

Schlussbericht zum Kooperationsprojekt:

„Populationsdichte, Populationsstruktur, Migrationsverhalten und Lebensraumnutzung des Rotwildes im linkselbischen Elbsandstein- und Erzgebirge als Grundlage für ein wald-, wildtierökologisch und waldbaulich begründetes Rotwildmanagement“

Berichtsteil: Genetische Untersuchungen

Ute Tröber, Ursula Franke, Marcel Thomae, Klaus Polaczek
Kompetenzzentrum für Wald und Forstwirtschaft (2021)



Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	4
2. STAND DES WISSENS	4
3. MATERIAL	6
3.1. Voruntersuchungen an Gewebe	6
3.2. Haarproben	7
3.3. Kotproben	7
3.3.1. Probesammlung Herbst 2016	7
3.3.2. Sammlung Frühjahr 2017	9
3.4. Gewebeproben	12
4. METHODEN	13
4.1. Transport und Lagerung des Probenmaterials	13
4.2. Etablierung der Labormethodik	13
4.3. Datenauswertung	16
4.3.1. Kotgenotypisierung	16
4.3.2. Populationsgenetik	16
4.3.3. Familienstrukturen	17
5. ERGEBNISSE	18
5.1. Voruntersuchungen an Gewebe	18
5.2. Kotgenotypisierung	19
5.2.1. Herbstsammlung 2016	19
5.2.2. Frühjahrssammlung 2017	21
5.3. Charakterisierung der Rotwildpopulation des Erzgebirges (Gewebe und Haare)	22
5.4. Familienstrukturen	28
5.4.1. Besenderte Tiere	28
5.4.2. Elternschaftsanalyse mit dem Programm CERVUS	28

5.5.	Abgleich zwischen den Stichproben aus dem Untersuchungsgebiet Bärenfels	31
6.	DISKUSSION	36
6.1.	Kritische Bewertung der Methodik	36
6.1.1.	Losungssammlungen.....	36
6.1.2.	Gewinnung der Gewebeproben.....	37
6.1.3.	Analysemethoden.....	37
6.2.	Genetische Auswertung	38
6.2.1.	Fang-Wiederfang-Untersuchung	38
6.2.2.	Genetische Struktur der Rotwildpopulation im Erzgebirge.....	38
7.	SCHLUSSFOLGERUNGEN	41
	LITERATUR	42

1. EINLEITUNG

Im Projekt „Rotwildmanagement pro Waldumbau“ war vorgesehen, die Frischkot-Genotypisierung als ein Referenzsystem zur Schätzung der Populationsgröße einzusetzen. Sie sollte die weiteren Verfahren zur Schätzung der Populationsgröße - Distance Sampling (transektgebundene Erfassung mittels Wärmebildtechnik) sowie Fang-Markierung-Wiederfang Verfahren mittels Fotofallen – die vom Projektpartner Professur für Forstzoologie, TU Dresden (AG Wildtierforschung Tharandt) durchgeführt wurden, ergänzen bzw. helfen, deren Ergebnisse auf Plausibilität zu prüfen. Die Zuständigkeit für die genetischen Untersuchungen lag im Labor des Referates Forstgenetik am Kompetenzzentrum für Wald und Forstwirtschaft bei Sachsenforst. Die Genotypisierung der frischen Losungsproben wurde mit hochvariablen Mikrosatelliten-Markern sowie einem geschlechtsspezifischen Marker durchgeführt. Die Untersuchungen im Rahmen des Rotwild-Projektes waren ab Frühjahr 2017 geplant. Das Jahr 2016 wurde im Rahmen der zur Verfügung stehenden Kapazitäten genutzt, um die Verfahren der Probenammlung und der Analyse zu etablieren, da hier zuvor keine Erfahrungen mit der genetischen Untersuchung von tierischem Material vorlagen.

Neben der Literaturrecherche basieren unsere Ansätze maßgeblich auf den Erfahrungen der Arbeitsgruppe um Dr. Ulf Hohmann (Forschungsanstalt für Waldökologie und Forstwirtschaft Rheinland-Pfalz (FAWF) in Trippstadt) und Dr. Cornelia Ebert (FAWF und SEQ-IT Kaiserslautern), die uns durch eine ausführliche Konsultation den Einstieg in die Thematik wesentlich erleichtert haben (Ebert 2011; Fickel & Hohmann 2006; Brinkman *et al.* 2010). Darüber hinaus lieferte ein Treffen mit Dr. Diana Krajmerová (Labor für Forstpflanzen- und Wildtiergenetik der TU Zvolen) wichtige Hinweise zur Sammlung, Lagerung, Extraktion und Analyse von Haar-, Gewebe- und Kotproben.

Im Verlauf des Projektes gab es im molekulargenetischen Labor einige unvorhersehbare technische sowie personelle Schwierigkeiten, die eine gravierende Verzögerung der Probenbearbeitung zur Folge hatten.

2. STAND DES WISSENS

Genetische Analysen werden schon seit vielen Jahren zur Beschreibung der genetischen Variation von Wildtierpopulationen genutzt, zunächst auf der Grundlage von Isoenzymanalysen (z.B. Hartl *et al.* 1990, Herzog & Gehle 2001, Übersicht in Zachos & Hartl 2011). Seit den 1990er Jahren kommen verstärkt molekulargenetische Marker zur Anwendung. Aufgrund ihrer sehr hohen Variabilität haben sich vor allem Mikrosatelliten-Marker aus dem Kerngenom als besonders geeignet für die Differenzierung von Individuen und Populationen sowie die Charakterisierung genetischer Strukturen erwiesen (z.B. Kuehn *et al.* 2003, Meredith *et al.* 2005, Dellicour *et al.* 2011). Für phylogenetische und phylogeographische Untersuchungen eignen sich vor allem mütterlich vererbte, mit geringeren Mutationsraten behaftete Marker aus der Mitochondrien-DNA (Zachos & Hartl 2011, Fernández-García *et al.* 2014).

Bei beiden Marker-Arten steht für Rotwild inzwischen eine Palette an in der Literatur beschriebenen und praktisch erprobten Markern zur Verfügung (SSR-Marker: Kuehn *et al.* 1996, Meredith *et al.* 2005; mtDNA-Marker: Zachos *et al.* 2003, Ludt *et al.* 2004, Krojerová *et al.* 2013). Aus großräumigen Studien

liegen Informationen über Eiszeitrefugien und die Wiederausbreitung (Ludt *et al.* 2004, Skog *et al.* 2009, Niedziałkowska *et al.* 2011,) sowie über genetische Strukturen und effektive Populationsgrößen auf kontinentaler Ebene (Zachos *et al.* 2016) vor. Mit verschiedenen Markern und Auswerte-Methoden kommen die Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass sich die europäischen Rotwild-Vorkommen im Wesentlichen zwei Linien zuordnen lassen, mit Ausnahme einiger Populationen im Mittelmeerraum, die einer nordafrikanischen Linie (B) zuzurechnen sind. Aus einem Eiszeitrefugium auf der Iberischen Halbinsel und in Südfrankreich ist eine westliche Linie (A) hervorgegangen, die sich über West- und das nördliche Mitteleuropa erstreckt. Eine östliche Linie (C) stammt aus einem Refugium vom Balkan bis zu den Karpaten - von wo aus sie sich nach Nordosten ausgebreitet hat.

Eine relativ große Zahl an Untersuchungen befasst sich mit der genetischen Diversität regionaler und lokaler Populationen und den Auswirkungen der Fragmentierung von Habitaten, selektiver Jagd oder der Gründung von Populationen aus wenigen verfrachteten Individuen (Dellicour *et al.* 2011, Kuehn *et al.* 2003, Fernández-García *et al.* 2014, Zachos *et al.* 2007, Maršáľková *et al.* 2014, Frantz *et al.* 2008).

Darüber hinaus wurden Marker entwickelt, mit deren Hilfe das Geschlecht bestimmt werden kann (Pfeiffer & Brenig 2005, Barbosa *et al.* 2009, Gurgul *et al.* 2010).

Auf Grundlage dieser methodischen und genetischen Kenntnisse wurden in den letzten Jahren Verfahren entwickelt, mit deren Hilfe die Größe und Dichte von Wildtierpopulationen geschätzt werden kann. Basierend auf klassischen Fang-Wiederfang-Methoden wird hierbei auf die genetische Untersuchung mit Mikrosatelliten-Markern aus dem Zellkern und den Vergleich von Kotproben gesetzt. Die Anzahl unterschiedlicher Genotypen und deren Wiederholungsraten bilden die Grundlage für die Schätzung der Populationsgröße, für die verschiedene Programme wie z. B. *capwire* (Miller *et al.* 2005), und MARK (White & Burnham 1999, Boulanger & McLellan 2001) oder SECR (Efford 2016) entwickelt wurden. Für die Ableitung der Populationsdichte ist die Struktur und Größe des Untersuchungsgebietes von entscheidender Bedeutung. Die Modelle basieren in der Regel auf der Annahme, dass es sich um geschlossene Populationen handelt. Da dies in der Realität meist nicht der Fall ist, muss dies bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Die Kotgenotypisierung ermöglicht darüber hinaus die Geschlechtsbestimmung für jedes Individuum und liefert damit wichtige Informationen zum Geschlechterverhältnis in der Population.

Die Populationsschätzung auf Grundlage dieser Methode wurde für verschiedene Wildtierarten beschrieben (Ebert *et al.* 2012a, b, Solberg *et al.* 2006, Lampa *et al.* 2015, Paule *et al.* 2015). Auch für Rotwild sind Ergebnisse entsprechender Untersuchungen publiziert (z.B. Hohmann *et al.* 2011, Grill 2015).

Der Vorteil der Arbeit mit Kotproben besteht in ihrem nichtinvasiven Charakter. Andererseits enthält Losung neben DNA aus der Nahrung und aus der Darmflora meist nur geringe, an der Oberfläche haftende Mengen der benötigten Wirts-DNA in Form abgestoßener Darmwandzellen. Ihre Qualität hängt sehr stark von den jeweiligen Umweltbedingungen ab. In der Regel ist die DNA in Kotproben viel geringer konzentriert und stärker fragmentiert als in Gewebeproben. Bei der Bestimmung der Genotypen ist es daher eine besondere Herausforderung, Fehlansprachen und Missinterpretationen zu vermeiden, da die Populationsgröße sonst überschätzt werden könnte (Prugh *et al.* 2005; Waits & Paetkau 2005). Um die Fehlerrate bei der Genotypisierung so gering wie möglich zu halten, wurden

verschiedene Kontrollverfahren entwickelt, die auf hohen Analyse-Wiederholungsraten basieren (Broquet & Petit 2004, McKelvey & Schwartz 2004a, b).

Die Kombination verschiedener Verfahren ermöglicht ein umfassenderes Bild, um Informationen über großräumige Verteilung der genetischen Variation einer Art, aber auch über den Zustand und die Entwicklung von Populationen abzuleiten (Zachos *et al.* 2016, Matosiuk *et al.* 2019, Fussi *et al.* 2020).

3. MATERIAL

3.1. Voruntersuchungen an Gewebe

Um Erfahrungen mit den Primern und der auftretenden Variation an den untersuchten Markern zu sammeln, wurden zunächst Gewebeproben (Muskelfleisch, Leber, Ohrknorpel, Haare) von im Winter 2015/2016 erlegten Stücken aus dem Forstbezirk Bärenfels und dem Nationalpark Sächsische Schweiz angefordert. Zur Entnahme der Proben wurden mit Alkohol gefüllte Röhren und eine Sammelanleitung verschickt. Insgesamt gingen Proben von 33 Individuen (Abb. 1) ein, wobei von einigen Stücken zwei Proben, z.T. von verschiedenen Gewebearten, zur Verfügung standen. Diese Beispiele dienten zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Außerdem wurden eine Probe Muffelwild (*Ovis gmelini musimon* Pallas, 1811) und neun Proben Rehwild (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758) untersucht, um festzustellen, ob die verwendeten Marker eine sichere Abgrenzung zwischen Rotwild und diesen beiden Arten ermöglichen. Der sichere, frühzeitige Ausschluss anderer Wildarten aus der Analyse hilft, die Analysekapazitäten zielgerichtet zu nutzen.

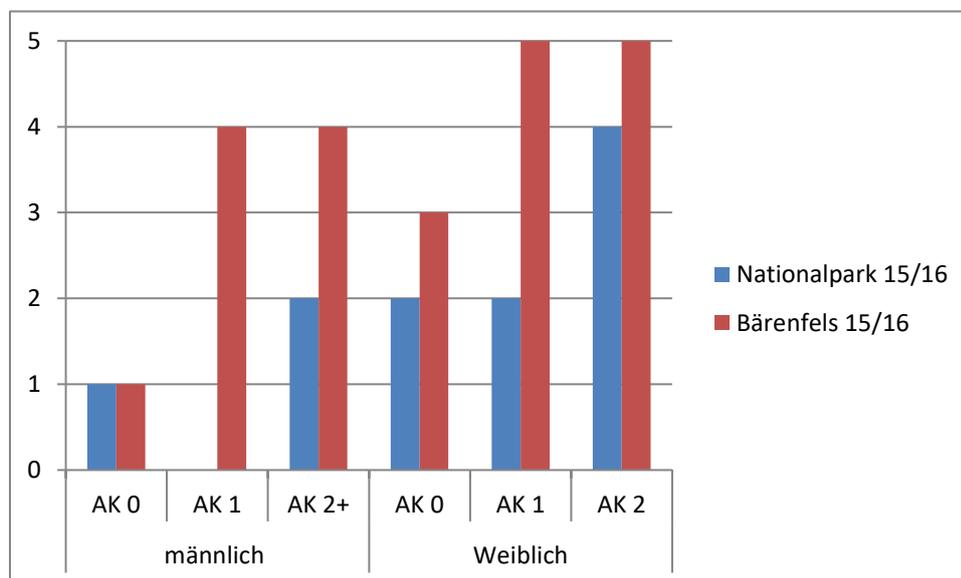


Abb. 1: Verteilung der untersuchten Testproben nach Herkunftsgebiet, Jagdjahr, Geschlecht und Altersklasse

3.2. Haarproben

Von den im Rahmen des Projektes besenderten Tieren erhielten wir vom Projektpartner (AG Wildtierforschung Tharandt) insgesamt 45 Haarproben zur Genotypisierung. Die Verteilung auf Untersuchungsgebiete und Geschlechter ist in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Untersuchte Haarproben nach Untersuchungsgebiet und Geschlecht

Untersuchungsgebiet	weiblich	männlich	Kalb (w)	Kalb (m)
FoB Neustadt	1	2		
FoB Bärenfels	7	6	1	
FoB Neudorf	7	5	1	1
FoB Eibenstock	7	3	1	3

Die kurz nach ihrer Geburt mit Ohrmarken markierten Kälber besenderter Alttiere sollten es ermöglichen, die Raumnutzung von Mutter und Kind während des ersten Lebensjahres gemeinsam zu betrachten. Im Zuge der genetischen Analysen wurde die Nachkommenschaft überprüft, um Fehlzuordnungen bei Alttier-Kalb-Paarungen auszuschließen.

Nicht in jedem Fall konnten komplette Haare mit Wurzeln gewonnen werden, was negative Auswirkungen auf die Qualität der extrahierten DNA haben kann.

3.3. Kotproben

3.3.1. Probesammlung Herbst 2016

Im November 2016 wurde eine Testsammlung von Kotproben durchgeführt, um methodische Fragen zu klären, erste Erfahrungen mit dem Verfahren zu sammeln und potentielle Sammler zu schulen. Dabei wurde am ersten Tag eine Informationsveranstaltung, kombiniert mit einer gemeinsamen Begehung im Wildgehege Tharandt, durchgeführt. Bei einem anschließenden gemeinsamen Testdurchlauf im Tharandter Wald wurden Fragen zur Einschätzung der Proben (Wildart, Frischegrad), zur Art der Sammlung und zur Dokumentation geklärt (Abb. 2). In den folgenden zwei Tagen waren die Werkvertrag-Nehmer eigenständig in einem Testgebiet im oberen Osterzgebirge (Teil des Untersuchungsgebietes Bärenfels) unterwegs, um eine praxisnahe Sammlung auf den vorgegebenen Transekten zu absolvieren.



Abb. 2: Sammlung und Dokumentation von Kotproben

Die Suche erfolgte auf einer Fläche von 1.665 Hektar mit einem Schwerpunkt im heutigen Landeswaldrevier Rehefeld sowie anteilig in den Landeswaldrevieren Lehmühle, Bärenfels und Schellerhau. Die Transekte wurden in Ost-West-Richtung in einem Abstand von 500 Metern angelegt (Abb. 3). Die gesamte Transektlänge betrug 34,2 Kilometer (2.053 Meter je 100 Hektar untersuchter Fläche). Die tatsächlich abgelaufene Wegstrecke liegt über diesem Wert, weil die Suchenden innerhalb eines 20 Meter breiten Puffers nach Losung suchten, sie bei ihrem Weg Hindernissen ausweichen und bei Erreichen eines Transektendes den Beginn des neuen Transektes aufsuchen mussten. Eine aktive Einbeziehung der privaten Jagdbezirke in die Testsammlung erfolgte nicht, sodass die eingeschlossenen Offenlandbereiche nicht aktiv abgesucht wurden.

Ziel war die Etablierung eines Verfahrens, das zuverlässig und praktikabel die Sammlung und Analyse einer ausreichend großen Probenzahl ermöglicht und zu einer hohen Ausbeute an sicher und reproduzierbar bestimmten Genotypen führt. Die Testsammlung ergab 467 Proben mit dokumentierten Koordinaten, einer Einschätzung der Probenfrische in drei Stufen (.

Tab. 2) und des Deckungsgrades im Umkreis einer Baumlänge, die alle analysiert wurden.

Tab. 2: Bezeichnung und Beschreibung der einzuschätzenden Frischestufen der Kotproben

F	frisch, Oberfläche glatt und glänzend
M	mittel – Oberfläche matt, aber noch keine Anzeichen von Zersetzung
A	alt – Zersetzung hat begonnen

Im Ergebnis der Testsammlung wurde die Leistungsbeschreibung für die Vergabe der Sammlung im Frühjahr 2017 formuliert.

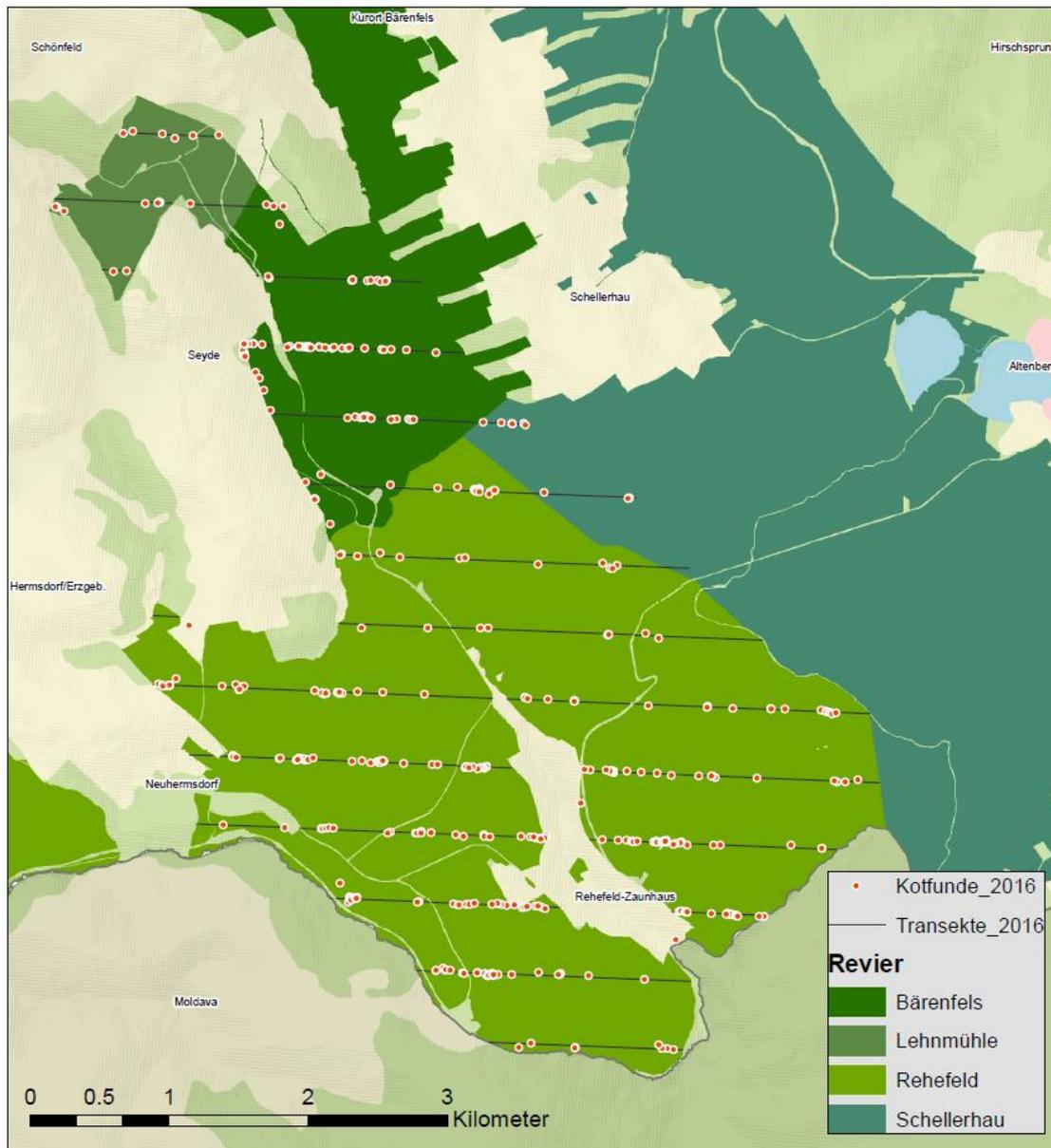


Abb. 3: Transekte im 500m - Abstand sowie Fundstellen frischer Losung im Testdurchlauf 2016.

