

ROLAND HAUSKNECHT; RALPH KÜHN, Freising; BARTOSZ PIRGA; ROMAN GULA, Ustrzyki Dolne

Molekulargenetisches Monitoring von Wildtierpopulationen am Beispiel von Wolfsrudeln in Polen

Schlagworte/key words: Wolf, *Canis lupus*, nichtinvasives genetisches Monitoring, false alleles, allelic dropout, Mikrosatelliten

Einleitung

Unter dem Begriff des „Monitoring“ versteht man allgemein eine Dauerbeobachtung oder Langzeituntersuchung von Naturgütern, Landschaften oder Tierpopulationen zur Zustandserfassung und zur Dokumentation möglicher Veränderungen des Naturhaushalts, der Artenzusammensetzungen oder Lebensgemeinschaften (STICKROTH et al. 2003). Als Dauerbeobachtung kann das Monitoring einerseits von der Bestandsaufnahme (*inventory*) als Zählung aller Individuen einer Population und andererseits von der Übersichtsuntersuchung (*survey*) abgegrenzt werden (PRIMACK 1995). Die Übersichtsuntersuchung wird dabei als wiederholbare Erhebung der Individuendichte auf Probeflächen durchgeführt, um die Populationsgrößen für die Gesamtfläche abzuschätzen (ebd.).

Für diese Langzeituntersuchungen freilebender Säugetierpopulationen können prinzipiell zwei methodische Ansätze zur Anwendung kommen. Der erste Ansatz beinhaltet feldökologische Methoden, wie z.B. Fang-Markierung-Wiederauffang-Methoden, das Abfährten von Spuren und Geläufen, Zählung von Individuen, Wurfbauen oder Losungshaufen, Telemetrie besonderer Individuen o.ä. (SUTHERLAND 2000). Für die Untersuchung von Wolfspopulationen werden

neben direkten Beobachtungen v.a. die Telemetrie und das Abfährten der Spuren im Winter angewandt (THEUERKAUF et al. 2003; WABAKKEN et al. 2001; MECH & HARPER 2002; u.v.m.).

Die Anwendung molekulargenetischer Methoden zur Untersuchung und Überwachung von Populationen stellt den zweiten Ansatz dar. Hinsichtlich der für dieses genetische Monitoring notwendigen Probenahme werden dabei drei verschiedene Techniken unterschieden (TABERLET et al. 1999). Bei der *destruktiven* Art der Probenahme wird das entsprechende Tier für die Entnahme des Probenmaterials zur genetischen Analyse getötet. Diese Methode scheidet für gefährdete Tierarten aus, ist jedoch z.B. bei der Untersuchung von Insektenpopulationen gebräuchlich (STOECKLE in prep.).

Demgegenüber erfordert die *nicht-destruktive* Probenahme nicht das Töten der zu untersuchenden Tiere, aber die Entnahme der Proben erfolgt invasiv in Form von Biopsien oder Blutproben entweder direkt vom gefangenen Tier oder mit Hilfe von sogenannten *biopsy dart guns* (ebd.).

Der modernste und schonendste Ansatz ist die nicht-invasive Probenahme, welche sich auf solche Proben beschränkt, die die betreffende Tierart in ihrem Lebensraum hinterlässt, wie z.B. Losung, Haare oder Federn. Technische

Weiterentwicklungen genetischer Analysemethoden, wie speziell der Polymerasekettenreaktion (PCR), ermöglichen diesen Ansatz, da selbst kleinste aus solchen Proben extrahierte DNA-Mengen für genetische Populationsuntersuchungen ausreichen. Daher ist bei diesem Ansatz der Fang der Tiere, welcher sich bei gefährdeten, nachtaktiven Arten oder solchen, die in geringer Dichte vorkommen als schwierig erweist, nicht mehr erforderlich.

Die zunehmende Bedeutung der genetischen Untersuchung von Wildtierpopulationen zeigt sich in der großen Zahl an Publikationen, welche sich im Bezug auf Wölfe mit unterschiedlichen Fragestellungen befassen, wie z.B. der Populationsgeschichte (VILA et al. 2003; LUCCHINI et al. 2004), der genetischen Differenzierung von Populationen (FORBES & BOYD 1997) oder dem Genfluss zwischen Populationen (CARMICHAEL et al. 2001) bzw. der Bedeutung von Ausbreitungsbarrieren (GEFFEN et al. 2004). Allerdings erfolgen die Analysen in den meisten Studien mit Gewebe- oder Blutproben. Der nicht-invasive Ansatz zur Probenahme bietet dagegen den Vorteil der Unabhängigkeit von Fängen bzw.

dem Bedarf vieler Gewebeproben, weshalb er auch für Wölfe von großem Interesse ist (LUCCHINI et al. 2002; CREEL et al. 2003).

