichtbar gemacht. Beim Locus PLOT-10 wurden mit 5 Allelen 4 Allele weniger gefunden, als im Paper von Fike et al. (2007) beschrieben; ebenso fand man am Locus PLO2-123 laut Cullingham et al. (2006) 7 Allele mehr als in dieser untersuchten Population, die mit 4 Allelen an diesem Locus weit unter dem Durchschnitt von 11 lag. Sonst wichen die Werte aber kaum ab von den in den Papern genannten Allelanzahlen (Cullingham, Kyle et al. 2006; Fike, Drauch et al. 2007). Wie in dem Paper von Cullingham et al. (2008) fand man an dem Locus PLO-M17 und an dem Locus PLO3-86 im Vergleich zu dieser Untersuchung ein weitaus höhere Anzahl an Allelen. Im Vergleich zu der Arbeit von Hauver (2008) zeigte sich am Locus PLOT-08 eine fast 50% geringere Heterozygotie. Dasselbe Phänomen tritt am Locus PLO2-123 auf mit einer beobachteten Heterozygotie von 0,290 bei der Müritz-Population im Vergleich zu Hauver (2008) mit einer beobachteten Heterozygotie von 0,825. Zu den Vergleichswerten ist zu sagen, dass die Untersuchungen alle eine ungleiche Stichprobenanzahl vorweisen, was einen genauen Vergleich der einzelnen Populationen erschwert bzw. verfälschen kann.

Der Verlust der genetischen Variabilität in isolierten Beständen, kann zur genetischen Drift führen, ausgelöst durch die Weitergabe nur weniger Ei- und Samenzellen an die nächste Generation. Es kann zu einer zufälligen Verschiebung der Häufigkeiten variabler Allele kommen (Schreiber and Lehmann 1997). Die untersuchte Waschbärpopulation hat nicht an genetischer Variabilität verloren.

Die erwartete und beobachtete Heterozygotie, also der Anteil der heterozygoten Tiere in der Population ist ein guter Hinweis auf genetische Variabilität.

Die beobachtete und erwartete Heterozygotie dieser Untersuchung sind in Tabelle 4 und 5 zusammengestellt. Die Heterozygotiewerte dieser untersuchten Waschbärpopulation reichten bei einer erwarteten Heterozygotie von 0,297 (PLO2-123) bis hin zu 0,870 (PLO3-86). Vergleichswerte hierzu liegen bei Cullingham et al. bei 0,848 (PLO2-123) und 0,934 (PLO3-86). Im Mittel lag die erwartete Heterozygotie bei der Untersuchung der Müritz-Nationalpark-Waschbärpopulation bei 0,603. Die beobachtete Heterozygotie ergab bei dieser Untersuchung Werte von 0,290 (PLO2-123) bis hin zu 0,882 (PLO3-86). Die beobachtete Heterozygotie beträgt im Mittel über alle Loci 0,633. Vergleichswerte von Cullingham et al. liegen bei 0,813 (PLO2-123) und 0,925 (PLO3-86). Im Durchschnitt liegen die beobachteten Heterozygotiewerte höher als die erwarteten Heterozygotiewerte, was schlussfolgern lässt, dass ein genetischer Austausch stattfindet.

Basierend auf den Allelfrequenzen wurde das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht geprüft. Es müssen mehrere Annahmen erfüllt sein, dass sich eine Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet: eine große Populationsgröße, eine geschlossene Population (vernachlässigbare Migration), weder Selektion noch Mutation, Panmixie (zufällige Paarung) und keine überlappenden Generationen (Frankham, Ballou et al. 2004). Wenn sich beim Hardy-Weinberg-Test signifikante Unterschiede zeigen, lässt sich dies auf ein Heterozygotenüberschuss zurückführen. Dieser kann ausgelöst werden durch Inzucht, d.h. Individuen welche enger verwandt sind als zufällig ausgewählte Individuen einer Population (Schreiber and Lehmann 1997). Durch Inzuchtdepression kann es zu verminderter Fitness bei den Nachkommen nahe verwandter Eltern kommen. Ein weiterer Faktor, der zum Heterozygotenmangel führen kann ist der Wahlund-Effekt. Infolge eingeschränktem Genflusses zwischen zwei Teilpopulationen findet man weniger heterozygote Genotypen (Schreiber and Lehmann 1997). Außerdem können Nullallele, also der Verlust einen Markers durch Mutationen während des Polymerase-Kettenreaktion

Prozesses, zu Fehlerinterpretationen führen (Schreiber and Lehmann 1997). In der Untersuchung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, was darauf schließen lässt, dass kein Heterozygotendefizit herrscht. Obwohl die Tiere alle aus einem Genpool stammen, sind keine negativen Eigenschaften erkennbar, es herrscht keine Gendrift, was oft bei kleinen Populationen auftritt, wenn es zur Fixierung eines Allels kommt und somit zur Verminderung der Variabilität, was aber in der untersuchten Population nicht auf zu zeigen ist (Schreiber and Lehmann 1997).