3.3.2. Sammlung Frühjahr 2017

Basierend auf den positiven Erfahrungen der Voruntersuchungen im Jahr 2016 wurde die eigentliche Probensammlung für das zeitige Frühjahr 2017 geplant und im Zeitraum vom 20. bis 22. März (1. Sammlung) sowie 25. bis 27. April (Wiederholungssammlung) entlang der vorgegebenen Transekte durchgeführt (Anlage 1). Die untersuchte Waldfläche im Untersuchungsgebiet Bärenfels betrug 8.234 Hektar. Die Transekte hatten eine Gesamtlänge von 159 Kilometern (1.931 Meter je 100 Hektar untersuchter Fläche) und waren wie bei der Testsammlung im Jahr zuvor in Ost-West-Richtung bei einem Abstand von 500 Metern angelegt (Abb. 5). In die untersuchten Waldflächen waren auch Siedlungen und Offenlandbereiche eingeschlossen, die nicht systematisch abgesucht werden sollten. Zufallsfunde von Proben, die beispielsweise beim Überqueren von Offenlandbereichen aufgefunden

wurden, wurden dennoch analog zu den Funden im Wald kartiert und in die Analysen einbezogen. Die tatsächlich abgelaufene Wegstrecke liegt auch hier über der Summe der Transektlängen, weil die Suchenden innerhalb eines 20 Meter breiten Puffers nach Losung suchten, sie bei ihrem Weg Hindernissen ausweichen und bei Erreichen eines Transektendes den Beginn des neuen Transektes aufsuchen mussten.

Obwohl die Populationsdichteschätzung mit *capwire* grundsätzlich nicht auf einen zweiten, in geringen zeitlichen Abstand durchgeführten, Sammlungsdurchgang angewiesen ist, wurde dieser als notwendig betrachtet, um zusätzliche Fang-Wiederfang-Berechnungen anstellen zu können und die Stichprobe zu vergrößern. Da von einem immensen Analyse- und Auswertungsaufwand bei zunächst unklarer statistischer Absicherung ausgegangen werden musste, wurde nur das Teiluntersuchungsgebiet Bärenfels bearbeitet. Die Ergebnisse sollten im besten Fall als Referenzmaß für die weiteren, parallel durchgeführten Methoden zur Bestandesschätzung auch in den drei anderen Untersuchungsgebieten angewendet werden.

Der erste Durchgang im März lieferte ca. 1.600 Proben, der zweite Ende April durchgeführte knapp 700. Die Probensammlungen erfolgten nach einem feuchten Winter. Während die Märzsammlung problemlos verlief, musste die ursprünglich für die erste Aprilwoche avisierte Wiederholungssammlung auf Grund anhaltender Schneelagen und nachfolgend ausdauernder Regenfälle auf in die letzte Aprilwoche verschoben werden. Auch während der letztlich um rund drei Wochen verschobenen Sammlung herrschte dann feucht-kühle Witterung vor (Abb. 4).

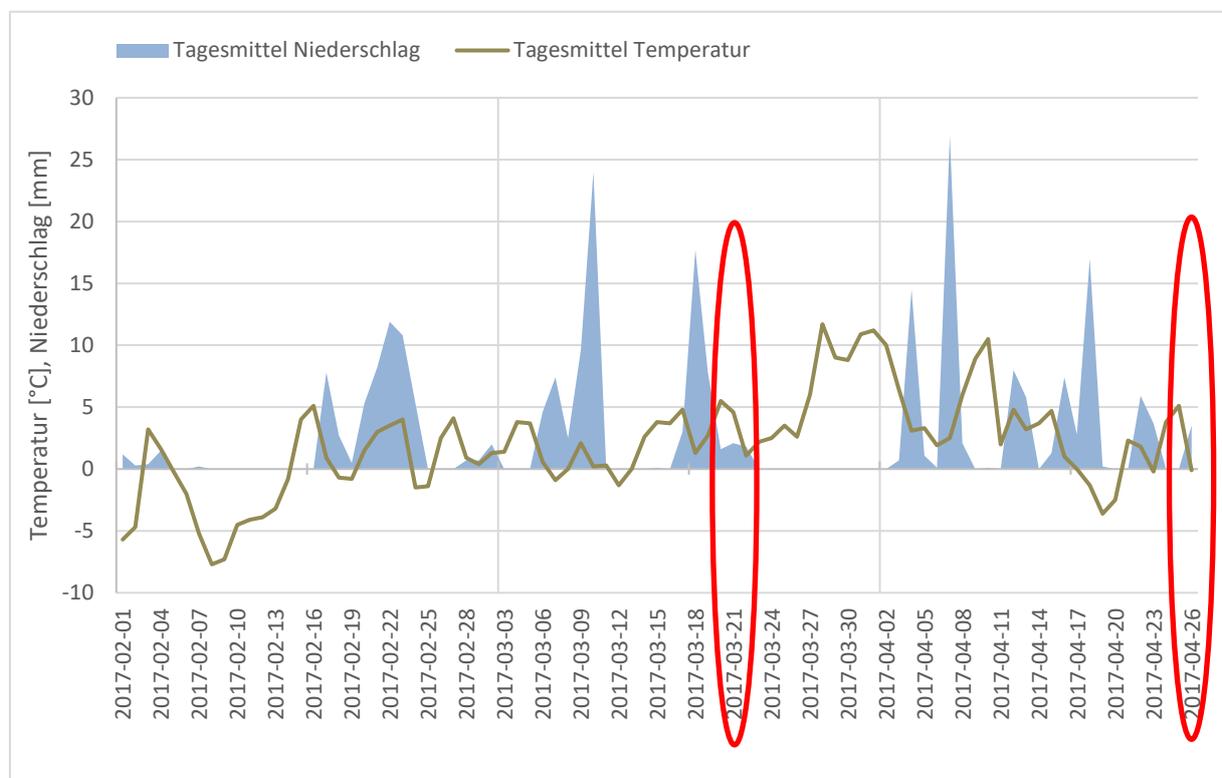


Abb. 4: Witterungsverlauf (Tagesmittel Temperatur und Niederschlag) zwischen dem 1. Februar und dem 27. April 2017 an der DWD – Station Zinnwald (Datenquelle: www.data.opensensorweb.de)

3.4. Gewebeproben

Um Informationen über die Erlegung von Stücken zu erhalten, die bei der Kotsammlung erfasst worden sind, wurden aus dem Forstbezirk Bärenfels Gewebeproben gesammelt. Ab dem Zeitpunkt der Herbstsammlung 2016 erhielten wir 9 Gewebeproben von im November 2016 und Januar 2017 erlegten Stücken aus den Revieren Rehefeld (N=3) und Bärenfels (N=6). Im Jagdjahr 2017/2018 wurden im Forstbezirk Bärenfels 80 Proben von allen erlegten Stücken außer AK 0 (Kälber, die zum Zeitpunkt der Sammlungen noch nicht geboren waren) gesammelt und dem Labor zur Verfügung gestellt.

Um die Rotwildpopulation des Erzgebirges insgesamt zu charakterisieren, wurden im Jagdjahr 2018/2019 Gewebeproben in den Forstbezirken Neustadt, Bärenfels, Marienberg, Neudorf, Eibenstock und Adorf gesammelt. Dabei sollten je Forstbezirk mindestens 48 Proben so gesammelt werden, dass die Geschlechter etwa gleich vertreten sind und die Proben über die Reviere möglichst repräsentativ für die Rotwildvorkommen verteilt sind. Insgesamt wurden im Jagdjahr 2018/2019 274 Proben gesammelt, deren Verteilung im Großen und Ganzen den oben genannten Vorgaben entspricht (Abb. 6).

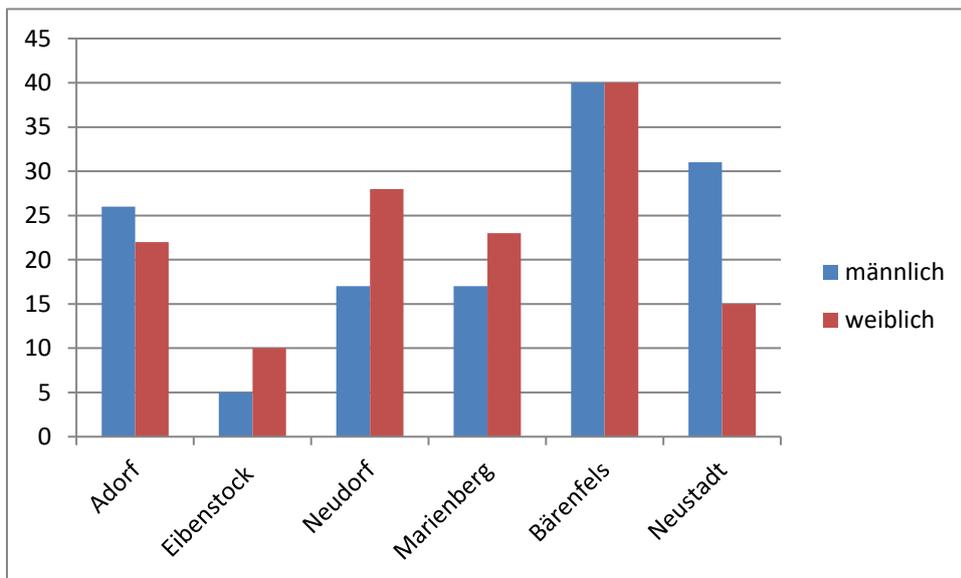


Abb. 6: Probenübersicht 2018/19 nach Forstbezirk und Geschlecht

Aus dem Forstbezirk Bärenfels stehen damit aus mehreren Jahren insgesamt 191 Proben – 93 männliche und 98 weibliche – zur Verfügung (Tab. 3).

Tab. 3: Übersicht der Proben aus dem Forstbezirk Bärenfels, gesammelt aus vier Jagdjahren

Jagdjahr		15/16	16/17	17/18	18/19
männlich	AK 0	1	2	1	0
	AK 1	4	0	26	14
	AK 2+	4	1	14	26
weiblich	AK 0	3	1	1	0
	AK 1	5	1	16	11
	AK 2	5	4	22	29
Probenzahl gesamt		22	9	80	80
Proben männlich		9	3	41	40
Proben weiblich		13	6	39	40

4. METHODEN

4.1. Transport und Lagerung des Probenmaterials

Für die Gewinnung der Gewebeproben wurden mit Alkohol gefüllte, mit einer Labornummer versehene Röhrchen mit Liste und eine Sammelanleitung (siehe Anlage) verschickt. Die Entnahme der Proben erfolgte vor Ort direkt nach der Jagd. Die Proben wurden im jeweiligen Forstbezirk ggf. auch über einen längeren Zeitraum gesammelt und mit einer Kopie des Wildursprungsscheines an das Labor geschickt. Der Wildursprungsschein stellt die Verbindung der Probe zu Altersklasse, Geschlecht und Erlegungsort des Tieres her. Die Lagerung im Alkohol ermöglichte eine Konservierung der Proben auch ohne durchgängige Kühlung. Im Labor wurden sie im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Haarproben wurden trocken in Papier transportiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei Zimmertemperatur gelagert.

In einer Testreihe wurden verschiedene Varianten für Transport und Lagerung der Kotproben verglichen (Ethanol, Extraktionspuffer, Silicagel, Frost). Direkt nach der Überführung ins Labor wurden Teile der Proben einer DNA-Extraktion unterzogen. Zu diesem Zeitpunkt konnten kaum Unterschiede zwischen den Varianten festgestellt werden. Nach etwa vier Wochen wurde die Extraktion wiederholt, was zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führte. Als am besten geeignet bestätigte sich die Sammlung in Plastiktüten und eine durchgehende Kühlung, d.h. knapp über 0°C während der Sammlung und -20°C nach der Ankunft im Labor.

4.2. Etablierung der Labormethodik

Die Extraktion der DNA aus den verschiedenen Materialarten wurde standardmäßig mit dem Extraktionsgerät InnuPure C16® (Analytik Jena) durchgeführt, das die Automatisierung der Arbeiten nach einem manuellen Lyseschnitt ermöglicht. Dabei kamen die Kits innuPREP DNA Kit-IPC16® für Gewebe (und Haare), innuPREP Stool DNA Kit-IPC16® für Kot und innuPREP Forensic DNA Kit-IPC16® für schwierige Haar- und sonstige Proben zum Einsatz. Dabei wurde in der Regel entsprechend der Protokolle der Hersteller gearbeitet. Eine Ausnahme bildete der Lyse-Schritt bei den Kotproben: je etwa drei Pellets einer Probe wurden in 50-ml-Zentrifugenröhrchen mit 1 ml Lysepuffer ca. 1,5 bis 2 Stunden geschwenkt und dann das dabei entstandene Lysat direkt in der Extraktion verwendet.

Die Auswahl der Mikrosatelliten-Marker und der Primerkombination zur Geschlechtsbestimmung (Tab. 4) orientierte sich vorrangig an der Arbeit von Ebert (2011), wurde aber um einige weitere Marker ergänzt.

Tab. 4: Übersicht der getesteten Genmarker

Marker	Label	Quelle
Haut14	Cy5	Kuehn <i>et al.</i> 2003, Ebert 2011
BMC1009	Cy5	Valière <i>et al.</i> 2006, Ebert 2011
TGLA53	DY-751	Valière <i>et al.</i> 2006, Ebert 2011
CSSM16	DY-751	Kuehn <i>et al.</i> 2003, Ebert 2011
CSSM19	DY-751	Kuehn <i>et al.</i> 2003, Ebert 2011
BM203	BMN-6	Valière <i>et al.</i> 2006, Ebert 2011
IDVGA55	BMN-6	Valière <i>et al.</i> 2006, Ebert 2011
ILSTS06	Cy5	Kuehn <i>et al.</i> 2003
CSRM60	Cy5	Kuehn <i>et al.</i> 2003
CSSM66	BMN-6	Kuehn <i>et al.</i> 2003
AMELXY	Cy5	Gurgul <i>et al.</i> 2010

Die PCR der Marker (Tab. 4) wurden im Rahmen von Voruntersuchungen so optimiert, dass sie in drei Multiplex-Ansätzen und einer Einzelreaktion durchgeführt werden konnten (siehe Anlage 2), wozu das *Type-it* Microsatellite PCR-Kit der Firma QIAGEN verwendet wurde. Die mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierten Primer wurden bei der Firma biomers.net bestellt. Die beiden in der Tabelle grau hinterlegten Primer ILSTS06 und CSSM66 mussten aufgrund mangelnder Trennschärfe und unzureichender Reproduzierbarkeit ausgeschlossen werden.

Die PCR-Produkte wurden mit dem genetischen Analyse-System GeXP® der Firma Beckman Coulter zur Bestimmung der Fragmentlängen untersucht. Die Messung der spezifischen Längen der Mikrosatelliten-Fragmente basiert auf dem Verfahren der Kapillar-Elektrophorese, wobei jeweils die PCR-Produkte mit blauen, grünen oder schwarzen Fluoreszenz-Farbstoff-Labels versehen sind und

gemeinsam mit rot markierten Standardfragmenten definierter Länge im elektrischen Feld der Kapillare wandern. Die Dauer der Wanderung ist abhängig von der Fragmentlänge und wird am Ende der Kapillare durch eine optische Einheit erfasst, die mithilfe eines Lasers den Fluoreszenz-Farbstoff erkennt. Aus der bekannten Länge der Standardfragmente berechnet die Software des Systems die Länge der Probenfragmente (siehe Anlage).

Der geschlechtsspezifische Marker AMELXY (Gurgul *et al.* 2010) trägt am X-Chromosom ein spezifisches Allel von 280 bp Länge und am Y-Chromosom ein Allel von 227 bp. Demzufolge lässt es auf den geschlechtlichen Status XX schließen, wenn das Allel 280 homozygot vorkommt, es handelt sich also um ein weibliches Individuum. Der Genotyp 227/280 weist dagegen auf die Chromosomen YX hin und ist charakteristisch für männliche Tiere.

Bei den Haar- und Gewebeproben lagen im Ergebnis eines Analysedurchganges in der Regel vollständige, sicher interpretierbare und reproduzierbare Genotypen für die untersuchten Marker vor. Demzufolge wurden Wiederholungsanalysen an diesen Materialarten nur bei Bedarf durchgeführt.

Im Gegensatz dazu ist die DNA aus Kotproben oft so gering konzentriert und kann so stark degradiert sein, dass ein einzelnes Analysenergebnis nur einen Teil des jeweiligen Genotyps abbildet und es zu Fehlsprachen des Genotyps kommt. Deshalb kann es vorkommen, dass einzelne Marker kein Ergebnis zeigen, obwohl aus der gleichen PCR ein anderer Marker eindeutig auswertbar ist oder dass innerhalb eines Markers nur das eine oder das andere Allel sichtbar wird („allelic dropout“). Darüber hinaus kann es auch zur Fehlinterpretation von Artefakten („false alleles“) kommen (Taberlet *et al.* 1996). Um die Fehlerrate zu minimieren, wurden für solche Proben verschiedene Verfahren entwickelt, die auf der systematischen Durchführung mehrfacher PCR-Reaktionen und nachfolgenden Analysen jeder Probe (Taberlet *et al.* 1996) und dem Vergleich der dabei entstehenden genetischen Profile (Frantz *et al.* 2003, Peatkau *et al.* 2003) basieren. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Ansätze kombiniert (Puechmaille & Petit 2007), um die einzelnen Ergebnisse zu Konsensus-Genotypen zusammenzustellen. Für jeden Marker wurde der Konsensus-Genotyp dann festgelegt, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

- Heterozygot: es wurde mindestens zweimal die identische Allelbesetzung aus zwei verschiedenen Allelen festgestellt
- Homozygot: das ausschließliche Auftreten ein und desselben Allels hat sich dreimal bestätigt

Um den logistischen Aufwand im Labor und das Potenzial an Fehlerquellen im Rahmen zu halten, hat es sich als praktikabel erwiesen, zunächst mit jeder Probenplatte (96 Proben) 2-3 komplette Analysendurchgänge über alle Marker durchzuführen. Deren Auswertung führte zu drei Probenkategorien:

1. Für einzelne Proben lagen danach bereits vollständige Genotypen an allen Markern vor. Diese Genotypen gingen ohne weitere Wiederholungen in die Endauswertung ein.
2. Proben, die an bestimmten Markern ein reproduzierbares Ergebnis aufwiesen, das aber an anderen Markern noch ganz fehlte oder nicht in der oben genannten Art eindeutig war, wurden als erfolgsversprechend eingestuft und für die nächsten drei Analysendurchgänge zusammengestellt.
3. Proben, die nicht in die Kategorien 1 oder 2 eingeordnet werden konnten, wurden von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Dabei handelte es sich in der Regel entweder um

Kot anderer Wildarten, oder um Proben, von denen Wirts-DNA nur in zu geringer Menge bzw. in zu schlechter Qualität extrahiert werden konnte, oder um Mischproben (Losung verschiedener Tiere an ein und demselben Fundpunkt, die als eine Probe angesehen und gesammelt worden war).