Das *Bieszczady Wolf Project* der *Carpathian Wildlife Research Station* nutzt in Zusammenarbeit mit der AG Molecular Ecology and Conservation Genetics am Fachgebiet für Wildbiologie und Wildtiermanagement, den kombinierten Ansatz aus feldökologischen und nicht-invasiven genetischen Methoden, um die lokale Wolfspopulation in den Bieszczady Bergen in Südostpolen zu untersuchen (Karte 1). In diesem seit dem Jahr 2000 laufenden Projekt soll der aktuelle Populationsstatus der Wolfsrudel sowie deren Reaktion auf die zunehmende Habitatfragmentierung beschrieben werden. Dabei dienen die genetischen Untersuchungen der Charakterisierung der Wolfsrudel, sowie der Beschreibung der Verwandtschaftsverhältnisse und des Genflusses zwischen den Rudeln bzw. den benachbarten Teilpopulationen. Zudem werden über den genetischen Ansatz zusätzliche Informationen über Homorange, Sozialstruktur, Populationsgröße und Geschlechterverhältnisse ermittelt.



Karte 1 Lage des Untersuchungsgebietes im Dreiländereck Polen – Slowakei – Ukraine

Material und Methoden

Probenahme

Die Probenahme für die genetischen Analysen erfolgt während der Feldarbeiten im Winter (je nach Schneelage von Oktober bis April) und stützt sich vornehmlich auf Kot- und Urinproben. Ergänzend dazu werden auch von im Gebiet totaufgefundenen Wölfen Gewebeproben und von den zur Besenderung gefangenen Wölfen Blutproben entnommen. Kot- und Urinproben werden in gefrorenem Zustand gesammelt, zur Archivierung mit der Fundzeit und den geographischen Koordinaten des Fundortes mittels *Global Positioning System* (GPS) versehen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Gewebeproben werden in Alkohol gelagert.

DNA-Extraktion und genetische Analysen

Die DNA-Extraktion erfolgt aus etwa 100 mg Kot mit Hilfe des QIAmp Stool Mini Kits, QIAgen (HAUSKNECHT 2004). Die DNA von den aus einem Gemisch aus Schnee und Urin bestehenden Urinproben wird ebenfalls nach HAUSKNECHT (2004) extrahiert. Die Kontrolle der DNA-Qualität erfolgt in einem ethidium-

bromidhaltigen Agarosegel (0,8 %) unter UV-Licht.

Zur genetischen Differenzierung von Individuen werden verschiedene Mikrosatellitensysteme genotypisiert. Mikrosatelliten sind DNA-Abschnitte, welche meist im nicht-kodierenden Bereich des Genoms liegen und einfache, sich wiederholende Sequenzmotive enthalten, wie z.B. $(AC)_{15}$, $(GT)_{18}$. Diese Motive werden auch als *simple tandem repeat* (STR) bezeichnet, da sie 10 bis 50 Wiederholungen des Motivs aufweisen und entsprechend ihrer Motivlänge in Di-, Tri- oder Tetranukleotid-Systeme unterschieden werden können (KÜHN 2004). Unterschiedliche Längen eines Mikrosatellitenlocus bedingt durch unterschiedliche Anzahl an Motivwiederholungen werden als Allele bezeichnet und können mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese differenziert werden (ebd.). Zur Untersuchung der Wolfsrudel in Polen werden z.Zt. sechs Mikrosatellitensysteme, welche Di- und Tetranukleotide beinhalten (FRANCISCO et al. 1996; FREDHOLM & WINTERO 1995) und schon in einer anderen Wolfsstudie erfolgreich angewandt wurden (LUCCHINI et al. 2002), untersucht (Tabelle 1). Die Detektion der Genotypen, d.h. die genetische Charakterisierung eines Individuums