5.2 Abstammungsanalyse

Die von CERVUS berechnete durchschnittliche Ausschluss Wahrscheinlichkeit betrug für alle 8 Loci 0,924 für den First Parent und 0,990 für den Second Parent sowie 0,999 für Parent Pair. Vergleichswerte hierzu sind bei der Untersuchung von Nielsen und Nielsen 2007. Hier beträgt die Total Exclusionary Power 0,999 (First Parent) und 0,999 (Second Parent) bei den dort 10 untersuchten Loci (Nielsen and Nielsen 2007). Die von CERVUS durchgeführte Parentage Analysis ergab folgende Ergebnisse: Dadurch dass, wie in der Ergebnistabelle 7 erkennbar, zum Teil die mündlichen Angaben der Elternkandidaten mit den Ergebnissen des Programmes CERVUS nicht übereinstimmen, wurde zur Kontrolle ein manueller Vergleich der einzelnen Loci durchgeführt. Die manuelle Analyse half nicht dabei, die Elterntiere eindeutig zu bestimmen, es konnten keine Elterntiere eindeutig ausgeschlossen werden. Immerhin liefert die manuelle Methode einen guten Eindruck der Aussagekraft verwendeten Marker. Man kann hier nur über Wahrscheinlichkeiten sprechen und muss sagen, dass die Auswahl der von CERVUS gelieferten wahrscheinlichsten Elternkandidatentiere, nicht zwingend stimmen muss. Wenn Tiere nicht ausgeschlossen werden können, kann die Hypothese, dass es die jeweiligen Elternkandidaten sind, angenommen werden.

Wenn man sich die Daten näher ansieht, stellt man fest, dass zum Beispiel beim Tier mit der ID 5004 die Wahrscheinlichkeit bei 1,07% liegt, dass andere Tiere als Elternkandidaten in Frage kommen. Hier stimmen auch Annahme und Cervus Ergebnis bei der Muttertierkandidatenangabe überein. Beim Tier mit der ID 5005 und 5006 stimmen aber ebenfalls CERVUS-Ergebnis und Annahme

überein. Hier kann die Hypothese nicht ausgeschlossen werden, dass es sich beim Muttertier um das Tier mit der ID 2001 handelt und beim Vatertier um 1012, aber es können mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit (26,05%) noch andere Elterntierkandidaten in Frage kommen.

Da es bekannt ist, dass die Tiere mit der ID 45-49 aus einem Wurf stammen, müssen sie alle von der gleichen Mutter abstammen. Hier wird auch durch den manuellen Vergleich der einzelnen Loci deutlich, dass das Muttertier die ID 2003 hat und das Vatertier das Tier mit der ID 1005 mit hoher Wahrscheinlichkeit sein kann. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt hier bei 2,00% bis 4,58%.

Eine sehr geringe Ausschlusswahrscheinlichkeit zeigen die Ergebnisse der von CERVUS zugeordneten Elternkandidaten bei den Tieren mit der ID 4005 (0,94%), 5004 (1,07%), 5012 (3,98%), 5017 (2,64%) und 6041 mit 0,22%. D.h. bei diesen Tieren, ist die Wahrscheinlichkeit, dass Fehler bei der Zuordnung der Elternkandidaten gemacht wurden sehr gering und es kommen mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit andere Elternkandidaten in Frage.

Im Gegensatz hierzu zeigen einige Ergebnisse relativ hohe „parent non-exclusion probability“-Werte, wie z.B. das Jungtier 5008 mit der höchsten Prozentzahl von 28,13% und 5009 mit 16,45%. Da diese zwei Tiere aus einem bekannten Wurf entstammen zusammen mit Tier 5007, dessen Muttertier laut CERVUS und mündlichen Angaben 2011 ist, wurde ein manueller Vergleich durchgeführt, der zeigte, dass 2011 als Muttertierkandidat für alle drei Jungtiere in Frage kommt. Höhere Wahrscheinlichkeitswerte treten auch bei den Waschbären Nr. 5011 (21,27%), 5013 und 5014 (mit je ca.14%), 6026 (27,10%) und 6028 (19,23%).

Um geringere Fehlerquoten zu haben, wurde die Parent pair-Analyse durchgeführt, bei deren Durchlauf beide Elterntierkandidaten gesucht werden. Die „Parent non-exclusion probability“ blieb für die einzelnen Kandidaten gleich, wohingegen die „Parent pair non-exclusion probability“ sehr geringe Werte aufwiesen, d.h. die Ausschlusswahrscheinlichkeiten, dass andere Elterntierpaar-Kandidaten in Frage kommen, ist äußerst gering wie in Tabelle 8

zu sehen ist. Bei dem bekannten Wurf der Tiere ID-Nr. 45 bis 49 stimmt jetzt bei allen der von CERVUS ermittelte Muttertierkandidat (2003) überein. Dieses Tier wurde auch als Muttertier durch telemetrische und andere Voruntersuchungen vermutet. Ebenso veränderten sich jetzt auch die Muttertierkandidaten der Tiere 5008 und 5009 bei beiden zum Muttertierkandidat ID 2011. Wie schon im vorherigen Abschnitt vermutet, müssen sie alle von dieser Mutter abstammen, da sie aus demselben Wurf sind.

Die Unterschiede der einzelnen Ergebnisse der getrennten Maternity und Paternity Analyse sowie der Parent Pair Analyse sind auf die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten zurück zu führen. Wenn man die Analyse getrennt durchführt, d.h. nur eine Maternity Analyse oder Paternity Analyse ohne Angabe bekannter Eltern, werden von CERVUS die Wahrscheinlichkeiten ermittelt ohne die potentiell zur Verfügung stehenden Kandidaten für das andere Elterntier zu berücksichtigen. Im Gegensatz hierzu wird bei der Parent Pair Analyse versucht, die Gesamtwahrscheinlichkeit zu maximieren.