4.3. Datenauswertung

4.3.1. Kotgenotypisierung

Die Zusammenstellung von Konsensus-Genotypen erfolgte manuell in Microsoft Excel. Das eröffnete die Möglichkeit, kleine Unsicherheiten oder Unstimmigkeiten an einzelnen Markern zunächst im Datensatz zu belassen. So konnten einerseits unspezifische Signale, die fälschlicherweise zur Ansprache eines zweiten Allels an einem homozygoten Marker oder zu einer falschen Genotypen-Bezeichnung an einem heterozygoten Marker geführt hätten, erkannt werden. Andererseits war so leichter festzustellen, ob das Fehlen eines zweiten Signals in einzelnen Analysen wirklich auf einen Homozygoten schließen lässt, oder es sich um eine Probe handelt, bei der in einigen Fällen nur eines der beiden Allele nachgewiesen werden konnte, die tatsächlich aber am betreffenden Marker heterozygot ist.

Die nachfolgende Suche nach Wiederfinden des gleichen Genotyps wurde überwiegend mit dem Programm GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse 2006, 2012) durchgeführt, mit dem nach Proben mit identischem Genotyp oder mit ähnlichem Genotyp unter Angabe der maximalen Anzahl unterschiedlicher Loci gesucht werden kann.

Für die Schätzung der Populationsgröße wurde das Programm *capwire* (Miller *et al.* 2005) verwendet, das speziell für die mehrfache Beprobung von Individuen innerhalb einer Sammlung entwickelt wurde, obwohl es zuverlässiger für kleine Populationen ist. Die Berechnung basiert auf Wiederholungsraten von Genotypen in einer Stichprobe, die aus der Art und Weise der Bewegung von Individuen in der Fläche und ihrer Häufigkeit der Losungsabgabe resultieren. Die Genauigkeit der Schätzung hängt wesentlich von der Verteilung der Wiederholungsraten ab, also von der Anzahl der Genotypen, die je ein-, zwei-, dreimal und so weiter nachgewiesen wurden.

Das Basismodell (*Equal Capture Model*) unterstellt für jedes Individuum der Population eine gleiche Nachweiswahrscheinlichkeit bei jeder Ziehung einer Probe. Beim *Two Innate Rates Model* werden zwei Teilpopulationen mit unterschiedlicher Nachweiswahrscheinlichkeit unterstellt. Für jede Modellierung muss ein oberer Grenzwert der möglichen Population angegeben werden – dieser wurde für die Testsammlung auf 400 festgelegt.

4.3.2. Populationsgenetik

Die Untersuchung der Gewebe- und Haarproben dient dem Ziel, die genetische Variation der Rotwildvorkommen entlang des Erzgebirges zu erfassen und zu beschreiben. Von besonderer Bedeutung ist die Frage, ob sich aus dem Ergebnis Hinweise einer Differenzierung von Teilpopulationen erkennen lassen.

Um möglicherweise vorhandene Teilpopulationen des Rotwildvorkommens im Erzgebirge zu erkennen und deren Struktur zu beschreiben, wurden alle vorhandenen Gewebe- und Haarproben anhand ihrer

geografischen Koordinaten von West nach Ost sortiert. Nach ihrer Lage wurden sie in potenzielle geografische Kollektive eingeteilt, die entweder nach den Forstbezirken oder, soweit es geografisch sinnvoll (z.B. durch Höhenlage) erschien, auch detaillierter begrenzt waren (Abb. 9, Tab. 6). Mit dem Programm STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000, 2009) wurde für alle Genotypen die Zuordnung zu genetisch homogenen Gruppen simuliert, wobei die Information über die Zugehörigkeit zu den vorab gebildeten Kollektiven nicht berücksichtigt wurde. Das Programm weist auf der Grundlage einer Bayesschen Clusteranalyse für den Multilocus-Genotyp jedes Individuums die relativen Anteile der Zugehörigkeit zu k vorgegebenen Clustern aus. Dabei sucht das Modell nach Gruppen, die möglichst wenig vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abweichen und quantifiziert deren logarithmische Wahrscheinlichkeit für jede getestete Gruppenzahl k . Für die Simulation wurden die Annahmen getroffen, dass es sich um Populationen mit genetischem Austausch („admixture model“) und korrelierenden Allelhäufigkeiten („correlated allele frequency model“) handelt. Um die aus den untersuchten Daten plausibelste Anzahl von Clustern zu finden, wurden die Mischungsanteile für $K=1-10$ Cluster mit je 10 Wiederholungen durchgeführt, wobei jede Simulation aus Monte-Carlo-Markov-Ketten mit 50.000 „burn-in“-Generationen und 50.000 beprobten Generationen bestand. Die Daten wurden für das Programm STRUCTURE mit dem Programm CONVERT (Glaubitz 2004) formatiert. Die Auswertung und Visualisierung der Wahrscheinlichkeitsdaten zur Bestimmung der plausibelsten Gruppenanzahl K erfolgte mit der online-Version des Programms STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt 2012) auf Basis der Methode von Evanno *et al.* (2005).

In die STRUCTURE-Analyse gingen auch die 11 Proben der Voruntersuchung aus dem Nationalpark Sächsische Schweiz mit ein, obwohl sie aus dem ostelbischen Teil stammen und somit geografisch deutlich vom Untersuchungsgebiet des Projektes abgegrenzt sind. Für die weitere populationsgenetische Auswertung wurden sie aufgrund der geringen Stichprobenzahl nicht berücksichtigt.

Zur populationsgenetischen Beschreibung der Populationen, die sich aus der STRUCTURE-Analyse ergaben, wurden genetische Parameter mit Hilfe des Programmes GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse 2006, 2012) berechnet, die sich auf die Anzahl verschiedener Allele und deren relative Häufigkeit innerhalb der Populationen beziehen. Für Vergleiche der genetischen Strukturen zwischen den Teilpopulationen wurden die Verteilung der relativen Allelhäufigkeiten und die genetischen Abstände nach Nei (1972) verwendet. Dabei wurde auch untersucht, ob zwischen den männlichen und weiblichen Teilpopulationen Unterschiede in den genetischen Strukturen bestehen.

4.3.3. Familienstrukturen

Die Software CERVUS (Kalinowski *et al.* 2007) bietet die Möglichkeit, Familienstrukturen näher zu untersuchen. Auf Grundlage der erfassten Allelhäufigkeiten wird zunächst die Datenqualität analysiert, indem die Abweichung von Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, der Anteil an Null-Allelen und die nicht-Ausschluss-Wahrscheinlichkeit für die Eltern einzeln oder als Paar sowie für die Identität und die Familienzugehörigkeit geschätzt werden. Für die nachfolgende Simulation einer Elternschaftsanalyse wurde die Größe eines Gesamt – Frühjahrsbestandes der tschechischen und sächsischen Erzgebirgspopulation (etwa von Klingenthal im Westen bis zur Elbe im Osten) geschätzt. Der Kalkulation liegen die Populationsdichteschätzungen des Kooperationspartners TU Dresden für die vier Untersuchungsgebiete, Streckenrückrechnungen für den Landeswald im mittleren Erzgebirge (Forstbezirk Marienberg) sowie Literatur zur Populationsdichteschätzung auf Basis von Kotzählungen

(Pellet Group Counts) in mehreren grenznahen tschechischen Untersuchungsgebieten (Cukor *et al.* 2017; Vala & Ernst 2018) zugrunde. Die Schätzung ergab, dass im Frühjahrsbestand 2018 auf einer Gesamtwaldfläche von etwas mehr als 230.000 Hektar ca. 9.300 Tiere zuzüglich der Kälber gelebt haben könnten. Für die Simulation wurde mit mindestens 50.000 Nachkommen, 5.000 Kandidaten-Müttern bzw. 4.000 Kandidaten-Vätern bei einem Erfassungsanteil von je 0,05 kalkuliert.

Die Ergebnisse der Simulation gehen in Form der kritischen Werte für die statistische Signifikanz in die eigentliche Elternchaftsanalyse ein. Für die Durchführung werden vier Dateien benötigt: In drei einzelnen Dateien werden jeweils die erfassten Nachkommen, die Kandidaten-Mütter und die Kandidaten-Väter definiert. Da es zwischen den Generationen keine eindeutige Abgrenzung gibt und die Probensammlung über einen verhältnismäßig langen Zeitraum erfolgte, wurden alle Gewebeproben aus den Altersklassen 0, I und II als Nachkommen definiert, alle aus den Altersklassen I, II und höher als Kandidaten-Eltern. Aus der Stichprobe der Haarproben wurden die Kälber der Datei Nachkommen zugeordnet, alle anderen der Datei Kandidaten-Eltern, obwohl auch diese Tiere theoretisch Nachkommen von Eltern sein könnten, die sich im Datensatz befinden. Die aus dem Programm errechneten potenziellen Kind-Eltern-Paare wurden im Nachgang individuell auf Plausibilität geprüft. Da für die Kotproben keine Altersangaben vorlagen, konnten sie in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt werden. Die vierte Datei enthält die Genotypen aller Individuen.

In der Analyse kann für Nachkommen, bei denen ein Elternteil bekannt ist, nach Individuen gesucht werden, die wahrscheinlich als das jeweils andere Elternteil in Frage kommen. Auch für Nachkommen, bei denen beide Eltern unbekannt sind, kann nach wahrscheinlichen Eltern einzeln oder paarweise recherchiert werden. Als Referenzen für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse standen zum Ersten Mutter-Kind-Paare aus der Besenderung zur Verfügung. Zum Zweiten wurden aus den Daten der Gewebeproben 16 Paare herausgefiltert, bei denen je ein Alttier und Kalb mit dem gleichen Datum und Ort der Erlegung im Wildursprungsschein verzeichnet waren. In diesen Fällen wurde eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine potentielle Mutter-Kind-Beziehung unterstellt, die im Rahmen der CERVUS-Analyse näher untersucht wurde.

5. ERGEBNISSE

5.1. Voruntersuchungen an Gewebe

Die Analyse der Gewebeproben von erlegtem Rotwild aus dem Forstbezirk Bärenfels und dem Nationalpark Sächsische Schweiz zeigte für die meisten Marker eine hohe Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit. In wenigen Fällen lagen Abweichungen an einzelnen Genorten vor, die Nachjustierungen an der Methodik erforderten.

Die untersuchte Muffelwild-Probe zeigte an folgenden Genorten Allele, die außerhalb der Bereiche lagen, in denen Rotwild-Allele auftreten: CSSM16, Haut14, TGLA53 und CSRM60. Auch für die Rehwild-Proben wurden an einigen Loci Rotwild-unspezifische Allele gefunden: AMELXY, CSSM19 und CSRM60. Anhand dieser Loci lassen sich sowohl Muffel- als auch Rehwildproben vom Rotwild unterscheiden. Die wenigen Proben erlauben keine Aussage, ob es Überschneidungen zwischen den Variationsbereichen der Arten gibt. Die Unterschiede zwischen Rotwild und den beiden anderen Arten treten aber jeweils an mehreren Genorten auf. Darüber hinaus sind die Proben der beiden Arten meist durch schlechtere Amplifikationsergebnisse gekennzeichnet. Deshalb erscheint die

Wahrscheinlichkeit, Proben fremder Arten zu identifizieren oder aufgrund sehr unvollständiger Analysenergebnisse von der weiteren Analyse auszuschließen, als sehr hoch. Für nahe verwandte Hirscharten kann aus dieser Untersuchung keine Aussage getroffen werden. Die in Frage kommenden Arten Damhirsch (*Dama dama*, Linnaeus, 1758) und Sikahirsch (*Cervus nippon*, Temminck, 1838) kommen im Untersuchungsgebiet allenfalls sporadisch vor und haben keinen Einfluss auf das Gesamtergebnis.

Die Genotypen der im Rahmen der Voruntersuchung analysierten Rotwild-Gewebeproben wurden später in die Gesamtauswertung mit einbezogen.

5.2. Kotgenotypisierung

5.2.1. Herbstsammlung 2016

Aus den 467 Proben, die relativ gleichmäßig über die abgesuchte Strecke verteilt waren (Abb. 3), konnten von 240 Proben (51,4 %) vollständige oder nahezu vollständige Rotwild-Konsensus-Genotypen gebildet werden, die für die weitere Auswertung verwendbar waren.

Von den restlichen Proben wurden 91 eindeutig als Rehwild identifiziert und 4 Proben als Muffelwild. Bei weiteren 132 Proben konnte aufgrund schlechter DNA-Qualität kein Genotyp angesprochen werden, so dass sie ebenfalls nicht in die Auswertung eingingen.

Die 240 Konsensus-Genotypen lassen sich zu 130 verschiedenen Multilocus-Genotypen (MLGT) zuordnen. Der gleiche MLGT wurde zwei Proben dann zugewiesen, wenn sie an allen untersuchten Markern identische Allele aufwiesen oder wenn an nur einem Marker eine Abweichung auftrat, für die eine technische Ursache (Alleldropout, false allele oder fehlende Daten) wahrscheinlich ist. Wenn die MLGT zweier Proben zwar sehr ähnlich waren, sich aber mehr unterschieden als eben beschrieben, wurden sie mit der gleichen MLGT-Nr. bezeichnet, aber mit einem anderen Buchstaben kenntlich gemacht, und als verschiedene Individuen behandelt. In der Liste der Losungsfunde wurden alle Proben entweder als Ausfall oder mit einer MLGT-Bezeichnung versehen.

Bezogen auf die 130 MLGT wurden 73 Typen nur 1 x, 30 2x, 14 3x, 7 4x, 3 5x, einer 6x und zwei 7x gefunden. 38 Typen waren sicher männlich, 81 sicher weiblich und bei 11 MLGT, die je nur einmal vorkamen, konnte keine sichere Angabe zum Geschlecht gemacht werden. Die Verteilung der MLGT der Proben mit sicher bestimmtem Geschlecht ist aus Abb. ersichtlich.

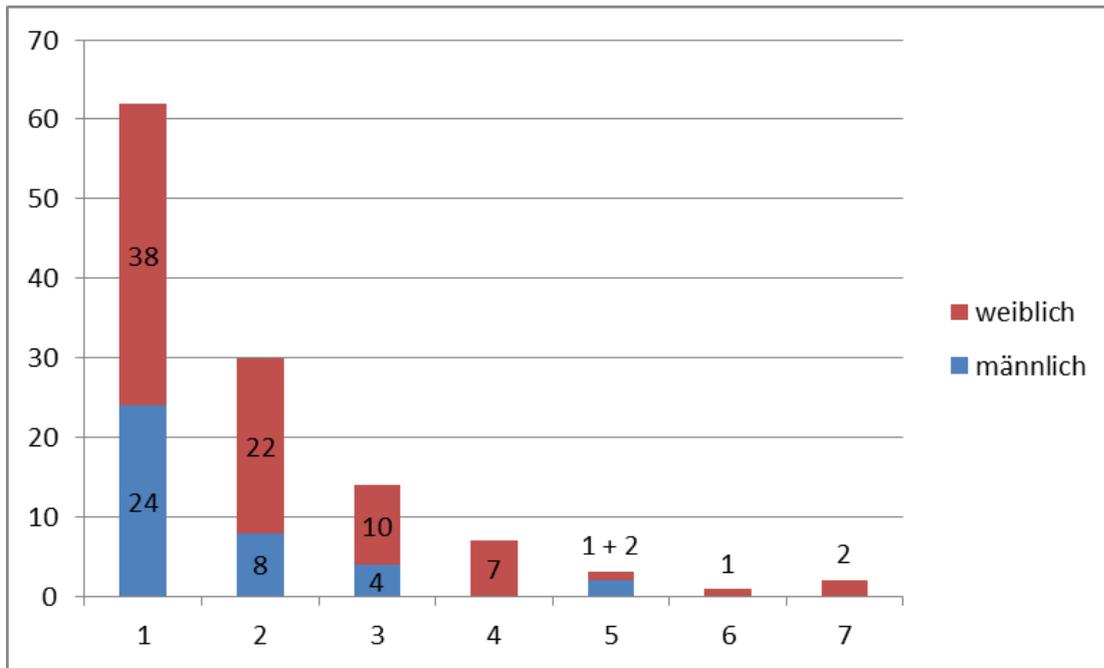


Abb. 7: Absolute Wiederholungszahlen der MLGT innerhalb der Stichprobe Herbst2016 getrennt nach Geschlecht

Für die Schätzung der Populationsgröße mit dem Programm *capwire* wurde die Anzahl der MLGT je Geschlecht zugrunde gelegt. Proben ohne eindeutige Geschlechtsbestimmung wurden ausgeschlossen, so dass die weibliche Stichprobe (w) aus 81 Individuen besteht und die männliche (m) aus 38. Die beiden idealisierten Modellansätze bezüglich der Beprobungswahrscheinlichkeit ergeben relativ unterschiedliche Schätzungen, beide mit relativ großen Unsicherheiten behaftet. Das sich daraus ergebende Geschlechterverhältnis ist in beiden Fällen mit 1:1,9 bzw. 1:1,7 ähnlich (Tab.), mit einem etwas geringeren Überhang an weiblichen Stücken als in der analysierten Stichprobe beobachtet.

Für die Testsammlung wurde ein Teil eines größeren Waldgebietes (UG Bärenfels) ausgewählt, er entspricht damit nicht der Modellannahme einer geschlossenen Population. Die Ergebnisse sind daher mit Vorsicht zu behandeln, und auf eine Dichteschätzung auf Basis dieser Daten wurde verzichtet.

Tab. 5: Test zur Populationsgrößenschätzung mit dem Programm *capwire* in zwei Modellen: ECM (Equal Capture Model): Jedes Individuum hat bei jeder Ziehung die gleiche Wahrscheinlichkeit, beprobt zu werden. TIRM (Two Innate Rates Model): Es gibt zwei Gruppen von Individuen mit verschiedenen Nachweiswahrscheinlichkeiten

Herbstsammlung	Anzahl modelliert				Geschlechterverhältnis	
	m	Konfidenzintervall 95 %	w	Konfidenzintervall 95 %	m	w
2016						
ECM	54	41-69	100	86-113	1	1.9
TIRM	76	62-118	126	116-172	1	1.7

Die Einteilung der Proben in Frischgrade spiegelte sich tendenziell im Anteil auswertbarer Rotwild-Proben wieder (Abb. 8), wobei die Proben, die anderen Arten zugeordnet wurden, nicht berücksichtigt sind.

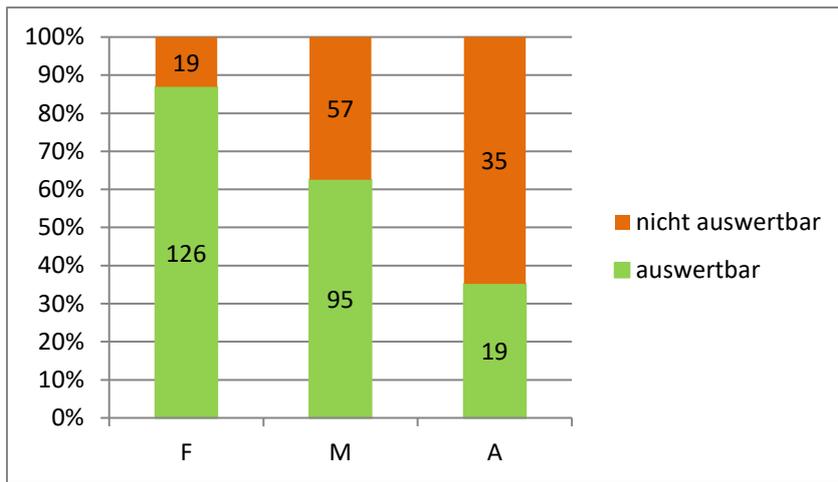


Abb. 8: Relativer Anteil auswertbarer Rotwildproben aus der Testsammlung im Herbst 2016 nach im Feld erfolgter okularer Schätzung des Frischegrades (F: frisch, M: mittel, A: alt). Die Datenbeschriftung zeigt die absoluten Probenzahlen.