Tabelle 1 Untersuchte Mikrosatellitensysteme

System	Primersequenz	Anneal.-temp [°C]	Allellänge [bp]	Motiv	Referenz
CPH 2	F: TTCTGTTGTATCGGCACCA R: TTCTTGAGAACAGTGTCTCTCG	59	96-108	$(AC)_{15}$	FREDHOLM et al. 1995
CPH 4	F: ACTGGAGATGAAAACCTGAA GATTATA R: TTACAGGGGAAAGCCTCATT	59	140-148	$(TG)_{17}$	FREDHOLM et al. 1995
CPH 8	F: AGGCTCACAAATCCCTCTCATA R: TAGATTTGATACCTCCCTGAG TCC	57	202-214	$(GT)_{18}$	FREDHOLM et al. 1995
FH 2079	F: CAGCCGAGCACATGGTTT R: ATTGATTCTGATATGCCAGC	58	268-276	$(GGAT)_{47}$	FRANCISCO et al. 1996
FH 2088	F: CCCTCTGCCTACATCTCTGC R: TAGGGCATGCATATAACCAGC	58	112-132	$(TTTA)_{10}$ $(TTCA)_4$	FRANCISCO et al. 1996
FH 2096	F: CCGTCTAAGAGCCTCCAG R: GACAAGGTTTCTGGTTCA	59	96-108	$(GAAT)_9$	FRANCISCO et al. 1996

entsprechend seiner Allelausprägung an verschiedenen Mikrosatellitenloci, wird mit Hilfe von automatischen Sequence-Analysen (ALFExpress II bzw. ABI 377) und der Software *ALFwin*[®], *Genescan*[®], *AlleleLinks*[®] und *Genotyper*[®] am Fachgebiet durchgeführt. Zur Bestimmung identischer Genotypen werden die Programme *MSExcel Microsatellite Toolkit* und *GIMLET* (VALIERE 2002) genutzt.

Ergebnisse und Diskussion

Um in diesem Projekt die Anwendbarkeit und die Zuverlässigkeit der genetischen Analyse von nicht-invasiv genommenen Proben zu gewährleisten, sind vorausgehende Untersuchungen, wie sie im Folgenden dargestellt werden, notwendig.

Die Qualität und Quantität der aus Kot oder Urin extrahierten DNA ist geringer als die aus Gewebe- oder Blutproben gewonnene DNA (Abb. 1). Die geringe DNA-Konzentration ist darauf zurückzuführen, dass nur kleine Mengen an körpereigenen Zellen des Zieltieres mit dem Kot ausgeschieden werden. Dabei handelt es sich um Darmepithelzellen, die bei der Passage des Kotes durch den Darm abgeschabt werden. Neben dieser kleinen und ungleichmäßig über die Kotprobe verteilten Zellzahl findet sich darüber hinaus eine hohe Konzentration an Fremd-

bzw. Beute-DNA in den Kotproben. Dieses Ungleichgewicht aus geringer DNA-Konzentration des zu untersuchenden Tieres und hoher Konzentration an Fremd-DNA kann die genetischen Analysen beeinflussen. Die aus Urinproben extrahierte DNA stammt von Epithelzellen des Urogenitaltrakts bzw. von Leukozyten (Vu et al. 1999). Die DNA-Konzentration aus diesen Proben ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig (Geschlecht, Tageszeit, Anzahl der Urinierung, etc.; ebd.), aber der Einfluss von Fremd- bzw. Beute-DNA entfällt. Außerdem sind die Kot- und Urinproben den Witterungsbedingungen im Freiland bis zum Auffinden der Probe ausgeliefert. Dies führt in Abhängigkeit von der Temperatur und Luftfeuchtigkeit zu einer beschleunigten DNA-Degradation, was ebenfalls nachfolgende Analysen beeinträchtigen kann.

Trotz der geringen DNA-Konzentration der Kot- und Urinextrakte ist die Amplifizierung, sprich die spezifische Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte mittels PCR, erfolgreich (Abb. 2). Proben, deren Ausgangskonzentration an DNA zu gering ist (Spur 7, 12, 14 in Abb. 2), können in der zyklischen Enzymreaktion der PCR nicht vervielfältigt werden und zeigen dementsprechend keine Banden im Agarosegel. Jedoch weisen die meisten Kot- und Urinproben, wie an den Banden zu sehen ist, ausreichende DNA-Konzentrationen auf, um an