Zur Sozialstruktur der Waschbären kann man sagen, dass beobachtet wurde, dass die Zerstreuung von Waschbären eher männlichen Ursprungs ist (Hauver 2008). Es zeigte sich in Untersuchungen, dass männliche Koalitionen von zwei bis vier Waschbären über eine bestimmte Zeit aufrechterhalten blieben. Es ist bekannt, dass Rüden eher Koalitionen bilden als Waschbärweibchen (Hauver 2008). Laut Hauver (2008) ist die Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb männlicher Koalitionen und deren Rollenverteilung dort noch nicht ausreichend erforscht. Einige Studien in den 80er Jahren ließen darauf schließen, dass Waschbären in Koalitionen eine hohe genetische Ähnlichkeit aufweisen, jedoch wurden in diesen Untersuchungen nicht die Verwandtschaft der einzelnen Individuen untersucht. Wie auch in Beobachtungen von Waschbären in Ost-Kansas (Gehrt and Fox 2004) bilden auch in der hier untersuchten Waschbärpopulation männliche Waschbären temporäre Verbindungen, was durch telemetrische Beobachtungen zeigt, dass sie zusammen Schlafplätze aufsuchen und die gleichen home-ranges zeigen, was bedeutet es kommt zur Überlappung von Aktionsräumen (Köhnemann 2007). Durch die genutzte Sozialtoleranz kann es zu einer Begünstigung des Erreichen der Nahrungsquellen und der Schlafplätze kommen (Hauver 2008). So werden

solche Koalitionen angenommen, damit sie Konkurrenzdruck verringern und sich so zu Verteidigungsgehilfen zusammenschließen, was auch bei Löwen und Geparden so üblich ist, denn große männliche Koalitionen erhöhen den Übernahmeerfolg und ermöglichen besseren Zugang zu besseren Gegenden und somit auch zu Weibchen (Hauver 2008).

Um festzustellen ob bei den einzelnen Koalitionen und innerhalb der Würfe eine Clusterbildung optisch erkennbar ist, wurde zusätzlich zur Verwandtschaftsanalyse eine PCA durchgeführt. Sowohl bei der Hauptkomponentenanalyse aller Individuen (siehe Abbildung 7) also auch bei den PCA einzelner Koalitionen (siehe Abbildung 8) zeigten sich keine deutlichen Gruppierungen. Es ist keine große Differenzierung zu beobachten. Dass es keine deutliche Differenzierung der einzelnen Tiere gibt, kann dadurch zu erklären sein, dass alle Tiere aus einem Genpool stammen und daher keine großen Unterschiede erkennbar sind. Auch bei Tieren bekannter Würfe sieht man kleine deutliche Gruppierung, so dass eine Unterscheidung in der PCA nicht möglich ist.

Der Grad der Verwandtschaft lässt sich nicht bei allen Tieren 100% festlegen. Ebenso konnten die Zweiergruppen und die einzelnen Koalitionen nicht sicher Wurfgeschwistern zugeordnet werden. Dies zeigte sich auch in anderen Untersuchungen, was dort auch anhand der Diskrepanz im Alter einiger Koalitionen deutlich wurde (Gehrt and Fox 2004). Die Gründe der Koalitionen bleiben unklar. Wie auch bei Hauver (2008) kann das Sozialverhalten der Waschbären nicht allein auf die genetische Ähnlichkeit zurückgeführt werden. Auch bei Hauver (2008) zeigte sich, dass eine genetische Ähnlichkeit zugrunde liegt, es aber nicht der entscheidende Faktor für eine soziale Bindung sein muss. Um hierzu bessere Aussagen zu treffen, müsste man sich die einzelnen Koalitionen und eventuell verwandte Tiere noch ein mal genau anschauen um sie dann anhand der genetischen Daten zu beobachten.

Anhand der Relatednesswerte lassen sich bei den Ergebnissen der Tiere der Koalitionen feststellen, dass auch hier nicht nur genetische Ähnlichkeiten zur Koalitionsbildung führen. Die Werte schwanken von nicht ähnlich bis sehr ähnlich. Hypothetisch gesehen müssten die Relatednesswerte für Eltern und ihre Nachkommen einen Wert von $r = 0,5$ annehmen. Weiterhin für

Halbgeschwister 0,25. Da aber in den Koalitionen keine Tiere aus bekannten Würfen genannt sind, lassen sich hier keine derartigen Vermutungen aufstellen. Auffällig sind die Werte der Tiere 1010 und 1020 mit einem Relatedness-Wert von -0,304. Dieser negative Wert deutet darauf hin, dass die Tiere sich nicht sehr genetisch ähneln. Ebenso findet man negative Werte bei 1010 und 1014 (-0,282), 1024 und 1010 (-0,323) sowie bei 1025 und 1005 (-0,223). Im Gegensatz hierzu zeigen sich positive Werte also Werte, bei 1008 und 1011 (0,235), 1000 und 1011 (0,547), 1017 und 5007 (0,378). Bei diesen Tieren lässt sich eine genetische Ähnlichkeit anhand der ermittelten Relatedness-Werte darstellen.