5.2.2. Frühjahrssammlung 2017

Von den insgesamt 1.900 in die Untersuchung einbezogenen Proben konnten nach je zwei bis drei Analysendurchgängen nur 394 für die weitere Bearbeitung ausgewählt werden. Nach weiteren zwei bis vier Analysendurchgängen lagen nur 195 Konsensus-Genotypen vor. Die Ausbeute der ersten Sammlung im März betrug lediglich etwa 7 %, die der zweiten etwas mehr als 15 %. Dabei wurden die 91 Konsensus-Genotypen aus der Märzsammlung 89 MLGT zugeordnet, nur von zwei Individuen wurden je zwei Proben identifiziert. Die 110 Konsensus-Genotypen der zweiten Sammlung gehörten 100 MLGT an, von denen 6 zweimal und 2 dreimal auftraten.

Der geringe Anteil erfolgreich analysierter Proben führt dazu, dass die Daten nicht repräsentativ für das Untersuchungsgebiet sind. Das zeigt sich neben der absoluten Anzahl auch in äußerst geringen Wiederfinden von MLGT. Deshalb wurden innerhalb des Probenkollektivs aus der Frühjahrssammlung 2017 keine weiteren Auswertungen und keine Schätzung der Populationsgröße durchgeführt. Die vorhandenen Daten gingen in die Gesamtauswertung (Kapitel 5.5) ein.

5.3. Charakterisierung der Rotwildpopulation des Erzgebirges (Gewebe und Haare)

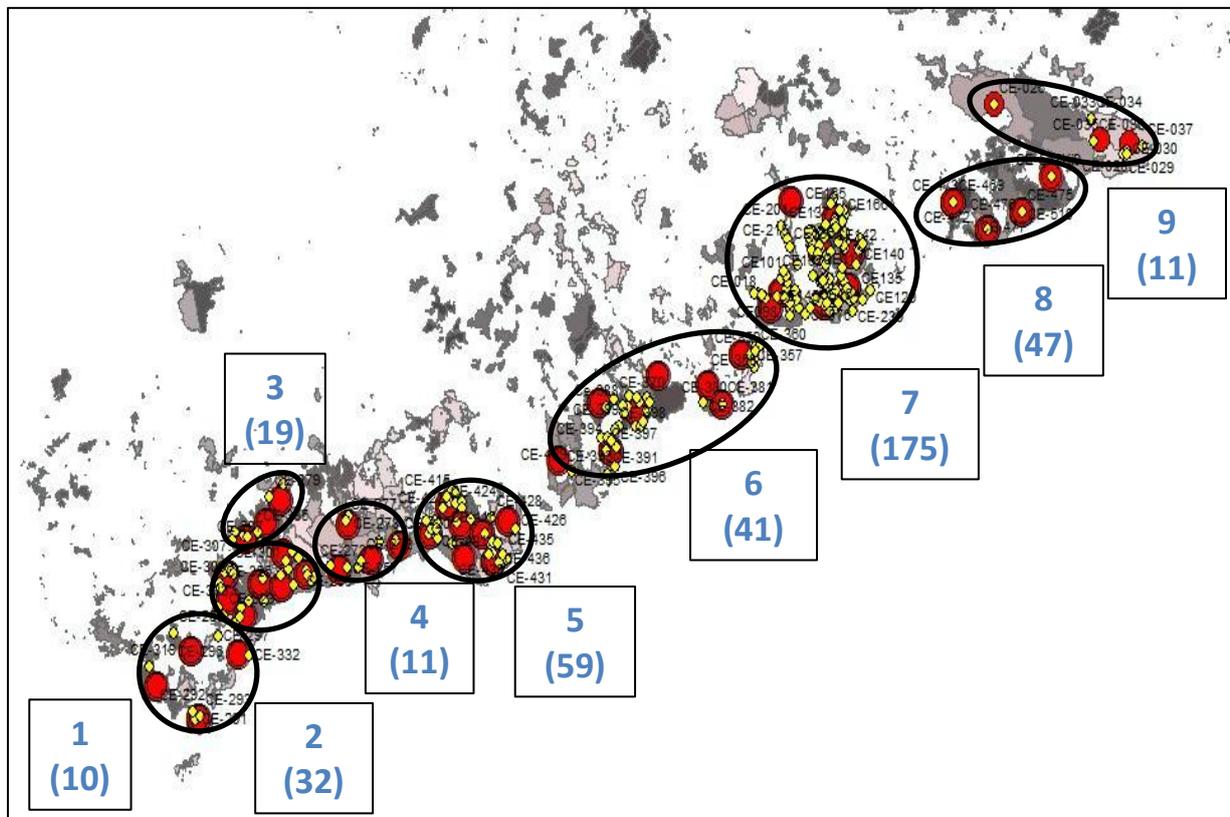


Abb. 9: Bildung potenzieller geografischer Kollektive (schwarze Ringe, in Klammern Individuenzahl) aus den Haar- und Gewebeprobe anhand ihrer Koordinaten (gelb: einzelne Ortsangaben, rot: revierbezogene Daten)

Tab. 6: Beschreibung der auf der Grundlage der Koordinaten gebildeten potentiellen geografischen Kollektive

Geografisches Kollektiv	Stichprobe	Bezeichnung
1	10	Forstbezirk Adorf, südlicher Teil
2	32	Forstbezirk Adorf, östlicher Teil
3	19	Forstbezirk Adorf und Eibenstock, nördlicher Bereich
4	11	Forstbezirk Eibenstock, südlicher Bereich
5	59	Forstbezirk Neudorf
6	41	Forstbezirk Marienberg
7	175	Forstbezirk Bärenfels
8	47	Forstbezirk Neustadt
9	11	Nationalpark Sächsische Schweiz

Die Zugehörigkeit zu genetischen Clustern wurde zunächst unabhängig vom Geschlecht für alle 405 Genotypen aus Haar- und Gewebeprobe simuliert. Die mit dem Programm STRUCTURE 2.3.4 unter der Annahme von K=1-10 Gruppen simulierte Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Genotypen wurde mit dem Programm STRUCTURE HARVESTER ausgewertet. Die mittlere logarithmische Wahrscheinlichkeit der

Einteilung in die jeweils vorgegebene Zahl von Clustern für $K=2, 3$ oder 4 Gruppen am höchsten (Abb. 4) und fällt bei einer höheren Anzahl deutlich ab. Dabei ist die Einteilung in den für jede Anzahl durchgeführten Simulationen für 2 und 3 Cluster sehr stabil und zeigt bei $K=4$ eine geringe Variation. Ab $K=5$ Gruppen steigt die Standardabweichung sehr stark an, d.h. die Zuordnung von Individuen in den Wiederholungen unterscheidet sich erheblich, so dass eine sichere Interpretation nicht mehr möglich ist. Die größte Änderung der Wahrscheinlichkeiten ΔK liegt bei $K=2$ vor und sinkt dann ab, bis sie ab $K=5$ nahe Null liegt. Daraus folgt, dass eine Einteilung in mehr als vier Gruppen nicht plausibel ist (Evanno *et al.* 2005).

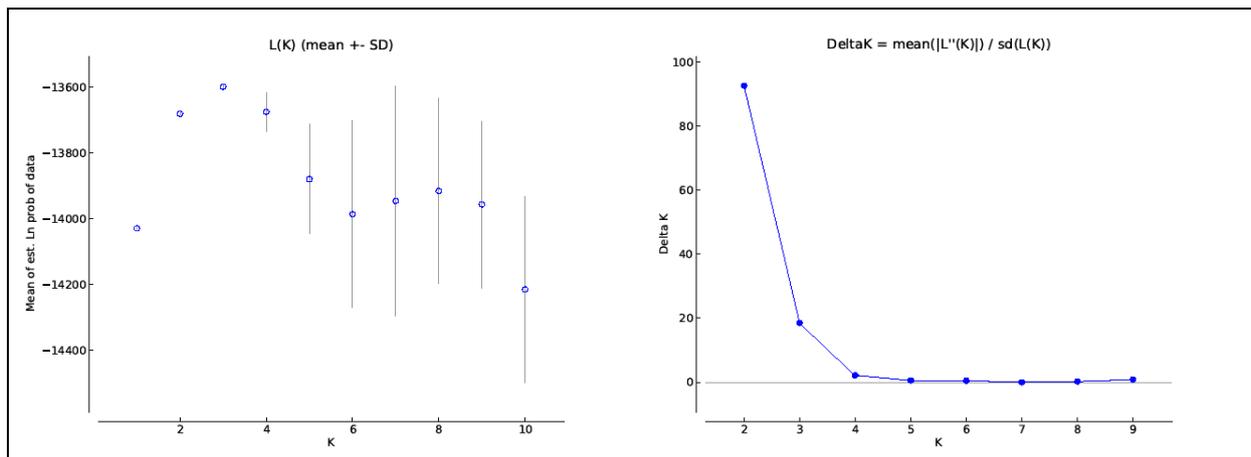


Abb. 4: links: mittlere geschätzte logarithmische Wahrscheinlichkeit, rechts: ΔK ($N=405, K=1-10$)

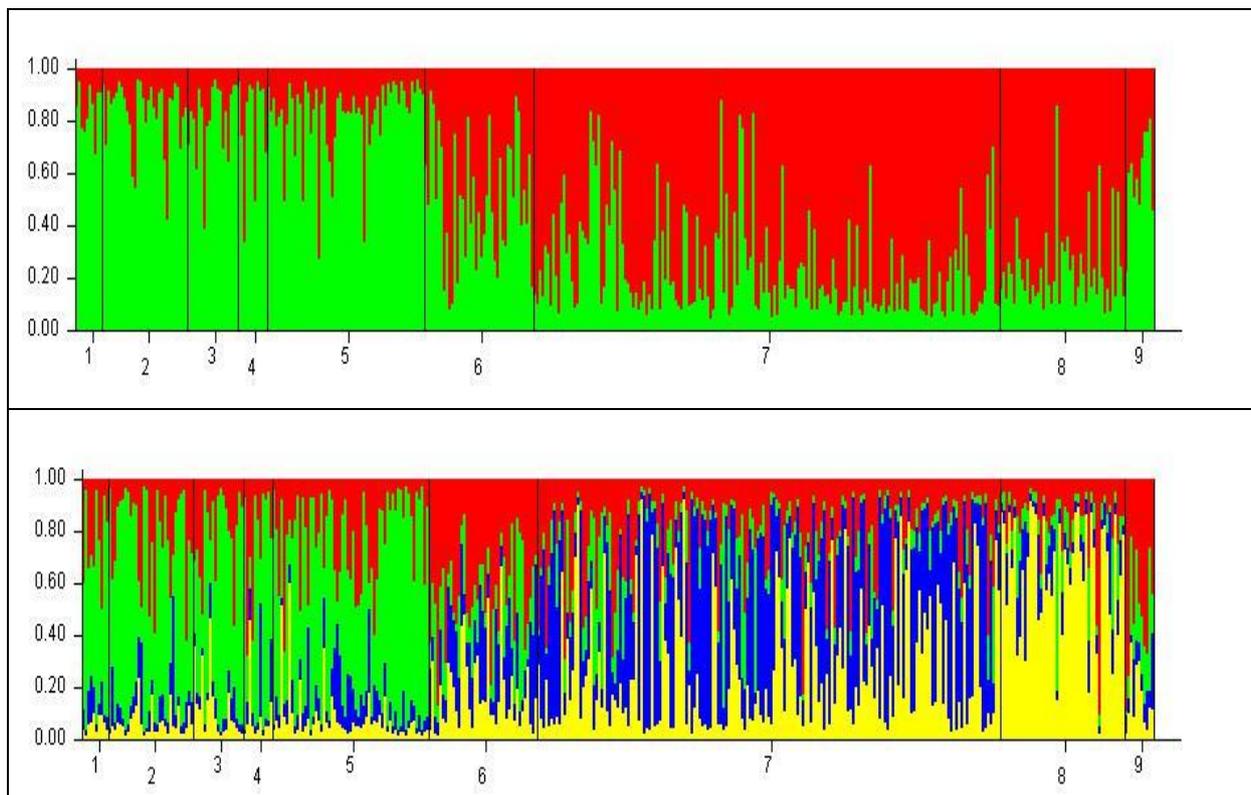


Abb. 5: Zuordnung der Genotypen aus neun geografisch definierten Kollektiven (dargestellt von West nach Ost) zu genetisch homogenen Gruppen (K) mit dem Programm STRUCTURE. oben: $K=2$, unten: $K=4$ über alle Proben ($N=405$)

Für alle getesteten $K > 1$ bilden die Proben aus den Forstbezirken Adorf, Eibenstock und Neudorf (Kollektive 1 bis 5) eine in sich geschlossene Population mit deutlicher Dominanz eines Clusters (hier Cluster Nr. 2 - grün), die sich von den anderen deutlich unterscheidet – unabhängig von der Anzahl vorgegebener Gruppen (K). Bei der Zuordnung über alle Proben (Abb. 5) zu mehr als 2 Gruppen zeigt sich eine Trennung des Kollektivs 8 aus dem Forstbezirk Neustadt mit einem dominierenden Cluster (hier Cluster Nr. 4 - gelb). Die Proben aus den Forstbezirken Bärenfels (Kollektiv 7) und Marienberg (Kollektiv 6) weisen ausgeglichene Anteile an allen vier Gruppen auf, wobei in Kollektiv 6 die Zugehörigkeit zu Cluster 1 (hier rot) größer ist und in Kollektiv 7 zu Cluster 3 (hier blau). In Kollektiv 9 (Nationalpark) dominiert im Mittel der Anteil an Cluster 1. In Tab. 7 sind die mittleren Anteile der Kollektive für $K=4$ Gruppen über alle Proben dargestellt. Die paarweisen Allelhäufigkeits-Abweichungen zwischen den Clustern (Tab.) reichen dabei von 1,7 % (zwischen den Clustern 1 und 3) bis 6,9 % (Cluster 2 und 4).

Tab. 7: Mittlere Anteile der vordefinierten geografischen Kollektive an den 4 Clustern über alle Proben

Geografisches Kollektiv	Durchschnittliche Clusterzugehörigkeit				Individuenzahl
	1	2	3	4	
1	0.238	0.622	0.078	0.062	10
2	0.207	0.64	0.085	0.069	32
3	0.205	0.613	0.056	0.125	19
4	0.233	0.575	0.099	0.092	11
5	0.214	0.608	0.093	0.084	59
6	0.425	0.192	0.2	0.183	41
7	0.213	0.096	0.411	0.279	175
8	0.155	0.096	0.111	0.638	47
9	0.517	0.218	0.109	0.156	11

Tab. 8: Paarweise Abweichungen der Allelhäufigkeiten zwischen den Clustern

Cluster	1	2	3	4
1	-	0.0309	0.017	0.027
2		-	0.0654	0.0686
3			-	0.0363
4				-

Aufgrund der überwiegenden Zuordnung der Kollektive 1 bis 5 zu einem Cluster wurden die Proben aus den Forstbezirken Adorf, Eibenstock und Neudorf für die populationsgenetische Auswertung als Teilpopulation Westerzgebirge (WERZ) zusammengefasst. Die Proben aus dem Nationalpark Sächsische Schweiz wurden aufgrund der geringen Stichprobengröße in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. Die Kollektive 6, 7 und 8 gingen unverändert in die Untersuchung mit dem Programm GenAEx ein.

An insgesamt 394 Proben wurden für die untersuchten 8 Mikrosatellitenmarker insgesamt 126 verschiedene Allele nachgewiesen, wobei die einzelnen Marker zwischen 6 und 26 Allele aufwiesen. 65 Allele kommen in allen Teilpopulationen, 26 Allele jeweils nur in einer der Teilpopulationen vor (private Allele).

Zunächst wurden die Teilpopulationen in zwei nach dem Geschlecht differenzierte Gruppen aufgeteilt, um festzustellen, ob mit den untersuchten Markern geschlechtsspezifische genetische Strukturen nachweisbar sind.

Zur Beschreibung der genetischen Variation zwischen den Teilpopulationen wurde der paarweise genetische Abstand nach Nei (1972) berechnet und mithilfe einer Hauptkomponentenanalyse grafisch dargestellt (Abb. 6). Die beiden Achsen erklären insgesamt ca. 85,6 % der Variation. Auch hier wird deutlich, dass die Populationen Westerzgebirge auf der einen und Neustadt auf der anderen Seite größere Abstände aufweisen als Marienberg und Bärenfels. Darüber hinaus zeigt die Darstellung, dass die geschlechtsspezifischen Gruppen aus ein- und demselben Untersuchungsgebiet sich mit zunehmender Stichprobenzahl immer ähnlicher werden. Bei dem Kollektiv Bärenfels mit 90 bzw. 85 Proben beträgt der Abstand zwischen der männlichen und der weiblichen Gruppe weniger als drei Prozent. Daraus ist zu schließen, dass es bei den untersuchten Mikrosatelliten-Markern keine geschlechtsspezifischen Unterschiede gibt. Die festgestellten Abweichungen zwischen den Teilpopulationen kommen durch geringe Stichprobenumfänge zustande. Für die weitere Auswertung werden daher die Populationen jeweils mit der gesamten Stichprobe aus beiden Geschlechtern betrachtet.

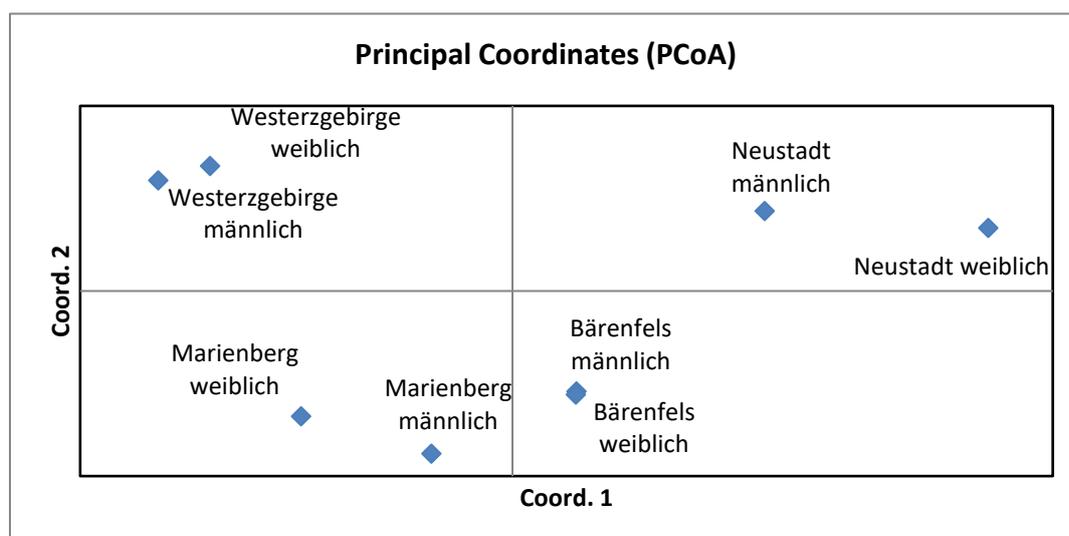


Abb. 6: Hauptkomponentenanalyse basierend auf den paarweisen genetischen Abständen nach Nei (1972)

Die genetische Vielfalt in den einzelnen Populationen ist in Tab. dargestellt.

Tab. 9: Genetische Vielfalt innerhalb der Populationen (N: Stichprobe, Na: durchschnittliche Anzahl der Allele pro Marker, Ne: effektive Anzahl der Allele, SE: Standardabweichung)

Population	N	Na	SE	Ne	SE
Westerzgebirge	131	12.8	1.5	6.3	0.7
Marienberg	41	10.9	1.0	6.5	0.5
Bärenfels	175	13.0	1.8	6.4	0.4
Neustadt	47	10.1	1.1	5.6	0.7

Die durchschnittliche Anzahl der Allele pro Marker ist von der Stichprobengröße abhängig, da die Wahrscheinlichkeit, seltene Allele zu erfassen umso größer ist, je mehr Individuen untersucht werden. Der Parameter effektive Anzahl der Allele ist ein Maß für die Diversität, da er neben der absoluten Anzahl auch deren relative Häufigkeit berücksichtigt. Die Kollektive aus dem Westerzgebirge und den Forstbezirken Marienberg und Bärenfels weisen etwa vergleichbare genetische Diversität auf. Die genetische Diversität des Kollektivs Neustadt ist geringer.