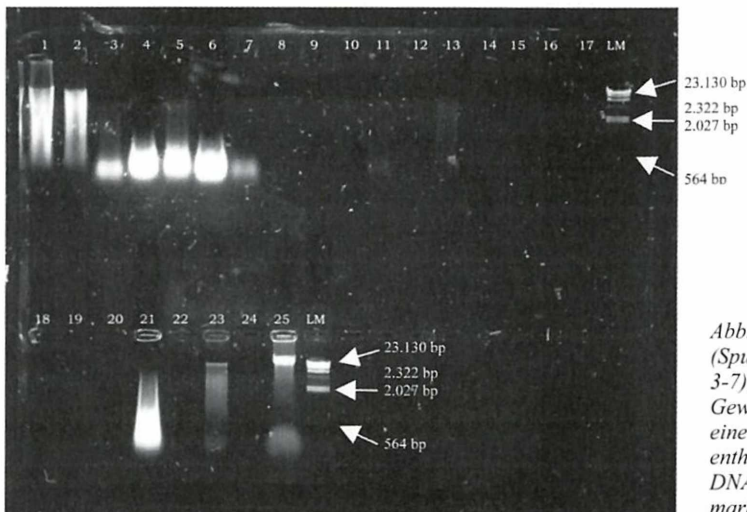
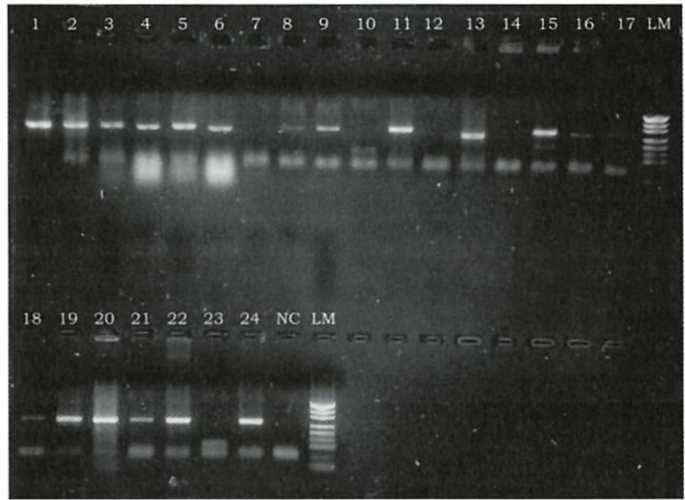


Abb. 1 DNA-Extrakte von Blut (Spur 1, 2, 22, 23), Kot- (Spuren 3-7), Urin- (Spuren 8-20, 24) und Gewebeproben (Spur 21, 25) in einem Agarosegel (0,8 %). Spur 17 enthält die Negativkontrolle der DNA-Präparation; LM: Längenmarker.

Abb. 2 PCR-Produkt des Mikrosatellitenlocus FH 2079 von Blut- (Spur 1, 2, 21, 22), Kot- (Spur 3-7), Urin- (Spur 8-19, 23) und Gewebeprobe (Spur 20, 24). NC = Nullprobe; LM = Längenmarker



verschiedenen Mikrosatellitenloci amplifiziert und damit der weiteren Analyse zugänglich gemacht zu werden.

Neben der geringen DNA-Konzentration ist das Auftreten möglicher Genotypisierungsfehler eine weitere Besonderheit der nicht-invasiv genommenen Proben. Bei diesen Fehlern handelt es sich entweder um das Ausbleiben eines von zwei Allelen eines heterozygoten Tieres (*allelic dropout*) oder um die Detektion eines Allels, das nicht dem zu untersuchenden Individuum zu zuschreiben ist (*false allele detection*) (TABERLET et al. 1999; TABERLET & LUIKART 1999). Auch wenn das Auftreten dieser potentiellen Fehler in der Literatur mit entsprechenden Lösungsvorschlägen diskutiert wird (ebd.; MILLER et al. 2002; MORIN et al. 2001), muss die Häufigkeit dieser Fehler und die Zuverlässigkeit der jeweils eingesetzten Mikrosatellitenloci für jede Studie neu festgestellt werden. Deshalb wurden in einer ersten Untersuchung aus verschiedenen Kotproben, für welche auch eine Referenzprobe des gleichen Individuums vorliegt, fünf verschiedene DNA-Extrakte angefertigt und im Vergleich zu der dazugehörigen Referenzprobe aus Gewebe, Haar oder Speichel genotypisiert (Abb. 3).