Es kommt die Frage auf, ob der Reproduktionserfolg einzelner Tiere höher ist als der anderer. In dieser Untersuchung zeigte sich, dass die männlichen Tiere mit der ID 1005 und 1006 am meisten zur Reproduktion kommen, gefolgt von dem Tier 1002, 1026 und 3014. Bei den Waschbärfähen fallen die Tiere mit der ID 2003, 2001 und 2011 auf.

Wenn man sich die einzelnen Ergebnisse betrachtet in Bezug auf bestimmte Vorzüge bei der Wahl der Partner, kann man feststellen, dass nur das Waschbärweibchen mit der ID 2001 sich wiederholt mit demselben Waschbärmännchen gepaart hat und zur Reproduktion kam.

5.3 Mehrfachvaterschaft bei Würfen

In der Literatur findet man Angaben über das Vorhandensein von Mehrfachvaterschaften bei Waschbär-Würfen (Slaska and Jezewska 2008). Slaska und Jezewska (2008) beschreiben, dass Jungtiere von zwei bis drei Vatertieren abstammen. Die Tiere werden in einem Wurf geboren, aber haben unterschiedliche Väter. In ihrer Studie beobachteten sie Doppel-Paarungen mit zwei verschiedenen Vatertieren sowie Dreier-Paarungen mit drei verschiedenen Vatertieren. Ebenso fand man in Süd-Illinois in einer Studie Mehrfachvaterschaften in Würfen (Nielsen and Nielsen 2007).

Bei dem mittels der Genotypentabelle manuellen Vergleich der einzelnen Loci der einzelnen von CERVUS ermittelten Vaterkandidaten innerhalb der jeweiligen Würfe, können wie bei der Elternschaftsanalyse alle Väter, die in

einem Wurf genannt sind, ebenso für die anderen Tiere innerhalb des jeweiligen Wurfes in Frage kommen.

Wie schon bei der Abstammungsanalyse erwähnt, ist es schwer mit CERVUS genaue Aussagen über Vattertierkandidaten zu treffen. Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit stammen die Tiere des Wurfes 45, 46, 47, 48 und 49 (Geburtsjahr 2008) vom Muttertier 2003 und vom Vattertier 1005 ab (siehe Tabelle 9).

Bei dem nächsten Wurf (5005, 5006, 5011, 5012 und 6020; Geburtsjahr 2007) ergeben die CERVUS-Berechnungen eine eventuelle Mehrfachvaterschaft mit 5 verschiedenen potentiellen Vattertieren. Als mögliche Vattertiere kommen hier die Tiere 1006, 1008 und 1010 in Betracht.

Bei dem Wurf mit den Tieren 5007, 5008 und 5009, im Jahr 2007 geboren, treten als mögliche Vaterkandidaten 3014 und 1002 auf.

Die Vaterkandidaten der Tiere 5017 und 5033 sind 1009 und 3014. Die genannten Jungtiere sind im Jahr 2007 geboren.

Der nächste Wurf (6032, 6034, 6037) stammt aus dem Jahr 2008 und als mögliche Vattertiere berechnet CERVUS 1002, 1005 und 1026.

Im letzten untersuchten Wurf mit den im Jahr 2008 geborenen Tieren 6038, 6039 und 6040 werden als Vattertiere 1001 und 1006 genannt.

Man kann feststellen, dass die Tiere 1002 (geboren im Jahr 2004 oder 2005), 1005 (geboren im Jahr 2005), 1006 (geboren im Jahr 2006 oder 2007) und 3014 (geboren im Jahr 2003) in verschiedenen Würfen (jeweils in 2 Würfen) als potentielle Elterntiere berechnet wurden.

5.4 Fazit

Die bei dieser Untersuchung verwendeten Marker können empfohlen werden für die Verwendung von genetischen Analysen zu Verwandtschaftsfragen, jedoch müssten im Anschluss an diese Untersuchung eventuell noch mehr Marker herangezogen werden. Durch die CERVUS-Analyse lassen sich bei dieser Primerwahl keine 100% Aussagen über Elterntiere treffen, es kann hier nur von Wahrscheinlichkeiten der Elterntierkandidaten die Rede sein. Um eine genauere Aussage zu treffen, müssten eventuell mehr Primer verwendet werden, was jedoch bei den von mir zusätzlich benutzten Primern nicht möglich

war, da diese keine Ergebnisse zeigten. Hier könnten noch die Primer PLOT-01 bis PLOT-05, PLOT-07, PLOT-09, PLOT-11 bis PLOT-13 (Fike, Drauch et al. 2007) getestet werden, um mehr Loci untersucht zu haben und so eine möglicherweise höhere Wahrscheinlichkeit bei der CERVUS-Auswertung zu erhalten. Eine weitere Möglichkeit um sichere Aussagen zu treffen, wäre, dass man zusätzlich die Haarproben und Speichelproben, die genommen wurden, noch einer DNA-Analyse unterzieht. Somit kann man die einzelnen Werte vergleichen und kann Elterntiere vielleicht schon ausschließen; beides war aufgrund des Zeitmangels und aus finanziellen Gründen in dieser Arbeit nicht durchführbar. Es können in diesem Zusammenhang weitere Untersuchungen auf molekularer Ebene durchgeführt werden, um besseren Aufschluss über das Sozialsystem der hier untersuchten Waschbärpopulation zu geben. Untersuchungen, die Mikrosatellitenanalysen verwenden, können das Verständnis des Sozialsystems von Beobachtungsstudien verbessern. Wertvoll sind Ergebnisse nur in Verbindung mit telemetrischen Daten und Zusammenarbeit mit Beobachtungen der Waschbären. Es sollten also eventuell anhand der in dieser Arbeit ermittelten genetischen Daten weitere telemetrische Beobachtungen an bestimmten Tieren vorgenommen werden. Um die Fehlerquellen zu reduzieren, wurden in den einzelnen Arbeitsschritten mehrere Wiederholungen durchgeführt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Holger Schulz für die Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit.