Die Heterozygotie ist ein Maß für die individuelle genetische Vielfalt. Die Werte sind in allen Populationen etwa vergleichbar. Die höchste Heterozygotie weist das Kollektiv Marienberg auf, das mit einem Fixierungsindex von 0,3 % dem genetischen Gleichgewicht am nächsten kommt. Alle anderen Populationen weisen einen leichten Homozygoten-Überschuss auf. Die im Verhältnis hohe Standardabweichung für den Fixierungsindex zeigt, dass vor allem bei den Populationen Marienberg und Neustadt die Stichproben zu klein sind, um sichere Aussagen zu machen (Tab. 5).

Tab. 5: Beobachtete (Ho), erwartete (He) Heterozygotie sowie Fixierungsindex (F) in den Populationen

Population	N	Ho	SE	He	SE	F	SE
Westerzgebirge	131	0.779	0.034	0.824	0.020	0.058	0.025
Marienberg	41	0.838	0.035	0.841	0.011	0.003	0.040
Bärenfels	175	0.804	0.012	0.839	0.010	0.041	0.018
Neustadt	47	0.766	0.038	0.793	0.034	0.033	0.033

Die Gruppierung der Populationen in der STRUCTURE-Analyse bzw. in der Hauptkomponentenanalyse der genetischen Abstände basieren auf der Verteilung der Allele bzw. Genotypen der Marker über die Populationen (Anlage 3). Um einzuschätzen, ob es sich bei den ermittelten Clustern um isolierte Populationen handeln könnte, wurden die Häufigkeiten der einzelnen Allele näher untersucht. In Abb. 7 sind beispielhaft einige Allele mit großen Häufigkeitsunterschieden zwischen den Populationen dargestellt.

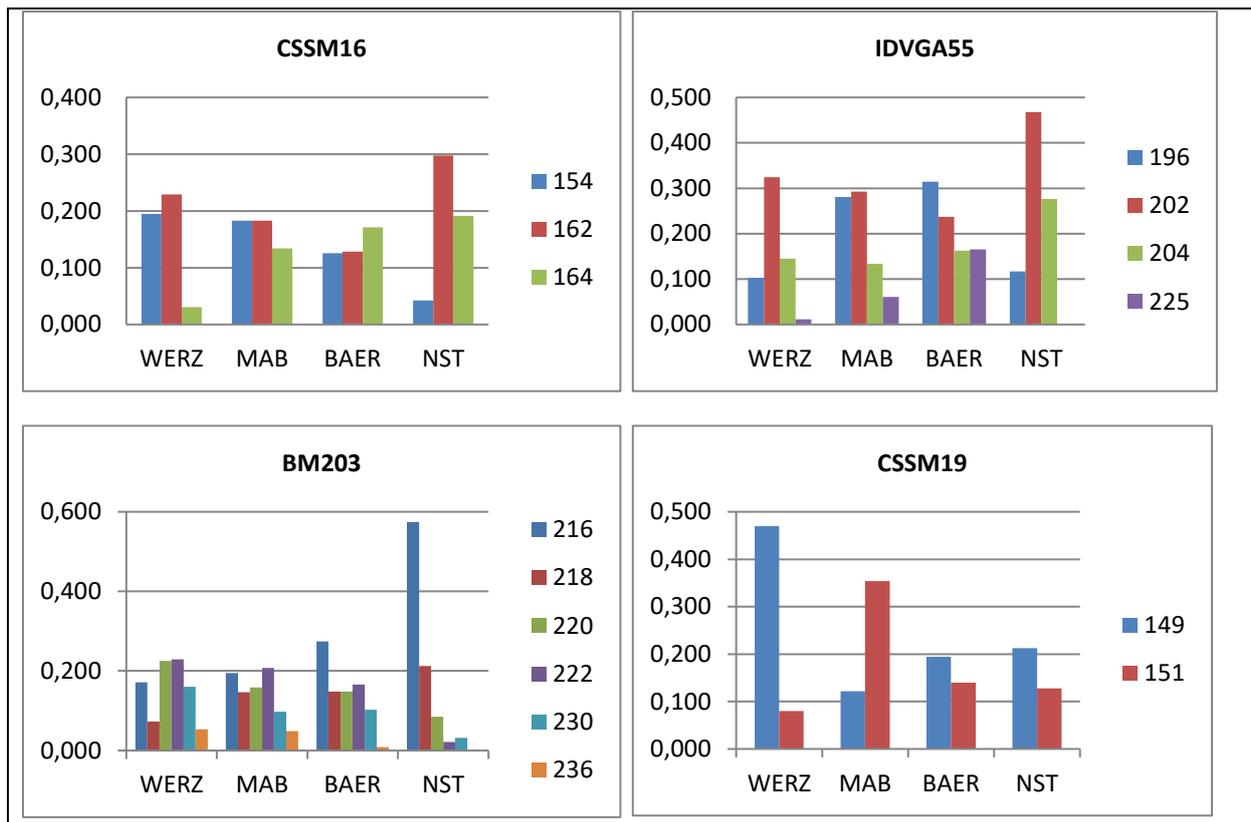


Abb. 7: Beispiele für Allele mit großen Häufigkeitsunterschieden zwischen den Populationen

Es gibt viele Beispiele für Allele, bei denen sich die Häufigkeiten in Teilen des Untersuchungsgebietes kontinuierlich verändern, und in bestimmten Populationen aber sprunghaft abweichen oder ganz fehlen, wie z. B. das Allel 162 am Marker CSSM16, die Allele 196, 202 und 225 am Marker IDVGA55 oder die Allele 149 und 151 am Marker CSSM19. Die Populationen Westerzgebirge und Neustadt sind von solchen sprunghaften Verschiebungen in besonderem Maße betroffen.

An fast allen Markern treten aber auch Allele auf, deren Häufigkeiten sich von West nach Ost kontinuierlich und zum Teil stark erhöhen oder verringern. Beispiele für eine solche klinale Variation sind die Allele 154 und 164 am Marker CSSM16 oder die Allele 216 und 220 am Marker BM203.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Strukturierung der Teilpopulationen nicht auf Isolation beruht und Genfluss entlang des gesamten Erzgebirges in unterschiedlichem Maße stattfindet.

5.4. Familienstrukturen

5.4.1. Besenderte Tiere

Die Genotypen der untersuchten Individuen wurden zunächst dafür genutzt, Vermutungen zur Verwandtschaft zwischen besenderten Tieren zu erhärten oder auszuschließen (Anlage 4). Dabei handelte es sich erster Linie um die Überprüfung der Mutter-Kind-Beziehungen zwischen den Kälbern und ihren potentiellen Müttern, da diese Verwandtschaft eine wesentliche Grundannahme für die Auswertung der Telemetriedaten bildet. In den Untersuchungsgebieten Bärenfels und Neudorf konnte dabei jeweils ein Alttier-Kalb-Paar bestätigt werden. Im Untersuchungsgebiet Eibenstock traf das für zwei Paare zu, und zu einem weiteren Alttier (T08) wurden zwei Kälber aus verschiedenen Jahren bestätigt.

Darüber hinaus wurden Paare von Individuen auf die Möglichkeit einer Mutter-Kind-Beziehung geprüft, die aus einer aneinander orientierten oder sehr ähnlichen Raumnutzung der betreffenden Tiere abgeleitet wurden (siehe Bericht AG Wildtierforschung). Dabei wurde in drei der Untersuchungsgebiete je eine Paarung gefunden, bei der die individuellen Genotypen die Vermutung der Elternschaft untermauern, da an jedem untersuchten Marker mindestens ein gemeinsames Allel auftrat. Beispielsweise legt das Ergebnis nahe, dass im Untersuchungsgebiet Eibenstock das Alttier T05 die Mutter von T08 ist, und somit vier Individuen aus drei Generationen einer Familie besendert wurden. Insgesamt wurden über alle Untersuchungsgebiete zwölf solcher Familien-Hypothesen eindeutig widerlegt (Anlage 4). Die genetischen Untersuchungen legen nahe, dass eine vergleichbare Raumnutzung in Form tradierter Wanderrouten, eines zeitweisen Zusammenlebens oder eines unregelmäßigen Sich-Treffens bestimmter Individuen zum Teil auf Verwandtschaftsbeziehungen zurückgeführt werden kann, es dieser engen Verwandtschaft bei der stark sozial lebenden Wildart Rothirsch aber häufig nicht bedarf.

Die Ergebnisse der Haar-Analysen gingen in die vergleichende Auswertung aller Proben (Kapitel 5.5.) mit ein.

5.4.2. Elternschaftsanalyse mit dem Programm CERVUS

Da die Analyse die einzelnen Genotypen betrachtet, wurde sie mit allen 405 Proben durchgeführt. Den Nachkommen wurden davon 351 Genotypen zugeordnet. Als Kandidaten-Mütter wurden 170 Genotypen definiert, als Kandidaten-Väter 160 Genotypen. Die Analyse der Allelhäufigkeiten (Tab. 6) ergab, dass sechs der untersuchten Marker nicht signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abweichen. Der Marker BMC1009 weicht auf 5 %-Signifikanzniveau, der Marker CSSM19 aber hochsignifikant ab. Aufgrund der hohen potentiellen Nullallel - Belastung von fast 11 % empfiehlt das Programm, diesen Marker aus den Elternschaftsanalysen auszuschließen. Da die beobachtete Heterozygotie bei fast 70 % liegt, wurde er trotzdem mit einbezogen, um den hohen Polymorphie-Grad zu nutzen.

Die mittlere Wahrscheinlichkeit, dass zwei nicht verwandte Individuen sich anhand der Daten nicht unterscheiden, liegt an den einzelnen Markern (NE-I) zwischen 0,017 und 0,063, für den Multilocus-Genotyp bei $2,77^{-12}$. Wenn die beiden Individuen Vollgeschwister sind, ist diese Wahrscheinlichkeit

zwar für den einzelnen Marker mit 0,303 bis 0,361 viel höher, für den MLGT beträgt sie dennoch nur 0,000151.

Bei den Elternschaftsanalysen ist die Nicht-Ausschluss-Wahrscheinlichkeit am höchsten für den Fall, dass der andere Elter nicht bekannt ist. Für die einzelnen Marker liegt sie im Mittel zwischen 0,328 und 0,555, über alle Marker kombiniert bei 0,001474.

Eine Eltern-Kind-Beziehung setzt voraus, dass beide Individuen an jedem untersuchten Marker mindestens ein gemeinsames Allel aufweisen. Da jedoch im Einzelfall eine technisch bedingte Abweichung nicht auszuschließen ist, wurden für die Mutterschaftsanalyse bis zu 2 „mismatches“ zugelassen, d.h. ein oder zwei Genorte, an denen kein gemeinsames Allel gefunden wurde. Von 1627 durchgeführten Tests, die diese Bedingung erfüllten, wurde in 337 Fällen für je einen Nachkommen eine wahrscheinlichste Mutter gefunden, was in 10 Paarungen mit mindestens 80%iger Sicherheit zutraf. In drei dieser Fälle betrug die Sicherheit sogar über 95 %. In 327 Fällen lag die Sicherheit, dass es sich tatsächlich um die wahrscheinlichste Mutter handelt, unter 80 %. In weiteren 1290 Fällen wurde Nachkommen eine potentielle Mutter zugeordnet, bei denen es sich aber nicht um die wahrscheinlichste Mutter handelt.

Tab. 6: Analyse der Allelhäufigkeiten für die einzelnen Marker mit dem Programm CERVUS. k: Anzahl der Allele, N: Anzahl der Proben, PIC: Polymorphie-Informationsgehalt, H_o : beobachtete Heterozygotie, H_e : erwartete Heterozygotie, Nichtausschlusswahrscheinlichkeiten NE-1P: für den ersten Elter, NE-2P: für den 2. Elter, NE-PP: für das Elternpaar, NE-I: Wahrscheinlichkeit, dass zwei nicht verwandte, zufällig gezogene Individuen den gleichen Genotyp tragen, NE-SI: Wahrscheinlichkeit, dass das passiert, wenn beide Vollgeschwister sind, HW: Abweichung der Allelverteilung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, F(Null): geschätzte Nullallelwahrscheinlichkeit

Locus	k	N	H_o	H_e	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F(Null)
CSSM16	6	405	0,775	0,81	0,783	0,555	0,378	0,198	0,063	0,361	NS	0,0225
IDVGA55	13	405	0,773	0,817	0,793	0,529	0,355	0,173	0,057	0,356	NS	0,0249
BMC1009	16	405	0,835	0,866	0,851	0,424	0,267	0,105	0,032	0,326	*	0,0181
CSSM19	11	405	0,684	0,847	0,83	0,465	0,3	0,129	0,04	0,337	***	0,1098
HAUT14	15	405	0,805	0,854	0,837	0,452	0,29	0,122	0,038	0,333	NS	0,0289
TGLA53	20	404	0,814	0,895	0,884	0,352	0,213	0,071	0,02	0,308	NS	0,0467
BM203	22	405	0,773	0,838	0,818	0,488	0,32	0,146	0,046	0,343	NS	0,0414
CSRM60	26	405	0,869	0,903	0,894	0,328	0,196	0,06	0,017	0,303	NS	0,0189

Die Liste der paarweisen Zuordnungen Nachkomme / wahrscheinlichste Mutter wurde manuell auf Plausibilität kontrolliert. Von Datensätzen mit reziproken Paarungen (nicht eindeutig, wer Nachkomme und wer Mutter ist) wurde jeweils einer entfernt (7 Fälle). Relativ häufig erschienen Datensätze als biologisch nicht plausibel (90 Fälle), z.B. wenn der Nachkomme älter war als die zugeordnete wahrscheinlichste Mutter, oder beide aus dem gleichen Jagdjahr mit Altersklasse 1 erfasst waren, oder das Alttier schon erlegt worden war, bevor die Geburt des zugeordneten Nachkommen stattfand. Wenn die Erlegungsorte beider Tiere nicht im gleichen oder in den zwei benachbarten Forstbezirken liegen (weitere 43 Fälle), wurde die Plausibilität ebenfalls angezweifelt.

Danach blieben 69 Paare, bei denen es zwischen den Nachkommen und ihren jeweils wahrscheinlichsten Müttern an allen Markern mindestens eine Übereinstimmung gab und weitere 96 mit einem Mismatch. Allerdings lag die Sicherheit nur bei sechs dieser Paare über 80 %, bei weiteren zwei über 95 %.

Um die Aussagekraft dieser Ergebnisse zu evaluieren, wurden die sechs bekannten Mutter-Kind-Paare der Sender-Tiere näher betrachtet. In fünf Paaren wird die wahre Mutter als wahrscheinlichste Mutter erkannt, allerdings nur in einem Fall mit höchster Sicherheit (*). In einem Fall wird die bekannte Mutter zwar als mögliche, aber nicht als wahrscheinlichste Mutter ausgewiesen, obwohl sie an allen Markern passt (Tab. 7).

Tab. 7: Ergebnis der Mutterschaftsanalyse für die besenderten Kälber, ohne die bekannten Mütter vorzugeben. **Fett schwarz:** Die bekannte Mutter aus der Besenderung wurde vom Programm CERVUS als wahrscheinlichste Mutter ausgewiesen. **Fett rot:** Ein anderes Tier wurde als wahrscheinlichste Mutter ausgewiesen, obwohl es an einem Marker nicht passt.

Offspring ID	Loci typed	First parent non-exclusion probability	Second parent non-exclusion probability	Candidate mother ID	Loci typed	Pair loci compared	Pair loci mis-matching	Pair LOD score	Pair Delta	Pair confidence
HA-H91	8	1.03E-04	1.03E-04	HA-T04	8	8	0	1.51E+01	1.51E+01	*
HA-H92	8	3.70E-04	3.70E-04	HA-T08	8	8	0	8.52E+00	4.77E+00	-
HA-H92	8	3.70E-04	3.70E-04	HA-T05	8	8	1	3.74E+00	0.00E+00	
HA-H92	8	3.70E-04	3.70E-04	CE-456	8	8	1	3.11E+00	0.00E+00	
HA-H96	8	5.92E-04	5.92E-04	HA-T08	8	8	0	6.80E+00	3.38E+00	-
HA-H96	8	5.92E-04	5.92E-04	CE-404	8	8	1	3.42E+00	0.00E+00	
HA-H98	8	2.26E-04	2.26E-04	HA-T13	8	8	0	8.42E+00	4.29E+00	-
HA-H98	8	2.26E-04	2.26E-04	HA-T10	8	8	1	4.13E+00	0.00E+00	
HA-T95	8	5.47E-04	5.47E-04	CE-384	8	8	1	5.16E+00	1.13E+00	-
HA-T95	8	5.47E-04	5.47E-04	HA-T12	8	8	0	4.04E+00	0.00E+00	
HA-T93	8	6.83E-04	6.83E-04	HA-T03	8	8	0	7.19E+00	4.31E+00	-
HA-T93	8	6.83E-04	6.83E-04	CE-495	8	8	1	2.88E+00	0.00E+00	
HA-T93	8	6.83E-04	6.83E-04	CE-299	8	8	1	2.35E+00	0.00E+00	
HA-T93	8	6.83E-04	6.83E-04	CE-384	8	8	1	2.14E+00	0.00E+00	

In einer Fallstudie wurden dann 16 potentielle Paare untersucht, bei denen jeweils ein Alttier und ein Kalb oder Jungtier im Wildursprungsschein mit dem identischen Erlegungsort am gleichen Datum eingetragen waren (Anlage 5). In über der Hälfte der Fälle (9) ist das Alttier die wahrscheinlichste Mutter, davon in 3 Fällen mit mindestens 80 % Sicherheit. In einem weiteren Fall (CE-356) wird als wahrscheinlichste Mutter ein Alttier errechnet, das bereits 2015/16 erlegt wurde und daher aus logischen Gründen ausscheidet. An zweiter Stelle steht das Alttier CE-355, das somit die logisch wahrscheinlichste Mutter ist. In zwei weiteren Fällen (CE-389/CE-390 und CE-273/CE-272) ist das Alttier ebenfalls nicht als die wahrscheinlichste, aber als mögliche Mutter des Nachkommen errechnet. Da in beiden Fällen nicht mehr Mismatches auftreten, ist auch hier zu vermuten, dass es sich um Mutter-Kind-Paare handelt. Ein Fall weist zwei Mismatches auf, in denen technische Ursachen (Alleldropout) möglich wären, so dass hier keine eindeutige Aussage getroffen werden kann. In drei

Fällen kann nahezu ausgeschlossen werden, dass es sich um Mutter-Kind-Paare handelt, da an mehreren Genorten keine Übereinstimmung auftritt. Insgesamt ist es daher in 12 von 16 Fällen relativ sicher, dass es sich bei den am gleichen Tag und Ort erlegten Tieren um Mutter-Kind-Paare handelt, bei drei Kombinationen ist dies auszuschließen.

Aufgrund der hohen Unsicherheit in den Ergebnissen in der Mutterschaftsanalyse wurde auf eine Vaterschaftsanalyse mit allen Proben verzichtet. Für 22 aus den bisherigen Ergebnissen ermittelte Nachkommen mit bekannter Mutter wurde aber eine Vaterschaftsanalyse durchgeführt. In 5 Fällen ermittelte CERVUS einen wahrscheinlichsten Vater mit geringer Sicherheit (unter 80 %), wobei es aber in allen Fällen ein bis zwei Mismatches gab. Drei dieser Fälle wurden als unlogisch ausgeschlossen, so dass nur folgende Nachkomme-Mutter-Vater-Kombinationen mit relativ geringer Wahrscheinlichkeit angenommen werden können:

HA-T92 - HA-T08 – CE-301 (FoB Adorf, Rev. Muldenberg, AK2, JJ 2018/19) und

HA-T96 - HA-T08 – CE-116 (FoB Bärenfels, Rev. Schellerhau, AK4, JJ 2018/19).