Obwohl aus fünf einzelnen DNA-Extrakten ein und derselben Kotprobe ein einheitliches Ergebnis zu erwarten ist, bestätigt die Untersuchung das Auftreten beider Genotypisierungsfehler (Abb. 3.1. A: *false allele*; C: *allelic dropout*).

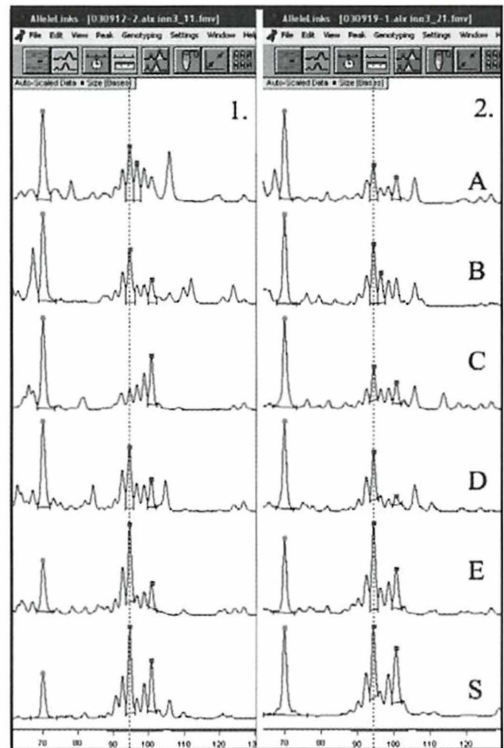


Abb. 3 Wiederholte Genotypisierung (1. und 2.) des Locus CPH 2 an fünf einzelnen DNA-Extrakten (A-E) einer Kotprobe und der dazu gehörigen Speichelprobe (S) eines Wolfes (Canlu Inn 3). Im Lauf 1 ist in Spur A ein falsches Allel und in Spur C das Fehlen eines Allels zu sehen. In Lauf 2 ist in Spur B ein Falschallel.

Auch in der Wiederholung der Analyse wird ein falsches Allel detektiert (Abb. 3.2. B). Als Ursache für solche Fehler kommt zum einen das zufällige Pipettieren nur eines von zwei Allelen eines heterozygoten Individuums in Betracht, wenn DNA-Lösungen sehr schwacher Konzentration zur Analyse vorbereitet werden (TABERLET et al. 1996). Zum anderen kann das Vorkommen von Fremd-DNA (BRADLEY & VIGILANT 2002) bzw. Beute-DNA (MURPHY et al. 2003) die Analysen beeinflussen. Diese Einflussfaktoren entfallen aber für Urinproben, bei denen nur die geringe DNA-Konzentration potentiell zu Genotypisierungsfehlern führen kann.