Ebenso danke ich dem Projekt Waschbär für die Unterstützung dieser Arbeit und hier insbesondere Dr. Frank Michler und Berit Köhnemann, die unter anderem die Probennahme durchgeführt haben.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Therese Bürgi, Karolina Kolodziej, Christian Wolf und Stefanie Holzhäuser für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit im Labor.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Großmutter bedanken, die dieses Studium erst ermöglichten und auch bei Alexander Wienekamp, der mich seelisch während des ganzen Studiums unterstützte.

Versicherung**Eidesstaatliche Erklärung**

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle wörtlichen und sinngemäßen Zitate aus Veröffentlichungen oder anderen Quellen sind als solche gekennzeichnet.

Landau, den 18.09.2009

Anja Peter

Anhang

A1 Verwendete Chemikalien

A2 Rezepte

A3 Protokolle

A4 Rohdaten

A5 Literaturverzeichnis

A1 Verwendete Chemikalien

Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
GoTaq®	Promega, Madison USA
Borsäure	Riedel-de Haën, Seelze
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt
Cy-Farbstoffe	VBC-Biotech, Wien
Desoxynukleotidtri-phosphate (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA Exitus Plus TM	AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	ROTH, Karlsruhe
Ethanol 99,9%	ROTH, Karlsruhe
Na ₂ EDTA	FLUKA Biochemika, Steinheim
MgCl ₂ -Lösung	Promega, Madison USA
PCR Buffer	Promega, Madison USA
Primer	VBC-Biotech, Vienna
Proteinase K	Macherey-Nagel, Düren
Saccharose (D+)	ROTH, Karlsruhe
SLS	Beckman Coulter Inc., Krefeld
Size Standard	Beckman Coulter Inc., Krefeld
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	ROTH, Karlsruhe
100 bp Leiter	ROTH, Karlsruhe

A2 Rezepte

6 x Ladepuffer (50 ml-Ansatz):

125 mg Bromphenolblau (AppliChem)

20 g 40% (w/v) Saccharose (Roth)

50 ml H₂O reinst

10 x TBE (500 ml-Ansatz)

54 g Tris Ultra Qualität (Roth)

27,5 g Borsäure, Puffersubstanz (Riedel-de Haën)

20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

A3 Protokolle**DNA-Extraktion mit NucleoSpin Tissue Kit von Macherey-Nagel (nach Handbuch NucleoSpin Tissue von Macherey Nagel):**

1. Gewebe vorbereiten: 25 mg Gewebe mit dem Skalpell zerkleinern und in ein Tube überführen
2. Pre-Lyse: 180 µl Buffer T1 hinzugeben; 25 µl Proteinase K stock solution hinzugeben; vortexen.
3. Inkubation der Probe bei 56°C und 300 rpm für 1-3 Stunden. Um den Vorgang zu beschleunigen, alle 15 Minuten kurz vortexen.
4. Lyse: 200 µl Buffer B3 hinzugeben, vortexen und bei 70°C 10 Minuten inkubieren.
5. 210 µl 96-100% Ethanol zugeben und sofort vortexen.
6. Die Probe in die Säule überführen. Bei 11.000 xg 1 Minute zentrifugieren (evtl. mehrmals zentrifugieren bis die gesamte Probe durch die Säule ist); Durchfluss verwerfen.
7. 500 µl Buffer BW hinzugeben und 1 Minute bei 11.000 xg zentrifugieren; Durchfluss verwerfen.
8. 600 µl Buffer B5 hinzugeben und 1 Minute bei 11.000 xg zentrifugieren; Durchfluss verwerfen.
9. Um die Säule vollständig zu trocknen, erneut 1 Minute bei 11.000 xg zentrifugieren.

10. Säule in ein frisches Tube geben und die DNA mit 100-200 µl Buffer BE (70°C warm) eluieren. 1 Minute inkubieren lassen und dann 1 Minute bei 11.000 xg zentrifugieren.

Auszug aus dem NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual:

Nucleic Acids

For nucleic acid quantification, the Beer-Lambert equation is modified to use an extinction coefficient with units of ng-cm/ml. Using this extinction coefficient gives a manipulated equation:

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

Where c is the nucleic acid concentration in ng/microliter, A is the absorbance in AU, e is the wavelength-dependent extinction coefficient in ng-cm/microliter and b is the path length in cm. The generally accepted extinction coefficients for nucleic acids are:

- Double-stranded DNA: 50 ng-cm/µl
- Single-stranded DNA: 33 ng-cm/µl RNA: 40 ng-cm/µl

For the NanoDrop 1000 Spectrophotometer, path lengths of 1.0 mm and 0.2 mm are used compared to a standard spectrophotometer using a 10.0 mm path. Thus, the NanoDrop 1000 Spectrophotometer is capable of measuring samples that are 50 times more concentrated than can be measured in a standard spectrophotometer.