5.5. Abgleich zwischen den Stichproben aus dem Untersuchungsgebiet Bärenfels

Aus dem Untersuchungsgebiet Bärenfels lagen relativ umfangreiche Stichproben verschiedener Probenmaterialien vor. Die Aussagekraft der verwendeten Mikrosatellitenmarker wurde mithilfe der Identitätswahrscheinlichkeit innerhalb der Stichproben für die einzelnen Marker und deren Kombination geschätzt (Abb. 8). Für zwei zufällig aus der Stichprobe gezogene Individuen, die nicht miteinander verwandt sind, geht demnach bereits bei mehr als zwei untersuchten Markern die Wahrscheinlichkeit (PI) gegen Null, dass beide den gleichen Genotyp aufweisen. Unter der Annahme, dass es sich bei den beiden Individuen um Vollgeschwister handelt (Plsibs), sind mindestens fünf Marker erforderlich, um sie sicher zu unterscheiden.

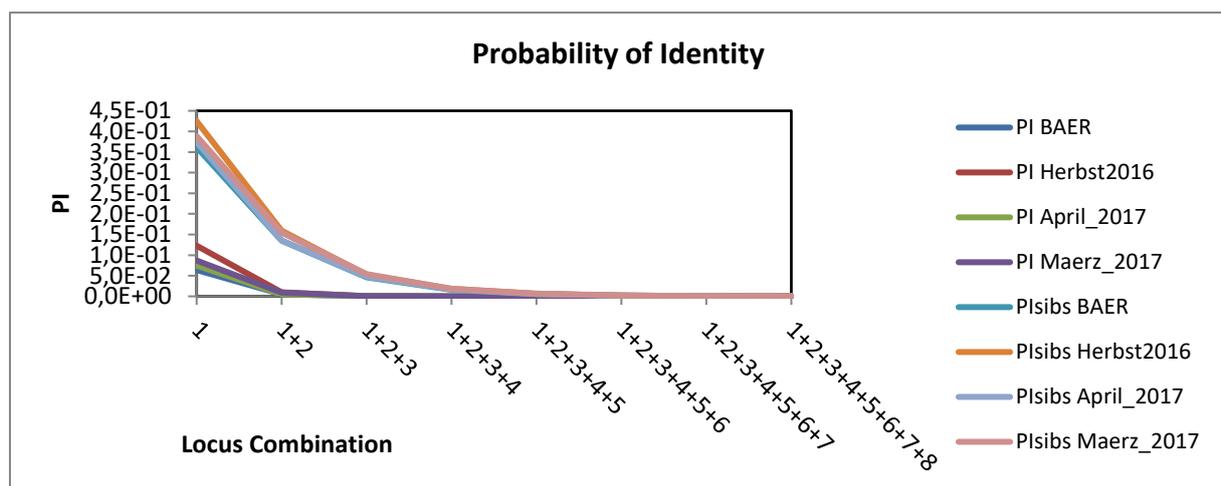


Abb. 8: Geschätzte Wahrscheinlichkeit, dass zwei nicht verwandte Individuen (PI) bzw. zwei Vollgeschwister (Plsibs) aus der Stichprobe bei einer zunehmenden Anzahl berücksichtigter Genmarker den gleichen Genotyp aufweisen.

Die Annahme, dass es sich um Proben von ein- und demselben Individuum handelt, wenn der Multilocus-Genotyp an allen acht untersuchten Markern übereinstimmt, ist daher berechtigt. Bei Abweichungen an ein oder zwei Markern, die durch das Nicht-Erkennen des zweiten Allels entstanden

sein können, ist es relativ wahrscheinlich, dass es sich um den gleichen Genotyp handelt. Wenn aber für zwei Proben an einem Marker mehr als zwei unterschiedliche Allele gefunden wurden, handelt es sich definitiv nicht um das gleiche Individuum.

Unter Anwendung dieser Voraussetzungen wurden Wiederfunde innerhalb jeder Losungs-Stichprobe sowie auch zwischen den Stichproben aus dem Untersuchungsgebiet Bärenfels erfasst. Als Beispiel kann der Hirsch H33 („Hansi“) dienen, der am 01.03.2017 im UG Bärenfels besendert wurde und sich, bis er am 03.09.2018 erlegt wurde, in einem relativ eng begrenzten Gebiet aufgehalten hat. Bereits in der Kotsammlung im Herbst 2016 war eine Losungsprobe von H33 enthalten sowie je eine weitere in den Stichproben aus den Sammlungen im März und im April 2017 (Abb. 9).

Insgesamt wurde 595 Proben ein Genotyp zugewiesen. Davon traten 341 Genotypen nur einmal auf, 87 wurden mehrfach gefunden. Eine Übersicht über die Verteilung auf die Stichproben gibt Tabelle 13. Da manche Genotypen innerhalb einer Stichprobe (bis zu sieben Mal) und /oder in mehreren Stichproben vorkamen, ist die Summe der Angaben mehrfach vorkommender MLGT in der Tabelle höher. Das Verhältnis zwischen einfach und mehrfach vorkommenden Genotypen unterscheidet sich bei den Kot-Stichproben sehr stark. In der Stichprobe aus dem Herbst 2016 liegt es bei 1:1, aus dem März 2017 bei ca. 4,9:1 und aus dem April 2017 bei etwa 3,1:1. Auch das ist ein Beleg für die mangelnde Repräsentanz der Stichproben aus dem Frühjahr 2017 und möglicherweise ein Hinweis auf eine höhere Fehlerrate bei der Genotypisierung. Damit sind sie für eine Populationsgrößenschätzung ungeeignet. Die Sammlung aus dem Herbst 2016 erfolgte nur in einem Teil des Untersuchungsgebietes, so dass auch sie nicht repräsentativ für das Untersuchungsgebiet ist.

Tab. 8: Wiederfunde von Multilocus-Genotypen (MLGT) innerhalb und zwischen den Stichproben aus dem Untersuchungsgebiet Bärenfels

Stichprobe		N erfolgreich analysierte Proben	N MLGT einmal	N MLGT mehrfach	Wiederfund von MLGT in Stichprobe:				
					Herbst 2016	März 2017	April 2017	Gewebe	Haare
Kot	Herbst 2016	240	66	66	57	7	9	12	3
	März 2017	91	73	15		2	4	6	2
	April 2017	111	75	24			11	8	2
Gewebe		139	117	22					1
Haare		14	10	4					

In den anderen Gewebe- bzw. Haar-Stichproben von außerhalb des Untersuchungsgebietes Bärenfels gab es keine Wiederfunde aus den Losungsproben.

Aus den Wiederfunden zwischen den Stichproben lassen sich Beobachtungen zum Verhalten verschiedener Tiere belegen. Der besenderte Hirsch H33 „Hansi“ wurde beispielsweise in jeder Losungssammlung einmal erfasst. Aus den Telemetriedaten bestätigt sich, dass er sich in der gesamten Zeit zwischen seiner Besenderung im März 2017 und der Erlegung im September 2018 in einem relativ engen Aktionsraum aufgehalten hat (Abb. 15).

Die Betrachtung aller mehrfach gefundenen Multilocus-Genotypen zeigt, dass manche Individuen deutlich größere Entfernungen zurücklegen (Abb. 17), wobei die großräumigeren Bewegungen hauptsächlich in Nord-Süd-Richtung bzw. zwischen höheren und tieferen Berglagen verlaufen (Abb.16). Die Verteilung der weiter entfernten, zu unterschiedlichen Zeitpunkten entstandenen genetischen Nachweise untermauert damit die durch die Telemetriestudie festgestellten Wanderungen zwischen den saisonalen Streifgebieten. Mehrfachnachweise (insbesondere bei den Kotsammlungen) erfolgten jedoch sehr häufig in geringer Distanz zueinander – dies belegt die Raumtreue innerhalb der saisonalen Streifgebiete (Abb. 18). In der Zusammenfassung sind die Nachweisabstände bei den männlichen Tieren etwas größer als bei den weiblichen.

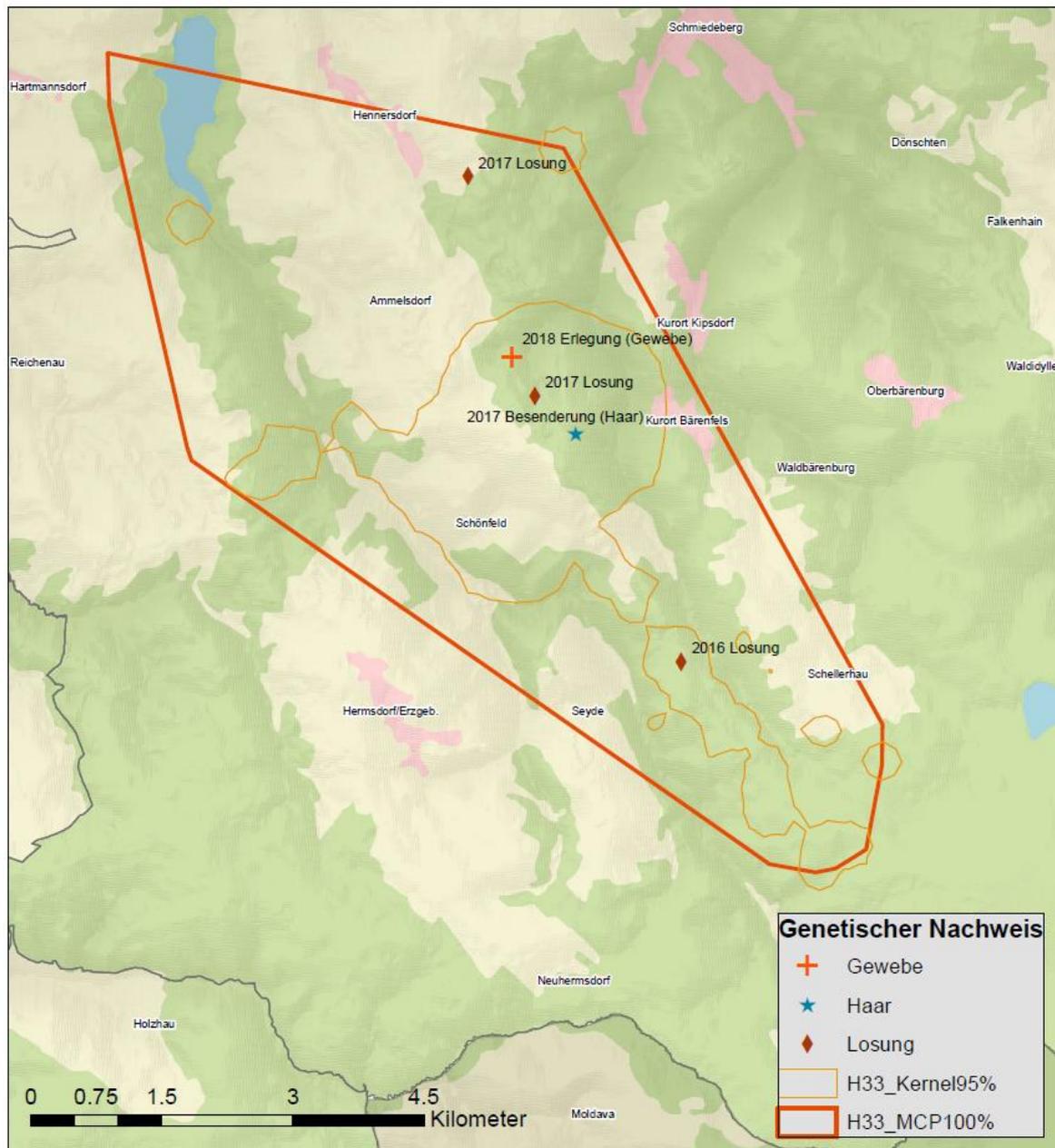


Abb. 9: Raumnutzung (Gesamtaktionsraum MCP 100 % und Kernstreifgebiet Kernel 95 %) des besenderten Hirsches H33 („Hansi“) im UG Bärenfels im Zeitraum vom 1.3.2017 bis 3.9.2018 und genetische Nachweise (Losungssammlungen 2016, 2017, Gewebeprobe Besenderung, Erlegung)

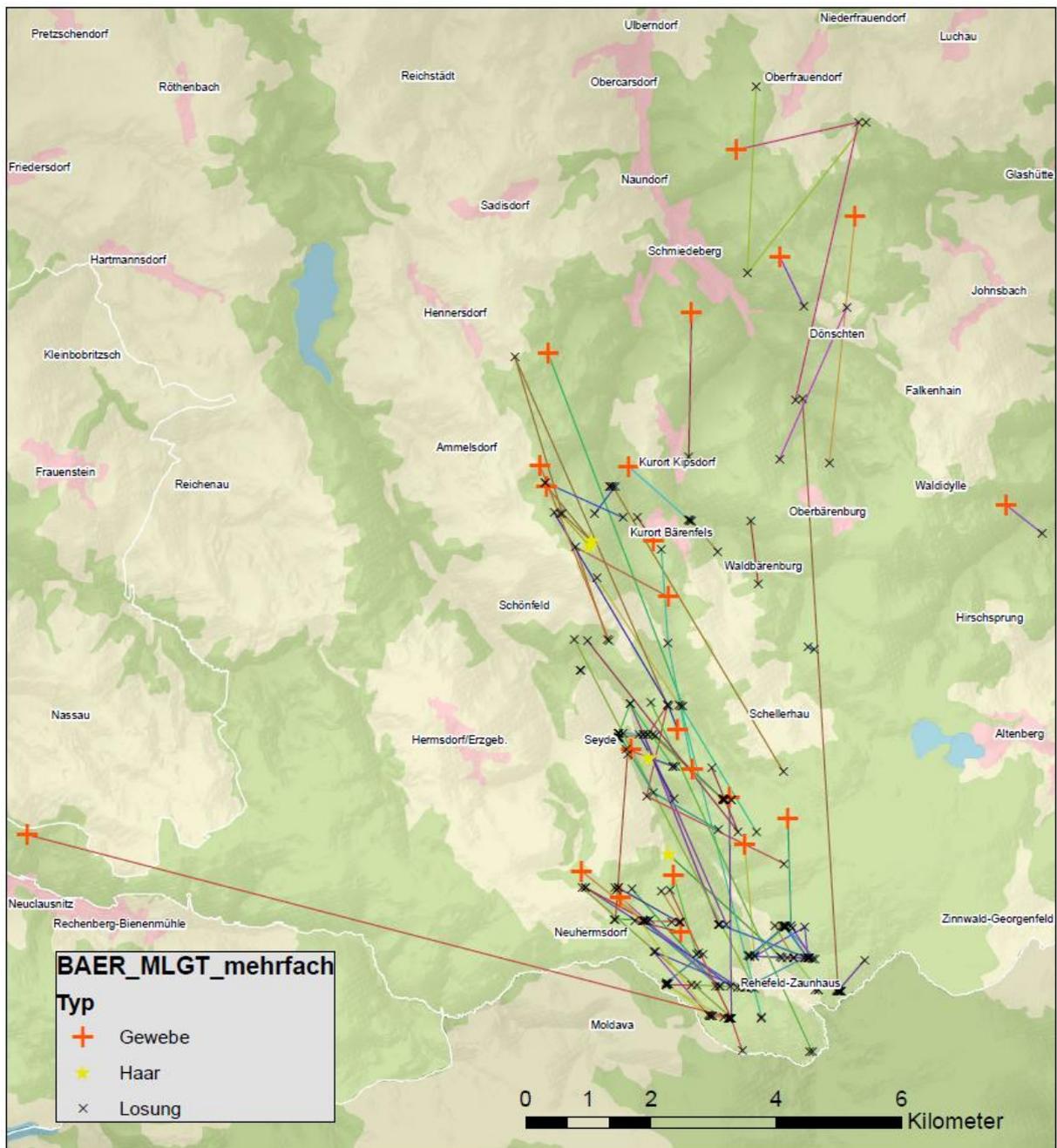


Abb. 10: Genetische Nachweise von individuellen Multilocus-Genotypen (MLGT) von Rothirschen aus mehreren Quellen (Haarprobe Besenderung, Kotprobe aus Sammlung 2016 und 2017, Gewebeproben aus Erlegung) im UG Bärenfels. Die individuell gefärbten Linien verbinden die Nachweise eines spezifischen MLGT.

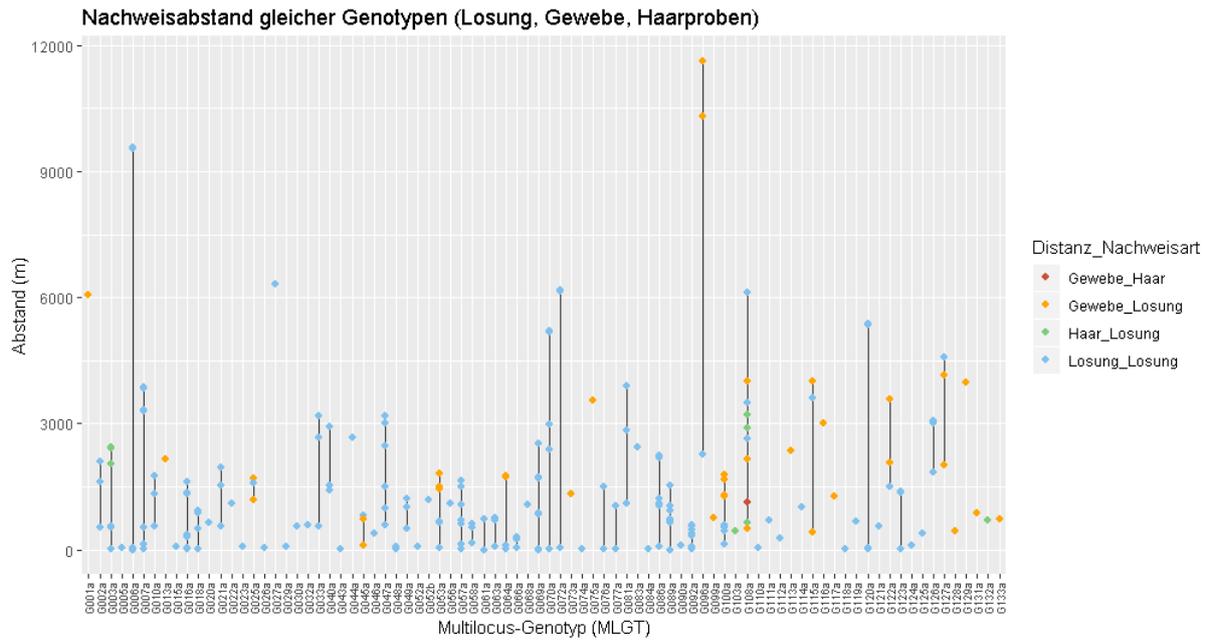


Abb. 117: Räumliche Abstände zwischen den verschiedenen Nachweisen unterschiedlicher MLGT (= Individuen) von Rothirschen aus mehreren Quellen (Haarprobe Besenderung, Kotprobe aus Sammlung 2016 und 2017, Gewebeproben aus Erlegung) im UG Bärenfels.