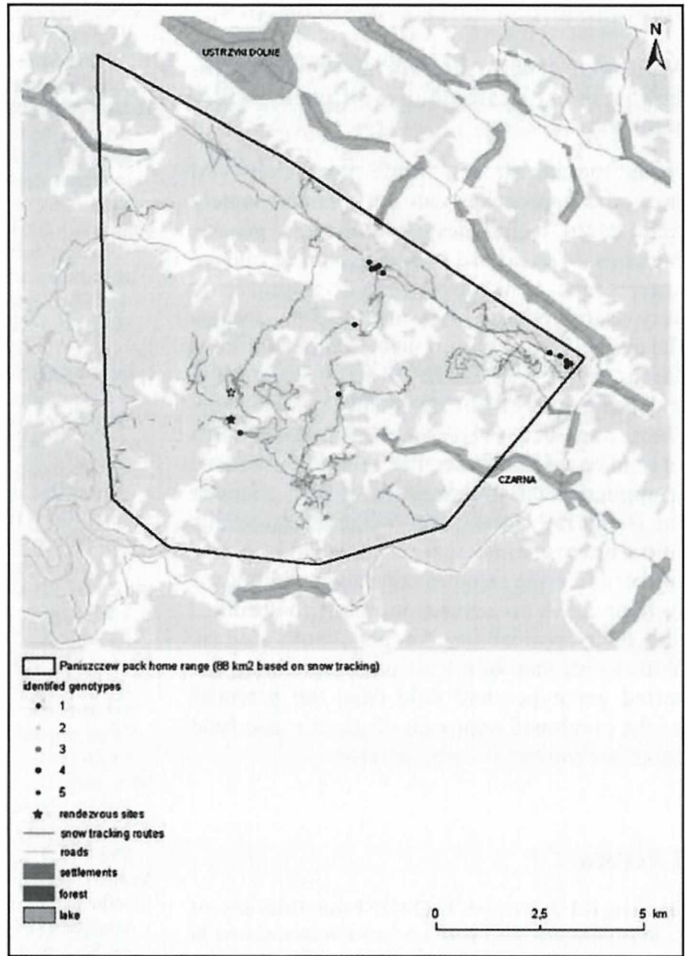
Bleiben solche Fehler in Populationsuntersuchungen unentdeckt, kann dies zu einer Fehlinterpretation der Daten und damit zu einer fehlerhaften Einschätzung der Populationsgröße führen, wie dies CREEL et al. (2003) an Wölfen im Yellowstone Nationalpark zeigen konnten. Im weiteren Verlauf der Studie wird daher die Häufigkeit der Genotypisierungsfehler für alle Mikrosatellitenloci quantifiziert, um mit genauer Kenntnis der Fehlerrate für diese Loci die gesammelten Proben zu untersuchen und damit die Sozialstruktur der Wolfsrudel in Bieszczady zu klären. Darüber hinaus wird die in einer Diplomarbeit etablierte Methode der quantitativen *real time* PCR (GORNÝ 2005), einer PCR, die die Bestimmung der DNA-Konzentration der Kot- und Urinextrakte ermöglicht, in der Hauptstudie angewandt. Durch die Bestimmung der DNA-Konzentration der einzelnen Probenextrakte vor der eigentlichen Analyse können alle diejenigen Proben von der Mikrosatellitenanalyse ausgeschlossen werden, die aufgrund zu geringer DNA-Konzentrationen eine fehlerhafte Bestimmung der Genotypen erwarten lassen (vgl. MORIN et al. 2001).

Für die bisherigen Untersuchungen wurden alle Kot- und Urinproben zwei bzw. dreimal unabhängig von einander an allen Loci genotypisiert. Durch die Wiederholung der Analysen können mögliche Fehler erkannt bzw. gefundene Genotypen bestätigt werden. Mit dieser Vorgehensweise konnten in den bislang 85 analysierten Kot- und Urinproben von 55 Proben alle sechs Mikrosatellitenloci vollständig genotypisiert werden. Vollständig genotypisiert bedeutet in diesem Zusammenhang, dass nur diejenigen Proben gewertet werden, für welche

an allen sechs untersuchten Mikrosatellitenloci zweifelsfrei auswertbare Allele detektiert und in der Wiederholung bestätigt werden konnten. In diesen 55 Proben konnten neun unterschiedliche Individuen bestätigt werden. Als bestätigt werden aber nur solche Genotypen angesehen, die mindestens in zwei verschiedenen Kot- oder Urinproben vorkommen.

Mit den entsprechenden geographischen Koordinaten können die einzelnen Proben mit der Zuordnung zu einem Wolf in einer Karte dargestellt werden (Karte 2). Zusammen mit den Daten des Abfährten leisten die genetischen Untersuchungen einen Beitrag zur Klärung des Raumnutzungsverhaltens der Wölfe im Paniszczew Rudel. Die durch Daten des Abfährten ermittelte nördliche Territorienengrenze konnte durch die genetischen Daten bestätigt werden. Allein aufgrund der genetischen Analysen konnten für dieses Rudel fünf Individuen im Territorium bestätigt werden. Bereits mit diesem auf wenigen Proben basierenden Ergebnis zeichnet sich das große Potential des nicht-invasiven genetischen Monitorings ab. Ohne die Wölfe fangen oder direkt beobachten zu müssen, können die Individuenzahl pro Rudel, deren Streifgebiete (Mindestgröße) bzw. Territorienengrenzen und *rendezvous-sites* bestimmt werden. Im nächsten Schritt werden mit den Daten der Mikrosatellitenanalyse die Verwandtschafts- und Abstammungsverhältnisse der einzelnen Individuen innerhalb der Rudel bzw. zwischen den Rudeln ermittelt. Dadurch lassen sich Erkenntnisse über die Sozialstruktur der ostpolnischen Wolfsrudel im Allgemeinen und der Einfluss der zunehmenden Habitatfragmentierung auf diese Struktur im Speziellen gewinnen.