Auszug aus dem GenomeLab™ Fragment Analysis Protocol von Beckman Coulter:

Sample Preparation for Loading into the instrument (non-multiplexed samples):

Component 1 Sample 8 Samples

SLS 39.5 - X µL 316 - X µL

Size Standard 0.5 µL 4.0 µL

Sample X µL X µL

Total Volume ~40.0 µL ~320.0 µL

a) Add 0.25 - 3.0 μL of PCR product to the SLS-size standard mix. For optimal analysis results do not saturate the detection system by overloading the sample separation with labeled PCR products.

- For more consistent pipetting, the samples should be diluted in SLS and loaded in a larger volume. For example; for 0.25 μL of the original sample, load 2.5 μL of a 1:10 dilution.

- The relative signal strengths of the amplification products vary depending on the dye label. As a guide, roughly equal signal strengths can be obtained by adding the following relative volume of PCR reaction products:

0.1 μL D4 PCR reaction

0.2 μL D3 PCR reaction

0.4 μL D2 PCR reaction

Dilute the reactions appropriately to increase pipetting accuracy. If large volumes of diluted reactions are used, compensate to reach a final injection volume of approximately 40 μL .

iii) The amount of PCR product used will depend upon the efficiency of the PCR reaction. The volumes given above are a recommended starting point. Certain samples may require that more or less volume of the PCR reaction be added. Adding more of the PCR reaction can reduce the signal strength of the size standard peaks and any other sample that is co-injected with it. The effect is exaggerated by salt in the unpurified PCR reactions, as well as the presence of large amounts of unincorporated primers, because all negatively charged molecules compete for electrokinetic injection. Optimal primer incorporation and salt removal may be required for some experiments

A4 Rohdaten

Tab. 19: Fragmentlängen der Waschbärenproben an den Loci PLO-M3, PLO-M2, PLO-M17, PLOT-10

Individuum	PLO-M3		PLO-M2		PLO-M17		PLOT-10	
1001	264	276	279	291	220	224	155	159
1002	264	276	283	295	220	232	159	159
1003	264	276	279	279	216	216	147	159
1004	276	276	291	299	224	224	147	147
1005	264	276	283	295	224	232	143	155
1006	276	276	291	295	220	220	159	159
1007	267	276	291	299	224	232	147	167
1008	276	276	291	299	216	220	159	159
1009	276	276	291	315	212	224	147	155
1010	268	280	279	291	212	220	147	155
1011	276	276	295	315	212	224	155	159
1012	264	276	295	299	212	224	147	167
1013	264	276	291	295	212	224	147	159
1014	276	276	299	299	212	220	147	159
1015	276	276	299	307	216	224	155	159
1016	276	276	291	291	220	224	159	159
1017	276	276	299	299	224	224	159	159
1019	276	276	291	291	216	220	159	159
1020	276	276	295	295	216	232	159	159
1021	264	276	299	299	212	212	147	159
1022	264	276	295	299	212	224	147	147
1024	264	276	291	295	224	224	159	159
2001	264	264	295	299	212	224	147	159
2002	264	276	291	315	220	224	147	159
2003	264	276	299	315	216	220	147	147
2004	264	276	295	295	212	224	159	159
2005	264	264	295	311	224	224	155	159
2006	276	276	291	291	212	220	159	159
2007	264	264	295	299	220	224	147	159
2008	276	276	295	315	212	224	155	159
2009	276	276	279	295	212	216	159	159
2010	264	276	283	299	224	232	147	159
2011	276	276	299	299	220	224	147	159
2012	264	276	299	307	224	224	147	167
2013	264	276	291	295	212	220	159	159
2014	264	276	291	299	212	224	147	159
2015	264	276	295	299	224	224	147	159
2016	276	276	295	299	212	232	147	159
2017	264	276	291	295	220	232	159	159
2018	276	276	295	315	216	224	147	159
2019	264	276	291	295	220	224	147	159
2020	264	276	295	315	220	224	155	159
2021	264	276	295	299	212	224	147	159
3005	267	276	291	295	220	224	159	159
3007	267	276	291	295	212	224	159	159
5001	276	276	279	295	212	216	159	159

Tab. 20: Fragmentlängen der Waschbärenproben an den Loci PLO-M3, PLO-M2, PLO-M17, PLOT-10