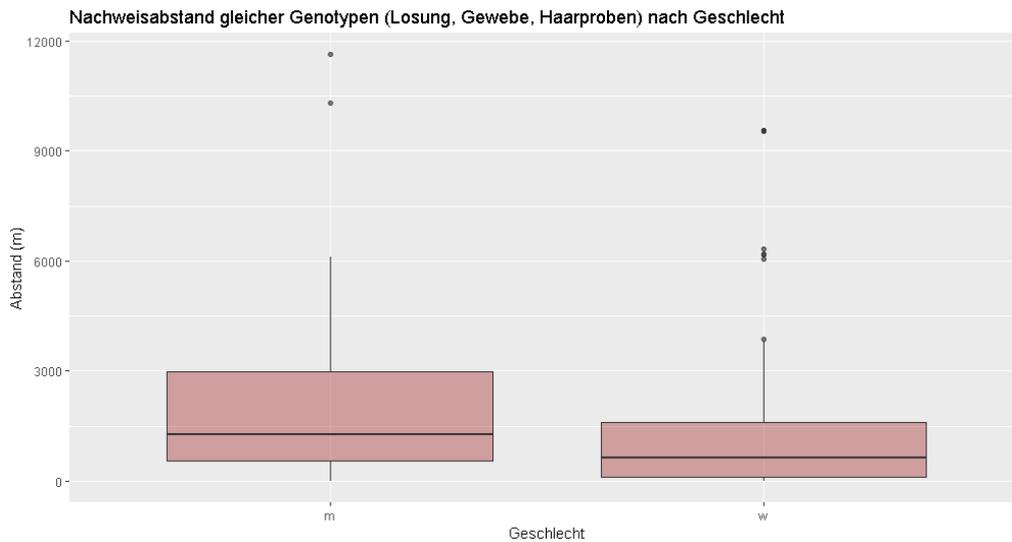


Abb. 12: Verteilung der räumlichen Abstände zwischen den verschiedenen Nachweisen unterschiedlicher MLGT von Rothirschen aus mehreren Quellen (Haarprobe Besenderung, Kotprobe aus Sammlung 2016 und 2017, Gewebeproben aus Erlegung) im UG Bärenfels nach Geschlecht (m=männlich, w=weiblich). Schwarze Linie: Median, Box: Oberes und unteres 25 % Quartil

6. DISKUSSION

6.1. Kritische Bewertung der Methodik

6.1.1. Losungssammlungen

Der Kern des Projektteils Genetische Untersuchungen im vorliegenden Projekt bestand aus der Kotgenotypisierung im Untersuchungsgebiet Bärenfels als Basis für die Schätzung der Populationsgröße. Die Probesammlung im Herbst 2016 auf einer Teilfläche des Untersuchungsgebietes zeigte, dass die Sammlung und Analyse ein sehr aufwändiges Verfahren ist, das aber zu plausiblen Wiederholungszahlen führen kann, mit denen eine Schätzung möglich ist.

Die etwas mehr als 20 % Proben anderer Arten sind damit zu erklären, dass die Sammler für den Probelauf angewiesen waren, auch Proben einzusammeln, bei denen sie die Art nicht sicher ansprechen konnten. Für die Rotwildproben war eine relativ hohe Erfolgsrate zu verzeichnen.

Für die beiden Sammlungen im Frühjahr wurden die Erfahrungen aus dem Herbst berücksichtigt. Die Sammlung sollte Informationen zum Frühjahrsbestand als Referenzmaß zu den weiteren Populationsdichteschätzungen (Distance Sampling, Fotofallen) liefern. Weil Sammlungen bspw. im Herbst die (jagdliche und natürliche) Mortalität bis zum Winterende nicht berücksichtigen, wurde von einer Herbstsammlung Abstand genommen. Es zeigt sich allerdings, dass die Qualität der Frühjahrsproben im Schnitt erheblich schlechter war. Es ist zu vermuten, dass dabei die spezifischen Witterungsbedingungen in den Hoch- und Kammlagen des Osterzgebirges eine Rolle spielen. Die erste Sammlung (März) im Frühjahr 2017 ergab auf der gleichen Strecke eine wesentlich höhere Probenzahl als die zweite (April). Das lässt darauf schließen, dass die Proben aus einem relativ langen Zeitraum stammten, aber trotzdem immer noch frisch aussahen, was auf das feuchte, kalte Lokalklima zurückzuführen ist.

Auch aus anderen Untersuchungen wird von Problemen bei der Probengewinnung aufgrund ungünstiger Witterung berichtet (Anonymus 2016a, 2018, 2019, Friemel 2013). Dabei können Schneelagen bei zu frühem oder Bodenvegetation und die Aktivität koprophager Insekten (Friemel 2013) bei zu spätem Sammeltermin zu einer geringeren Anzahl an Funden führen. Regen, direkte Sonnenstrahlung oder hohe Temperaturen üben negativen Einfluss auf die Menge und Qualität der Wirts-DNA in den gesammelten Proben aus. Für künftige Vorhaben sollte deshalb der Zeitraum der Sammlung sehr flexibel gestaltet werden, um kurzfristig auf das Wetter reagieren zu können.

Als Einschränkung bei der Ausbeute an Losungsfunden erwies sich die Sammlung entlang der Transekte mit einem Abstand von 500 m. Dadurch wurde nur ein relativ kleiner Teil der Fläche abgesucht. Für Untersuchungen vergleichbarer Flächengröße (Anonymus 2016a, b, c, 2017, 2019, Gräber *et al.* 2016) sind wesentlich längere Laufstrecken der Sammler angegeben. Das wird entweder durch die wiederholte Begehung der gleichen oder verschobener Transekte über mehrere Tage erreicht (z.B. Ebert 2011), was aber zu einer verstärkten Beunruhigung des Wildes führen kann. Eine andere Möglichkeit ist die Aufteilung des Untersuchungsgebietes in Teilflächen von z.B. 1 km², die von jeweils einer Person ohne vorgegebene Transekte so abgesucht werden, dass Bereiche mit höherer Fundwahrscheinlichkeit wie Dickungen, Freiflächen oder Wildwechsel auf jeden Fall mit erfasst werden

(Anonymus 2016b, c). Das erhöht die Effektivität der Erfassung und hält die Beunruhigung des Wildes auf niedrigem Niveau, da jede Fläche nur einmal aufgesucht wird.

Bei Anwendung dieser Methode wurde aus dem Projekt Rotwildkonzeption Nordschwarzwald über ein Vielfaches an Losungsfunden (zwischen 13.000 und 25.000) gegenüber den in der vorliegenden Untersuchung erfassten Zahlen berichtet (Anonymus 2017, 2018, 2019), was dort eine strikte Selektion der Proben für die Analyse ermöglichte, während hier fast alle im Labor bearbeitet wurden. Die Ergebnisse aus der Testsammlung im Herbst 2016 zeigen, dass die okulare Einschätzung der Frischegrade und der Ausschluss als „alt“ angesprochener Proben den Anteil erfolgloser DNA-Analysen und damit den Gesamt-Aufwand deutlich reduzieren kann.

6.1.2. Gewinnung der Gewebeproben

Die Gewebeproben zur Beschreibung der genetischen Struktur der Rotwildvorkommen im Erzgebirge wurden im Rahmen des regulären Jagdbetriebes gewonnen. Die Anzahl der Proben pro Forstbezirk in diesem Gebiet wurde vorgegeben, auf die Verteilung dagegen von Seiten des Projektes kaum Einfluss genommen. Das Probenaufkommen ist daher wahrscheinlich nicht in vollem Umfang repräsentativ für die Vorkommen. Durch die Angaben aus den Wildursprungsscheinen sind die Proben mit relativ vielen Informationen verknüpft.

6.1.3. Analysemethoden

Nach der Etablierung der Labormethoden wurde ein Set von 8 Mikrosatelliten-Markern und einem geschlechtsspezifischen Marker übernommen. Es erwies sich als ausreichend variabel, um Multilocus-Genotypen zu differenzieren und Wiederfunde des gleichen Genotyps zuzuordnen, wenn die DNA-Qualität ausreichend ist.

Da die Qualität der extrahierten DNA bei der Kotgenotypisierung sehr unterschiedlich und oft nicht gut ist, muss besonderes Augenmerk auf mögliche Genotypisierungsfehler gelegt werden (Valière *et al.* 2007, Puechmaille & Petit 2007), die trotz aller Sorgfalt nicht völlig zu vermeiden sind. Um den Aufwand im Labor in Grenzen zu halten, erfolgte in der vorliegenden Untersuchung eine Kombination des Ausschlusses ungeeigneter Proben mit der mehrmaligen Analyse erfolgversprechender Proben nach Puechmaille & Petit (2007). Die Entscheidung, zwei Proben dem gleichen Individuum zuzuordnen, wurde nur dann getroffen, wenn beide Genotypen komplett identisch waren, oder an nur einem Marker die Abweichung eines Allels vorlag, die durch Genotypisierungsfehler (Ausfall des zweiten Allels, falsche Ansprache eines unspezifischen Peaks als Allel) entstanden sein konnten. Bei stärkerer Abweichung wurden die Proben als unterschiedliche Individuen betrachtet. Das führt möglicherweise zu einer Unterschätzung der Wiederfunde und folglich zu einer Überschätzung der Populationsgröße (Waits & Paetkau 2005).

In der vorliegenden Untersuchung war die Qualität der aus dem Kot extrahierten DNA leider bei vielen Proben nur mäßig gut bis schlecht. Im Kapitel 6.1.1. sind Gründe genannt, die aus der Sammlung resultieren. Außerdem kam es im Projektverlauf zu einer Reihe gravierender technischer und personeller Probleme im Labor, die die Probenbearbeitung verzögerten und zusätzliche Wiederholungsanalysen erforderlich machten. Für die Proben bzw. die extrahierte DNA führte das zu längeren Lagerzeiten und vor allem, durch die zusätzlichen Bearbeitungsschritte, zu häufigeren Temperaturschwankungen. Dadurch verschlechterte sich die Qualität der DNA weiter, was im

Endeffekt dazu führte, dass aus den Losungssammlungen im Frühjahr nicht genügend Konsensusgenotypen bestimmt werden konnten.

Für die Untersuchung der genetischen Strukturen aus Gewebe- und Haarproben wurden die gleichen Marker verwendet. Da die technischen Probleme inzwischen beseitigt waren, gab es bei den Laborarbeiten und der Bestimmung der Genotypen keine Probleme. Das Marker-Set hat sich auch für dieses Versuchsziel als geeignet erwiesen, obwohl aus der Literatur eine viel größere Anzahl von Markern zur Verfügung steht (z.B. Kuehn *et al.* 1996, Meredith *et al.* 2005) und es eine große Anzahl von Untersuchungen gibt, in denen verschiedene und zum Teil sehr viele Marker verwendet worden sind (Übersicht in Zachos & Hartl 2011). Während allgemeine Diversitätsparameter über diese Studien hinweg teilweise vergleichbar sind, ist ein direkter Vergleich genetischer Strukturen zwischen konkreten Vorkommen nur möglich, wenn die gleichen Marker verwendet werden.

6.2. Genetische Auswertung

6.2.1. Fang-Wiederfang-Untersuchung

Die Verfahren zur Schätzung von Populationsgrößen mit Fang-Wiederfang-Methoden basieren auf der Annahme, dass es sich um relativ abgeschlossene Populationen handelt. Dafür würde im vorliegenden Fall sprechen, dass es bei den Gewebeproben, die außerhalb des Untersuchungsgebietes Bärenfels (Forstbezirke Neustadt und Marienberg) gesammelt wurden, keine Wiederfunde von Genotypen aus der Kot-Untersuchung gab. Aus den sich südlich angrenzenden tschechischen Rotwildeinstandsgebieten lagen keine Gewebeproben vor.

Die Telemetriestudie der TU Dresden hat jedoch für alle vier Untersuchungsgebiete eine grenzübergreifende Raumnutzung in unterschiedlich hohem Maße nachgewiesen. Die Ergebnisse der Elternschaftsanalyse mit CERVUS lassen ebenfalls in einer Reihe von Fällen Familienstrukturen vermuten, die über das Untersuchungsgebiet hinausreichen. Auch die Ergebnisse der STRUCTURE-Analyse führen zur Schlussfolgerung, dass es insbesondere zwischen den Forstbezirken Bärenfels und Marienberg keine Abgrenzung in der Rotwildpopulation gibt.

Dieser scheinbare Widerspruch scheint eher nochmals darauf hinzuweisen, dass die Ergebnisse der Kot-Genotypisierung die Rotwild-Population im Untersuchungsgebiet nicht im ausreichenden Maße abbilden und damit keine Grundlage für die vorgesehene Populationsgrößenschätzung bieten, insbesondere da sie von der Dynamik der ausgeprägten saisonalen Raumnutzung überlagert werden. Dieser Einfluss wirkt umso stärker, je kleiner die betrachtete Fläche ist.

6.2.2. Genetische Struktur der Rotwildpopulation im Erzgebirge

Die Gewebeuntersuchung bezog sich auf den sächsischen Teil des Erzgebirges. Es ist aber zu beachten, dass beiderseits der tschechisch-deutschen Grenze, die entlang des gesamten Erzgebirgs-Kammes verläuft, Rotwild lebt. Die Beobachtung der besenderten Tiere (Teilbericht TU Dresden) zeigt, dass grenzüberschreitende Kontakte regelmäßig erfolgen, so dass hier von genetischem Austausch in größerem Umfang auszugehen ist.

Die Ergebnisse der Gewebeuntersuchungen, insbesondere die Verschiebungen in den Häufigkeiten einiger Allele, lassen darauf schließen, dass es sich bei den Rotwildvorkommen im (sächsischen) Erzgebirge um eine Gesamtpopulation handelt, die sich aber relativ deutlich in zwei Teil-Populationen gliedert. Während in der Teil-Population Westerzgebirge (Proben aus den Forstbezirken Adorf,

Eibenstock, Neudorf) keine weitere Strukturierung gefunden wurde, gibt es im Bereich Mittel- und Osterzgebirge eine weitere Untergliederung. Die Teil-Population Neustadt unterscheidet sich etwas stärker von den Proben aus den Forstbezirken Marienberg und Bärenfels, als diese voneinander. Das Kollektiv Bärenfels bildet nicht nur geografisch, sondern auch genetisch einen Übergang zwischen den Kollektiven Marienberg und Neustadt.

Die Veränderungen der Häufigkeiten einiger Allele zeigen, dass Genfluss über das ganze Untersuchungsgebiet hinweg existiert. Dafür sprechen auch die Parameter der genetischen Variation. Die verwendeten Marker weisen mit insgesamt 6 bis 26 Allelen eine vergleichsweise hohe Variabilität auf. In den Diversitätsparametern zeigt sich, dass die Variabilität in allen Teil-Populationen hoch ist. Die erwartete Heterozygotie H_e liegt in allen vier Teil-Populationen deutlich über 80 %, und auch die beobachtete Heterozygotie H_o erreicht Werte über 76 %. Der Fixierungsindex F deutet in der Teil-Population Marienberg auf genetische Strukturen nahe dem genetischen Gleichgewicht hin, in den anderen Teil-Populationen besteht ein leichtes Heterozygoten-Defizit, das im Westerzgebirge mit 5,8 % den höchsten Wert einnimmt. In vielen anderen Untersuchungen wird sowohl von deutlich geringeren Heterozygotie- (H_o) und Diversitätswerten (H_e), als auch von höheren Werten des Fixierungsindex (Übersicht in Zachos & Hartl 2011) berichtet, was aber teilweise ein Effekt der unterschiedlichen Marker ist. In einer Untersuchung tschechischer Populationen betragen die durchschnittlichen Werte der beobachteten Heterozygotie ca. 60 % und die der erwarteten Heterozygotie 71 %. Der durchschnittliche Fixierungsindex lag bei $F=0,165$ (Krojerová *et al.* 2015). Als Ursache wird der Wahlund-Effekt vermutet (Krojerová *et al.* 2015, Zachos *et al.* 2016), der durch genetische Drift als Folge von reduziertem genetischem Austausch, z.B. aufgrund von Isolation entstehen kann. Bei Betrachtung der einzelnen Marker zeigt sich aber, dass viele mit sehr hohen Null-Allel-Wahrscheinlichkeiten behaftet sind, was ebenfalls zu geringen Heterozygotiewerten führen kann. Der einzige in beiden Untersuchungen (der vorliegenden Studie und in Krojerová *et al.* 2015) analysierte Marker IDVGA55 zeigt vergleichbare Ergebnisse und hier wie da keine Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

In Untersuchungen der Mitochondrien-DNA, mit deren Hilfe großräumige Variation beschrieben werden kann, die sich aus den Refugien der letzten Eiszeit und der nachfolgenden Wiederausbreitung entwickelt hat (Ludt *et al.* 2004), sind drei tschechische Populationen (aus Südböhmen, Süd- und Nordmähren) der östlichen Linie C aus dem Balkanrefugium (Skog *et al.* 2009) und eine nicht näher bezeichnete ostsächsische Population der westlichen Linie A mit einem Refugium auf der iberischen Halbinsel (Niedziałkowska *et al.* 2011) zugeordnet worden. Kontaktbereiche, in denen Muster aus beiden Linien vertreten sind, wurden zunächst in Italien (Piemont, Skog *et al.* 2009) und in Mittelpolen, Litauen und Weißrussland (Niedziałkowska *et al.* 2011) gefunden, später auch im Bayrischen und Böhmerwald (Fickel *et al.* 2012, Krojerová *et al.* 2015) sowie in einer Population in Mittelböhmen (Krojerová *et al.* 2015). Für die litauischen und weißrussischen Populationen vermuten Niedziałkowska *et al.* (2011) eine Ursache in der Überlagerung der natürlichen Ausbreitung mit der antropogen durch den Transfer von Rotwild verbrachten Gründerpopulationen, besonders der Linie A. Mehrere Publikationen, die die großräumigen Studien auf regionaler Ebene untersetzen, weisen auf den relativ geringen Umfang der Überlappung und/oder Vermischung beider Linien hin. Das bedeutet, dass die Linien, obwohl es keine natürlichen Reproduktionsbarrieren gibt, über sehr lange Zeiträume nebeneinander existierten.

Die Existenz der beiden nacheiszeitlichen Linien und einer Kontaktzone zwischen ihnen lässt sich auch mit Mikrosatelliten-Markern nachvollziehen (Krojerová *et al.* 2015, Zachos *et al.* 2016), wobei hier die Abgrenzung weniger scharf verläuft. Das liegt zum einen an der Vererbung der Mikrosatelliten-Marker über beide Eltern (im Gegensatz zu den mtDNA-Markern, die nur mütterlich vererbt werden), und zum zweiten an ihrer sehr großen Variabilität. Krojerová *et al.* (2015) vermuten Paarungspräferenzen als Ursache für die Erhaltung der unterschiedlichen genetischen Linien über viele Jahrtausende.

Die oben erwähnte ostsächsische Population weist in den mtDNA-Analysen ausschließlich einen Haplotyp der westlichen Linie A auf, der ansonsten in Mischung mit anderen Typen in Vorkommen in Mecklenburg sowie in Mittel- und Nordostpolen gefunden wurde (Niedziałkowska *et al.* 2011). Mit den Mikrosatelliten-Daten clustert sie bei drei vorgegebenen Gruppen überwiegend zu der Gruppe, die der westlichen Linie A entspricht, mit einem geringen Anteil der Gruppe, die eher zur Linie C passt. Bei der Annahme von 26 genetischen Populationen in Europa gruppiert sich die ostsächsische Population hauptsächlich mit den mecklenburgischen, mittel- und ostpolnischen Vorkommen, aber auch mit einem geringen Anteil einer Gruppe, die eher zur östlichen Linie zuzuordnen ist (Zachos *et al.* 2016). Ähnlich verhält es sich mit einer Population (27 Proben) aus dem tschechischen Erzgebirge, von der mit beiden Marker-Arten ein großer Anteil von Individuen eindeutig der westlichen Linie A und ein kleiner Teil der östlichen Linie C zugeordnet wird. Die Ergebnisse der Mikrosatelliten-Analysen lassen darüber hinaus auf Individuen schließen, die unterschiedliche Anteile beider Linien in ihrem Erbgut vereinigen (Krojerová *et al.* 2015).

Für das sächsische Erzgebirge liegen noch keine mtDNA-Ergebnisse vor. Aus den bisher bekannten Informationen ist aber abzuleiten, dass die beiden Linien möglicherweise im Norden der Tschechischen Republik oder in Sachsen zusammentreffen oder sich überschneiden. Für das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung, dass es trotz nachweisbarem Genfluss relativ deutlich abgrenzbare Teil-Populationen gibt, könnte darin eine Erklärung liegen. Genauere Untersuchungen beiderseits der Grenze könnten klären, ob und wie in diesem Bereich die Kontaktzone zwischen den Linien A und C verläuft und damit zum besseren Verständnis der postglazialen Verbreitungshistorie des Rothirsches in Sachsen beitragen.