Die Bedeutung des nicht-invasiven genetischen Monitorings beschränkt sich aber nicht ausschließlich auf die Untersuchung von Wölfen. Im Rahmen weiterer Diplom- und Doktorarbeiten der AG Molecular Ecology and Conservation Genetics werden die an den Wölfen erworbenen Erkenntnisse und Methoden auf die Untersuchung von zwei weiteren Carnivorenarten (Fuchs, Fischotter) und Herbivoren (Gams, Steinbock) übertragen und in Populationsstudien zu diesen Arten angewandt. Dabei reichen die Fragestellungen von der Methodenoptimierung für Wiederkäuerarten bishin zur Ermittlung der Populationsstruktur, der Ausbreitung



Karte 2 Anzahl und räumliche Verbreitung von Kot- und Urinproben, welche fünf unterschiedlichen Wolfsindividuen im Paniszczew Rudel zugeordnet wurden.

und der Populationsdifferenzierung dieser Arten in ländlichen, städtischen Gebieten (Fuchs) sowie in Schutzgebieten (Gams, Steinbock bzw. Fischotter).

Zusammenfassung

Zur Langzeituntersuchung von Wildtierpopulationen können entweder feldökologische Methoden oder molekulargenetische Methoden angewandt werden. Für gefährdete bzw. schwer zu fassende Tierarten eignet sich dabei v.a. die nicht-invasive genetische Probenahme, die sich auf Proben beschränkt, die die Tiere in ihrem Lebensraum hinterlassen (Kot, Urin, Federn,

Haare), und damit unabhängig vom Fang dieser Tiere ist. Im *Bieszczady Wolf Project* wird ein kombinierter Ansatz aus feldökologischen und nicht-invasiven genetischen Methoden zur Untersuchung der Wolfsrudel in den Bieszczady Bergen angewandt. Anhand der ersten Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse werden die Besonderheiten der Kot- und Urinproben im Hinblick auf DNA-Konzentration, analytische Eigenheiten der Proben und deren Eignung zur Untersuchung von Wildtierpopulationen aufgezeigt. Mit der kartographischen Darstellung der ermittelten Genotypen in Verbindung mit den feldökologischen Daten wird das Potential des kombinierten Ansatzes aus genetischen und feldökologischen Methoden verdeutlicht.

Summary

Molecular genetic monitoring of wild populations in the example of wolf packs in Poland.

In the monitoring of wildlife populations two methodic approaches can be applied, namely field based techniques or molecular genetic methods. With regard to endangered or elusive species, the noninvasive genetic approach is very useful, because it is restricted to samples the animals leave within their territory (such as faeces, urine, feathers, hairs) and it is therefore independent from the catch of the animals. In the *Bieszczady Wolf Project* a combined approach of field based and molecular genetic techniques is applied in the investigation of wolf packs in the Bieszczady mountains. With the first results of the microsatellite analysis the characteristics of scat and urine samples are shown with regard to their DNA concentration, analytic specifics and their applicability for population studies. With a GIS map of a wolf pack containing detected genotypes and field data, the potential of the combined approach of genetic and field based techniques is demonstrated.