Individuum	PLO-M3		PLO-M2		PLO-M17		PLOT-10	
5002	264	276	291	295	220	232	159	159
5003	264	264	283	299	212	224	147	155
5004	264	276	283	315	220	232	147	155
5005	264	276	295	299	212	220	147	159
5006	264	276	295	299	212	220	147	159
5007	276	276	299	299	220	232	159	159
5008	264	276	283	299	220	224	147	159
5009	276	276	283	299	224	232	159	159
5010	264	276	291	311	212	224	155	159
5011	264	276	291	299	220	224	155	159
5012	264	268	291	299	212	212	147	159
5013	264	268	295	299	224	232	147	159
5014	276	276	295	299	212	220	147	159
5015	264	276	283	299	224	232	147	159
5016	264	276	291	311	224	232	159	167
6020	264	268	291	295	212	212	159	159
6022	276	276	315	315	216	220	147	155
6026	276	276	291	295	212	224	155	159
6027	276	276	295	299	220	220	147	159
6028	276	276	295	299	220	224	155	159
6029	276	276	283	295	212	224	159	159
45	264	264	295	315	220	224	143	147
46	264	264	295	299	216	232	143	147
47	276	276	295	299	216	232	143	147
48	264	264	283	299	220	232	147	155
49	264	276	283	315	216	232	147	155
3010	264	276	299	299	220	224	155	159
3013	276	276	283	295	220	224	159	159
3014	276	276	292	299	212	216	159	159
3015	276	276	283	291	212	224	155	159
4005	264	264	291	307	224	224	159	167
4006	276	276	295	299	212	212	159	159
6011	276	276	299	299	220	224	147	159
6030	264	276	295	299	220	212	147	159
6031	276	276	291	296	212	220	159	159
6032	264	276	295	315	212	232	143	159
6033	276	276	283	295	212	220	159	159
6034	264	276	283	315	224	212	147	155
6035	276	276	295	299	220	232	155	159
6036	264	276	295	299	220	212	147	155
6037	276	276	283	295	220	212	155	159
6038	264	267	291	315	220	212	155	159
6039	276	276	295	295	220	220	159	159
6040	276	276	295	295	220	224	159	159
6041	264	276	283	283	220	220	159	159
78	264	276	279	283	212	224	155	155
6042	276	276	295	299	220	224	147	159

Tab. 21: Fragmentlängen der Waschbärenproben an den Loci PLOT-06, PLOT-08, PLO2-123, PLO3-86

Individuum	PLOT-06		PLOT-08		PLO2-123		PLO3-86	
1001	161	165	241	241	575	575	387	411
1002	165	165	229	241	575	583	399	411
1003	165	165	229	241	583	595	399	411
1004	169	173	241	241	583	583	411	415
1005	165	165	241	249	575	575	339	387
1006	165	165	241	241	575	583	395	395
1007	165	169	229	241	575	575	395	411
1008	165	165	241	241	575	575	399	415
1009	165	165	241	241	575	575	399	415
1010	165	169	241	241	575	583	399	415
1011	165	169	241	241	575	575	403	415
1012	165	173	241	241	575	595	399	415
1013	165	165	241	241	575	575	399	411
1014	165	165	241	249	575	575	411	420
1015	161	169	241	241	575	575	339	387
1016	165	165	241	247	575	575	339	415
1017	161	165	241	241	575	575	403	403
1019	165	173	229	241	575	575	342	399
1020	161	173	241	241	583	583	387	411
1021	165	169	241	241	575	575	387	415
1022	165	165	229	249	575	575	399	407
1024	165	165	241	241	575	575	339	394
2001	165	173	241	241	575	575	395	402
2002	161	169	241	249	575	575	399	415
2003	165	173	229	241	575	583	399	415
2004	165	173	241	241	575	575	403	419
2005	165	173	241	241	575	575	411	415
2006	161	165	229	241	575	575	399	411
2007	165	165	241	245	575	575	415	415
2008	165	173	241	241	575	575	415	415
2009	165	165	241	249	575	595	411	419
2010	161	167	241	241	575	583	411	415
2011	161	173	241	241	575	575	415	415
2012	165	173	241	241	575	575	399	411
2013	161	165	241	241	575	575	399	411
2014	165	165	241	249	575	575	399	415
2015	173	173	241	241	575	575	395	415
2016	165	173	229	241	575	575	411	415
2017	161	165	229	241	575	583	411	415
2018	165	165	229	241	575	595	399	404
2019	165	173	241	241	575	575	403	415
2020	165	173	241	241	575	575	403	415
2021	165	173	241	249	575	575	395	399
3005	165	165	241	241	575	583	395	411
3007	161	165	229	241	575	575	415	419
5001	165	165	241	249	575	583	399	403
5002	165	165	229	241	575	575	395	394
5003	165	173	241	241	575	575	387	394
5004	161	165	249	249	575	575	387	399
5005	165	173	241	241	575	575	395	399
5006	165	173	241	241	575	575	395	399

Tab. 22: Fragmentlängen der Waschbärenproben an den Loci PLOT-06, PLOT-08, PLO2-123, PLO3-86

Individuum	PLOT-06		PLOT-08		PLO2-123		PLO3-86	
5007	165	173	241	241	575	595	387	415
5008	161	165	229	241	575	583	399	415
5009	161	165	229	241	575	583	399	415
5010	161	173	241	249	575	575	415	415
5011	165	165	241	241	575	583	395	399
5012	165	173	229	241	575	575	395	419
5013	165	169	229	241	575	575	411	415
5014	165	165	229	241	575	575	411	419
5015	165	173	241	241	575	575	403	419
5016	165	173	241	241	575	575	395	415
6020	165	173	229	241	575	575	395	415
6022	165	165	241	249	575	595	399	415
6026	165	173	229	241	575	575	399	415
6027	161	165	241	241	575	575	399	399
6028	161	165	241	241	575	595	339	415
6029	165	165	241	241	575	595	387	399
45	165	165	241	241	575	583	387	399
46	165	173	241	249	575	583	339	399
47	165	165	229	249	575	575	387	399
48	165	165	229	241	575	575	339	415
49	165	165	229	241	575	575	339	415
3010	165	165	249	249	575	575	399	408
3013	159	165	241	241	575	575	335	411
3014	159	165	241	241	575	575	387	411
3015	165	165	241	249	575	575	407	407
4005	165	173	229	249	575	575	390	411
4006	165	179	241	253	575	575	335	336
6011	165	173	241	253	575	575	335	411
6030	165	173	229	241	575	583	407	411
6031	165	173	229	241	575	583	407	411
6032	165	165	229	241	575	575	383	395
6033	159	165	241	241	575	575	396	411
6034	165	165	241	249	575	575	383	399
6035	165	165	241	249	575	575	407	407
6036	165	165	241	241	575	575	395	399
6037	165	165	229	241	575	594	335	395
6038	161	165	241	241	575	575	411	415
6039	165	165	241	241	575	583	395	399
6040	165	173	241	241	575	575	395	399
6041	165	173	229	253	575	583	407	407
78	165	173	241	241	575	575	419	419
6042	165	173	241	241	575	583	395	407