Neben der Betrachtung der regionalen genetischen Variation spielen bei der Entwicklung von Managementkonzepten auch die Strukturen und das Verhalten von Individuen und Familienverbänden eine wichtige Rolle. Mit Hilfe von Elternschaftsanalysen wurden außer den Verwandtschaftsverhältnissen telemetriertes Tiere auch Vermutungen zu bestehenden Mutter-Kind-Beziehungen überprüft und in 12 von 16 Fällen bestätigt, in denen Alttier und Kalb gleichzeitig erlegt wurden. In den restlichen vier Fällen kommen unterschiedliche Ursachen in Betracht, die von ungenauen Angaben (Ort oder Zeit) im Wildursprungsschein bis hin zur Erlegung des Alttiers am folgenden Morgen reichen. Letztlich unterstreicht das Ergebnis, dass es sich bei der Bejagung der Zuwachsträger um einen sehr sensiblen Bereich handelt, über den noch relativ wenige Daten vorliegen (Hettich & Hohmann 2018) und der deshalb sehr anfällig für Spekulationen ist.

Für 69 von 351 potentiellen Nachkommen aus den Gewebeproben wurden wahrscheinlichste Mütter ohne Mismatch geschätzt, allerdings meist mit relativ geringer Sicherheit unter 80 %. Die Referenz der besenderten Nachkommen von bekannten Müttern ergab eine Erfolgsrate von 5:6 richtig erkannten Müttern. Übertragen auf die Analyse der Nachkommen mit unbekanntem Müttern könnte in 57 Fällen die wahrscheinlichste Mutter auch die richtige Mutter sein. Andererseits wurde selbst zu den als sehr

sicher ermittelten Mutter-Kind-Paaren kein wahrscheinlichster Vater gefunden. Es ist zu vermuten, dass sich mit einer größeren Zahl an Mikrosatelliten-Markern die Sicherheit der Aussagen zu Familienstrukturen im engeren Sinne verbessern ließe.

Die Elternschaftsanalysen wurden durchgeführt, um einen Eindruck von den Verwandtschaften in der Population zu erhalten. Im besten Fall könnten dabei Informationen über das Wanderungsverhalten gewonnen werden, die die punktuellen Erkenntnisse aus der Telemetrie ergänzen und untersetzen. Darüber hinaus haben Müller *et al.* (2020) ein Verfahren vorgestellt, aus den Verwandtschaften zwischen den erlegten Tieren die Populationsgröße zu schätzen. Damit wäre es möglich, basierend auf Mikrosatellitendaten aus Gewebeproben z. B. des in einem Jahr erlegten Teils einer Population und deren individuellen Daten die Anzahl von Eltern-Nachkommen-Paaren in dieser Stichprobe zu schätzen. Unter der Annahme, dass sich die Wahrscheinlichkeit, ein Individuum und einen oder beide Elternteile in der gleichen Stichprobe zu erfassen, umgekehrt proportional zur Populationsgröße verhält, könnte dann auf die Größe der Population geschlossen werden. Die Stichprobe sollte dabei nicht zu klein sein und nicht aus stark selektiver Jagd stammen. Auf diese Weise könnten für künftige Schätzungen der Populationsgröße die ohnehin anfallenden Gewebeproben mit besserer DNA-Qualität anstatt der aufwändigen und mit großen Risiken behafteten Kotgenotypisierung genutzt werden.

7. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Das Hauptziel des Teilprojektes Genetik bestand in der Populationsgrößenschätzung für das Untersuchungsgebiet Bärenfels auf der Grundlage von Kotgenotypisierung. Obwohl die Ergebnisse zum Teil die Eignung des Verfahrens bestätigen, konnte dieses Ziel aufgrund einer Reihe von Widrigkeiten bei der Probengewinnung und der Analyse nicht erreicht werden. Für künftige Vorhaben sollte die Probenahme und Analyse aufgrund der hier vorliegenden Erfahrungen flexibler gestaltet und - soweit möglich - noch mehr versucht werden, bei geeigneter Witterung größere Probenzahlen zu gewinnen und vorrangig die frischsten Proben möglichst zügig im Labor zu untersuchen. Allerdings bleibt das Verfahren auch bei sorgfältigster Planung sehr aufwändig und mit Risiken behaftet. Deshalb könnte alternativ das von Müller *et al.* (2020) vorgeschlagene Verfahren zur Populationsgrößenschätzung auf der Grundlage von Verwandtschaftsanalysen an Gewebeproben getestet werden.

Die Rotwild-Population im sächsischen Erzgebirge lässt sich in vier mehr oder weniger deutlich voneinander differenzierte Teil-Populationen gliedern, wobei sich die Teil-Population Westergebirge am deutlichsten von den drei anderen unterscheidet. Die genetischen Strukturen sind durch relativ hohe genetische Variation gekennzeichnet. Es gibt genetischen Austausch zwischen den Teil-Populationen und kaum Anzeichen für Inzucht, was auf eine intakte, genetisch anpassungsfähige Population schließen lässt. Eine sicherere Aussage dazu wäre bei Betrachtung der Rotwildpopulation im Erzgebirge als Ganzes und anderer sächsischer Rotwildvorkommen zu erwarten. Dabei ließe sich unter Einbeziehung der Mitochondrien-DNA-Marker auch die Frage untersuchen, ob sich hier eine Kontaktzone zwischen den Linien der postglazialen Ausbreitung bestätigt.

Die vorliegenden Ergebnisse bilden eine Momentaufnahme. Erkenntnisse zur Frage, ob der aktuelle Stand der Differenzierung eher Teil einer Divergenz- oder Konvergenz-Entwicklung ist, erfordern langfristige Beobachtungen populationsgenetischer Veränderungen, z.B. durch genetisches Monitoring.

Die in der vorliegenden Untersuchung ermittelten Teil-Populationen sollten bei der Entwicklung von Management-Plänen berücksichtigt werden.

LITERATUR

- Anonymus 2016a: Ergebnisse der Genetikuntersuchung aus der Vorstudie im April 2014. 2. Newsletter des Projekts Rotwildkonzeption Nordschwarzwald. 31.03.2016, S. 3-7, <https://www.rotwildkonzeption-nordschwarzwald.de/infos/downloads>
- Anonymus 2016b: Vorbericht zur Genetikuntersuchung 2016. 2. Newsletter des Projekts Rotwildkonzeption Nordschwarzwald. 31.03.2016, S. 8-9, <https://www.rotwildkonzeption-nordschwarzwald.de/infos/downloads>
- Anonymus 2016c: Genetikbeprobung 2016 am Kaltenbronn (04.04. – 09.04.2016). 3. Newsletter des Projekts Rotwildkonzeption Nordschwarzwald. 13.09.2016, S. 2, <https://www.rotwildkonzeption-nordschwarzwald.de/infos/downloads>
- Anonymus 2017: Ergebnisse der Frischkotgenotypisierung am Kaltenbronn von 2016. 6. Newsletter des Projekts Rotwildkonzeption Nordschwarzwald. 24.04.2017, S. 4-8, <https://www.rotwildkonzeption-nordschwarzwald.de/infos/downloads>
- Anonymus 2018: Frischkotgenotypisierung im April 2018. 10. Newsletter des Projekts Rotwildkonzeption Nordschwarzwald. 14.09.2018, S. 7, <https://www.rotwildkonzeption-nordschwarzwald.de/infos/downloads>
- Anonymus 2019: Genetikbeprobung 2019 – Nachlese. 12. Newsletter des Projekts Rotwildkonzeption Nordschwarzwald. 14.08.2019, S. 7, <https://www.rotwildkonzeption-nordschwarzwald.de/infos/downloads>
- Barbosa AM, Fernández-García JL, Carranza J 2009: A new marker for rapid sex identification of red deer (*Cervus elaphus*). *Hystrix It. J. Mamm.* 20(2):169-172.
- Boulanger J, McLellan B 2001: Closure violation in DNA-based mark-recapture estimation of grizzly bear populations. *Canadian Journal of Zoology* 79(4):642-651.
- Brinkman T.J, Person DK, Schwartz MK, Pilgrim KL, Colson KE 2010: Individual identification of Sitka black-tailed deer (*Odocoileus hemionus sitkensis*) using DNA from fecal pellets. *Conservation Genetics Resources* 2:115–118.
- Broquet T, Petit E 2004: Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics. *Mol Ecol* 13:3601–3608.
- Cukor J, Havránek F, Rohla J, Bukovjan K 2017: Estimation of red deer density in the west part of the Ore Mts. (Czech Republic). In: *Zpravy Lesnickeho Vyzkumu* 62:288–295.

- Dellicour S, Frantz AC, Colyn M, Bertouille S, Chaumont F, Flamand MC 2011: Population structure and genetic diversity of red deer (*Cervus elaphus*) in forest fragments in north-western France. *Conserv Genet* 12:1287–1297. DOI: 10.1007/s10592-011-0230-0
- Earl DA, vonHoldt BM 2012: STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2):359-361. DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Ebert C 2011: Non-invasive genetic approaches to estimate ungulate population sizes in the Palatinate Forest, south-west Germany. Diss. Freiburg S. 101.
- Ebert C, Knauer F, Spielberger B, Thiele B, Hohmann U 2012a: Estimating wild boar *Sus scrofa* population size using faecal DNA and capture-recapture modelling. *Wildlife Biology* 18:142-152. DOI: 10.2981/11-002
- Ebert C, Sandrini J, Spielberger B, Thiele B, Hohmann U 2012b: Non-invasive genetic approaches for estimation of ungulate population size: a study on roe deer (*Capreolus capreolus*) based on faeces. *Animal Biodiversity and Conservation*, 35(2): 267–275.
- Efford MG 2016: Software-Package Spatially Explicit Capture-Recapture (SECR). Version 2.10.4 <http://www.otago.ac.nz/density>
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J 2005: Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620.
- Fernández-García JI, Carranza J, Martínez JG, Randi E 2014: Mitochondrial D-loop phylogeny signals two native Iberian red deer (*Cervus elaphus*) Lineages genetically different to Western and Eastern European red deer and infers human-mediated translocations. *Biodiversity and Conservation* 23:537-554. DOI: 10.1007/s10531-013-0585-2.
- Fickel J, Hohmann U 2006: A methodological approach for non-invasive sampling for population size estimates in wild boars (*Sus scrofa*). *European Journal of Wildlife Research* 52(1):28–33. DOI: [10.1007/s10344-005-0003-5](http://dx.doi.org/10.1007/s10344-005-0003-5)
- Fickel J, Bubliy OA, Stache A, Noventa T, Jirsa A, Heurich M 2012: Crossing the border? Structure of the red deer (*Cervus elaphus*) population from the Bavarian–Bohemian forest ecosystem. *Mammalian Biology* 77:211–220. doi:10.1016/j.mambio.2011.11.005
- Frantz AC, Hamann JL, Klein F 2008: Fine-scale genetic structure of red deer (*Cervus elaphus*) in a French temperate forest. *European Journal of Wildlife Research*. 54(1):44-52. <http://dx.doi.org/10.1007/s10344-007-0107-1>
- Friemel B 2013: Anwendung der Frischkotgenotypisierung zur Bestandesschätzung einer Rehwildpopulation (*Capreolus capreolus*) im Bienwald, Rheinland-Pfalz. Maserarbeit, Universität für Bodenkultur Wien, Institut für Wildbiologie, 79 S.
- Fussi B, Kunz M, Tröber U, Leinemann L, Kätzel R, Eusemann P, Liesebach H, Becker F, Kuchma O, Kersten B, Voth W, Karopka M, Höltken A, Havel S, Rose B, Wolf H, Kahlert K, Hosius B 2020: GenMon – Einrichtung eines genetischen Monitorings für Buche und Fichte in Deutschland zur Bewertung der genetischen Anpassungsfähigkeit der Baumarten gegenüber Umweltveränderungen. Schlussbericht, Bayerisches Amt für Waldgenetik, Teisendorf, 139 S.

- Glaubitz JC 2004: CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*, 4: 309–310. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00597.x
- Gräber R, Ronnenberg K, Strauß E, Siebert U, Hohmann U, Sandrini J, Ebert E, Hettich U, Franke U 2016: Vergleichende Analyse verschiedener Methoden zur Erfassung von freilebenden Huftieren. Abschlussbericht zum DBU-Forschungsprojekt, 107 S.
- Grill F 2015: Rotwild-Monitoring mittels Genetik. *Der Anblick*, Heft 7(2015):28-31.
- Gurgul A, Radko A, Słota E 2010: Characteristics of X- and Y- chromosome specific regions of the amelogenin gene and a PCR-based method for sex identification in red deer (*Cervus elaphus*). *Mol Biol Prep*. 37:2915-2918. DOI: 10.1007/s11033-009-9852-4.
- Hartl GB, Willing R, Lang G, Klein F, Köller J 1990: Genetic variability and differentiation in red deer (*Cervus elaphus* L) of Central Europe. *Genetics Selection Evolution* 22:289-306.
- Herzog S, Gehle T 2001: Genetic structures and clinal variation of European red deer *Cervus elaphus* populations for two polymorphic gene loci. *Wildlife Biology* 7: 55-59.
- Hettich U, Hohmann U 2018: Telemetrische Untersuchungen zum Trennungsverhalten von Alttier und Kalb bei Rotwild – eine individual-basierte Pilotstudie. <https://www.rotwildkonzeption-nordschwarzwald.de/sites/default/files/public/content/2018/2018-04-03/alttier-kalb-beziehung-hohmannundhettich-fawf.pdf>
- Hohmann U, Rahlfs M, Ebert C 2011: Die Rotwildzählung. *ÖKOJAGD* August 2011, 55-56.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC 2007: Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16:1099-1106. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>
- Krojerova-Prokešová J, Barančeková M, Koubek P. 2015. Admixture of Eastern and Western European Red Deer Lineages as a Result of Postglacial Recolonization of the Czech Republic (Central Europe). 106:375–385.
- Kuehn R, Anastassiadis C, Pirchner F 1996: Transfer of bovine microsatellites to the cervine (*Cervus elaphus*). *Animal Genetics* 27(3):199-201.
- Kuehn R, Schroeder W, Pirchner F, Rottmann O 2003: Genetic diversity, gene flow and drift in Bavarian red deer populations (*Cervus elaphus*). *Conservation Genetics*. 4(2):157-166. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1023394707884>.
- Lampa S, Mihoub J-B, Gruber B, Klenke R, Henle K 2015: Non-Invasive Genetic Mark-Recapture as a Means to Study Population Sizes and Marking Behaviour of the Elusive Eurasian Otter (*Lutra lutra*). *PLoS ONE* 10(5): e0125684. DOI: 10.1371/journal.pone.0125684
- Ludt CJ, Schroeder W, Rottmann O, Kuehn R 2004: Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31:1064–1083, DOI: 10.1016/j.ympev.2003.10.003
- Maršálková L, Židek R, Pokoradi J, Golian J, Belej L 2014: Genetic diversity and relatedness among seven red deer (*Cervus elaphus*) populations. *Potravinarstvo* 8(1):15-19. DOI: 10.5219/320

- Matosiuk M, Śmietana W, Czajkowska M, Paule L, Štofik J, Krajmerová D, Bashta A-T, Jakimiuk S, Ratkiewicz M 2019: Genetic differentiation and asymmetric gene flow among Carpathian brown bear (*Ursus arctos*) populations—Implications for conservation of transboundary populations. *Ecology and Evolution* 9(3): 1501–1511. DOI: 10.1002/ece3.4872
- McKelvey KS, Schwartz MK 2004a: Genetic errors associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. *Journal of Wildlife Management* 68:439–448.
- McKelvey KS, Schwartz MK 2004b: Providing reliable and accurate genetic capture-mark-recapture estimates in a cost effective way. *Journal of Wildlife Management* 68:453–456.
- Meredith EP, Rodzen JA, Levine KF, Banks JD 2005: Characterization of an additional 14 microsatellite loci in California Elk (*Cervus elaphus*) for use in forensic and population applications. *Conservation Genetics* 6:151-153. DOI: 10.1007/s10592-004-7735-8.
- Miller CR, Joyce P, Waits LP 2005: A new method for estimating the size of small populations from genetic mark-recapture data. *Molecular Ecology* 14:1991-2005.
- Müller B, Mercker M, Brün J 2020: Population size estimates based on the frequency of genetically assigned parent–offspring pairs within a subsample. *Ecology and Evolution* 10:6356–6363. DOI: 10.1002/ece3.6365
- Nei M 1972: Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106:283-292
- Niedziałkowska M, Jędrzejewska B, Honnen A-C, Otto T, Sidorovich VE, Perzanowski K, Skog A, Hartl GB, Borowik T, Bunevich AN, Lang J, Zachos FE 2011: Molecular biogeography of red deer *Cervus elaphus* from eastern Europe: insights from mitochondrial DNA sequences. *Acta Theriol* 56:1–12. DOI: 10.1007/s13364-010-0002-0
- Paule L, Krajmerová D, Bakan J, Skrbinšek T, Klinga P, Slivková V 2015: Odhad veľkosti populácie medveďa hnedého na Slovensku na základe genetických analýz [Estimation of brown bear population size in Slovakia based on genetic analyses]. In Lešová A, Antal V (Eds.): Ochrana a manažment veľkých šeliem na Slovensku. Banská Bystrica, Štátna ochrana prírody SR, S. 73-84.
- Peakall R, Smouse PE 2006: GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6:288-295.
- Peakall R, Smouse PE 2012: GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539. <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/28/19/2537>
- Pfeiffer, I & Brenig B. 2005: X- and Y-chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep (*Ovis aries*) and European red deer (*Cervus elaphus*). *BMC Genet.* 6:16. DOI: 10.1186/1471-2156-6-16
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959
- Pritchard JK, Wen X, Falush D 2009: Documentation for STRUCTURE Software: Version 2.3.
- Prugh LR, Ritland CE, Arthur SM, Krebs CJ 2005: Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. *Molecular Ecology* 14:1585-1596.

- Puechmaillie SJ, Petit EJ 2007: Empirical evaluation of non-invasive capture–mark–recapture estimation of population size based on a single sampling session. *Journal of Applied Ecology* 44:843–852, doi: 10.1111/j.1365-2664.2007.01321.x
- Skog A, Zachos FE, Rueness EK, Feulner PGD, Mysterud A, Langvatn R, Lorenzini R, Hmwe SS, Lehoczky I, Hartl GB, Stenseth NC, Jakobsen KS 2009: Phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) in Europe. *Journal of Biogeography* 36:66–77. DOI: 10.1111/j.1365-2699.2008.01986.x
- Solberg KH, Bellemain E, Drageset O-M, Taberlet P, Swenson JE 2006: An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus arctos*) population size. *Biological Conservation* 128:158–168. DOI: 10.1016/j.biocon.2005.09.025
- Vala Z, Ernst M 2018: Red deer density in the air-polluted area of forest ecosystems in the Krušné hory Mts. – Klášterec nad Ohří Forest District. *Journal of Forest Science* 57:59–63. DOI: 10.17221/57/2010-JFS.
- Valière N, Bonenfant C, Toigo C, Luikart G, Gaillard J-M, Klein F 2007: Importance of a pilot study for non-invasive genetic sampling: genotyping errors and population size estimation in red deer. *Conservation Genetics* 8:69-78. DOI 10.1007/s10592-006-9149-2
- Waits LP, Paetkau D 2005: Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management* 69:1419-1433.
- White GC, Burnham KP 1999: Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* 46 Supplement:120-138.
- Zachos F, Hartl GB, Apollonio M and Reutershan T (2003) On the phylogeographic origin of the Corsican red deer (*Cervus elaphus corsicanus*): evidence from microsatellites and mitochondrial DNA. *Mammalian Biology* 68:284–298 DOI: [10.1078%2F1616-5047-00097](https://doi.org/10.1078/2F1616-5047-00097)
- Zachos FE, Althoff C, v. Steynitz Y, Eckert I, Hartl GB 2007: Genetic analysis of an isolated red deer (*Cervus elaphus*) population showing signs of inbreeding depression. *European Journal of Wildlife Research* 53:61-67. DOI: 10.1007/s10344-006-0065-z
- Zachos FE, Hartl GB 2011: Phylogeography, population genetics and conservation of the European red deer *Cervus elaphus*. *Mammal Review* 41(2):138-150, DOI: 10.1111/j.1365-2907.2010.00177.x
- Zachos FE, Frantz AC, Kuehn R, Bertouille S, Colyn M, Niedziałkowska M, Pérez-González J, Skog A, Sprēm N, Flamand M-C 2016: Genetic Structure and Effective Population Sizes in European Red Deer (*Cervus elaphus*) at a Continental Scale: Insights from Microsatellite DNA. *Journal of Heredity*, 107(4):318–326, doi: 10.1093/jhered/esw011