A 5 Literaturverzeichnis

BFH-Nachrichten (2007). FORSCHUNGSANSTALT FÜR FORST- UND HOLZWIRTSCHAFT 45. Jahrgang Heft 2/2007.

Brown, T. A. (2002). Gentechnologie für Anfänger. Heidelberg.

Cullingham, C. I., C. J. Kyle, et al. (2006). "Isolation, characterization and multiplex genotyping of raccoon tetranucleotide microsatellite loci." Molecular Ecology Notes 6(4): 1030-1032.

Fike, J. A., A. M. Drauch, et al. (2007). "Development of 14 multiplexed microsatellite loci for raccoons *Procyon lotor*." Molecular Ecology Notes 7(3): 525-527.

Frankham, R., J. D. Ballou, et al. (2004). A Primer of conservation genetics. Cambridge.

Fritzell, E. K. (1978b). "Reproduction of raccoons (*Procyon lotor*) in North Dakota." American Midland Naturalist 100: 253-256.

Gehrt, S. D. and L. B. Fox (2004). "Spatial patterns and dynamic interactions among raccoons in eastern Kansas." Southwestern Naturalist 49: 116-121.

Gehrt, S. D. and E. K. Fritzell (1999). "Behavioral aspects of the raccoon mating system: determinants of consortship success." Animal Behaviour 57(3): 593-601.

Hauver, S. A. (2008). Genetic Determinants of raccoon social behavior in a highly urbanized environment, The Ohio State University. Diplomarbeit.

Hohmann, U. and I. Bartussek (2005). Der Waschbär. Reutlingen, Oertel + Spörer Verlags-GmbH + Co.

Kalinowski, S. T., M. L. Taper, et al. (2007). "Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment." Molecular Ecology 16(5): 1099-1106.

Kampmann, H. (1975). Der Waschbär. Verbreitung, Ökologie, Lebensweise, Jagd.

Köhnemann, B. A. (2007). Radiotelemetrische Untersuchungen zu saisonalen Schlafplatznutzungen und Aktionsraumgrößen adulter Waschbären (*Procyon lotor*, L. 1758) in einer Moor- und Sumpflandschaft im Müritz-Nationalpark (Mecklenburg-Vorpommern). Zoologisches Institut. Hamburg, Universität Hamburg. Diplomarbeit.

Konovalov, D. A., C. Manning, et al. (2004). "KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers." Molecular ecology notes 4: 779-782.

Marshall, T. C., J. Slate, et al. (1998). "Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations." *Molecular Ecology* **7**(5): 639-655.

Michler, F.-U. and B. A. Köhnemann. (2009). "Waschbärforschungsprojekt im Müritz-Nationalpark." from <http://www.projekt-waschbaer.de/>. Datum des Zugriffs: 03.09.09

Michler, F.-U. F. (2003). Untersuchungen zur Raumnutzung des Waschbären (*Procyon lotor*, L. 1758) im urbanen Lebensraum am Beispiel der Stadt Kassel (Nordhessen). Institut für Zoologie, Fachbereich Biologie. Halle-Wittenberg, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Mülhardt, C. (2000). Der Experimentator: Molekularbiologie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

Muschik, I. (2008). Radiotelemetrische Untersuchung zum Raum- und Sozialverhalten weiblicher Wschbären (*Procyon lotor* L.) und ihrer Jungtiere während des Winterhalbjahres im Müritz-Nationalpark (Mecklenburg-Vorpommern). Bochum, Ruhr-Universität Bochum. Diplomarbeit.

Nielsen, C. L. R. and C. K. Nielsen (2007). "Multiple paternity and relatedness in Southern Illinois raccoons (*Procyon lotor*)."
Journal of mammalogy **88**(2): 441-447.

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

Schneider, S., D. Roessli, et al. (2000). "ARLEQUIN ver 2.000: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000." Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.

Schreiber, A. and J. Lehmann (1997). Populationsgenetik im Artenschutz. Münster.

Slaska, B. and G. Jezewska (2008). "Bi-paternal litter in Finn raccoon (*Nyctereutes procyonoides* Gray 1834) detected by polymorphic DNA markers "*Folia Biologica-Krakow* **56**(3-4): 193-195.

Slate, J., T. Marshall, et al. (2000). "A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS " *Molecular Ecology* **9**(6): 801-808.