Literatur

- BRADLEY, B.J. & VIGILANT, L. (2002): False alleles derived from microbial DNA pose a potential source of error in microsatellite genotyping of DNA from faeces. – *Molecular Ecology Notes* 2(4): 602-605.
- CARMICHAEL, L.E. et al. (2001): Prey specialization may influence patterns of gene flow in wolves of the Canadian Northwest. – *Molecular Ecology* 10(12): 2787-2798.
- CREEL, S. et al. (2003): Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. – *Molecular Ecology* 12(7): 2003-2009.
- FORBES, S.H. & BOYD, D.K. (1997): Genetic structure and migration in native and reintroduced Rocky Mountain wolf population. – *Conservation Biology* 11(5): 1226-1234.
- FRANCISCO, L.V. et al. (1996): A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. – *Mammalian Genome* 7(5): 359-362.
- FREDHOLM, M. & WINTERO, A.K. (1995): Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. – *Mammalian Genome* 6(1): 11-18.
- GEFFEN, E.; ANDERSON, M.J. & WAYNE, R.K. (2004): Climate and habitat barriers to dispersal in highly mobile grey wolf. – *Molecular Ecology* 13(8): 2481-2490.
- GORNY, P. (2005): Optimierung und Weiterentwicklung genetischer Analysen auf der Basis nicht-invasiver Proben mit Schwerpunkt Urin. Diplomarbeit, Forstwissenschaftliche Fakultät, TU München.
- HAUSKNECHT, R. (2004): Establishment of molecular genetic methods for the monitoring of animal populations in the example of wolf packs (*Canis lupus*) in Poland. – Master Thesis, Forstwissenschaftliche Fakultät, TU München.
- KÖHN, R. (2004): Genetische Ansätze der Molekularen Ökologie zur Sicherung der Biodiversität. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi für Molekulare Ökologie und Conservation Genetics an der Technischen Universität München.
- LUCCHINI, V.; GALOV, A.; RANDI, E. (2004): Evidence of genetic distinction and long-term population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. – *Molecular Ecology* 13(3): 523-536.
- LUCCHINI, V. et al. (2002): Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. – *Molecular Ecology* 11(5): 857-68.
- MECH, L.D. & HARPER, E.K. (2002): Differential use of a wolf, *Canis lupus*, pack territory edge and core. – *Canadian Field-Naturalist* 116(2): 315-316.
- MILLER, C.R.; JOYCE, P.; WAITS, L.P. (2002): Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. – *Genetics* 160, 357-366.
- MORIN, P.A. et al. (2001): Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). – *Molecular Ecology* 10(7): 1835-1844.
- MONTEIRO, L.; BONNEMAISON, D. et al. (1997): Complex Polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori Model. – *J. Clinical Microbiology* 4: 995-998.
- MURPHY, M.A.; WAITS, L.P.; KENDALL, K.C. (2003): The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*). – *Molecular Ecology* 12(8): 2261-2265.
- PRIMACK, R.B. (1995): Naturschutzbiologie. Heidelberg: Berlin, Oxford: Spektrum, Akademischer Verlag.
- STICKROTH, H. et al. (2003): Konzept für ein naturschutzorientiertes Tierartenmonitoring – am Beispiel der Vogelfauna. – *Angewandte Landschaftsökologie Heft 50. Bundesamt für Naturschutz.*
- STOECKLE, B. (2005): Darstellung der Ausbreitung von Buchdruckerpopulationen (*Ips typographus* L.) in Bayern anhand populationsgenetischer Untersuchungen. Doktorarbeit; Forstwissenschaftliche Fakultät, TU München.
- SUTHERLAND, W.J. (2000): Ecological Census Techniques – a handbook. – Cambridge University Press.
- TABERLET, P., WAITS, L. & LUIKART, G. (1999): Noninvasive genetic sampling: look before you leap. – *Trends in Ecology & Evolution* 14(8): 323-327.
- TABERLET, P. & LUIKART, G. (1999): Non-invasive genetic sampling and individual identification. – *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 41-55.
- THEUERKAUF, J. et al. (2003): Spatiotemporal segregation of wolves from humans in the Bialowieza Forest (Poland). *Journal of Wildlife Management* 67(4): 706-716.

- VALIERE, N. (2002): GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. – *Molecular Ecology Notes* **2**(3): 377-379.
- VILA, C. et al. (2003): Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. – *Proc. R. Soc. Lond.* **270**: 91-97.
- VU, N.T. et al. (1999): Genotyping for DQA1 and PM loci in urine using PCR-based amplification: Effects of sample volume, storage temperature, preservatives, and aging on DNA extraction and typing. – *Forensic Science International* **102**: 23-34.
- WABBAKKEN, P. et al. (2001): The recovery, distribution, and population dynamics of wolves on the Scandinavian peninsula, 1978-1998. *Canadian Journal of Zoology* **79**: 710-725.

Anschriften der Verfasser:

ROLAND HAUSKNECHT
PD Dr. RALPH KÜHN
AG Molecular Ecology and Conservation
Genetics
Fachgebiet für Wildbiologie und Wildtier-
management
Technische Universität München
Am Hochanger 13
D-85354 Freising
E-mail: hausknecht@wzw.tum.de
Kuehn@wzw.tum.de

BARTOSZ PIRGA
Dr. ROMAN GULA
Carpathian Wildlife Research Station
Museum and Institute of Zoology
Polish Academy of Sciences
Belska 24
38-700 Ustrzyki Dolne, Polen
E-mail: rgula@miiz.waw.pl

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Beiträge zur Jagd- und Wildforschung](#)

Jahr/Year: 2005

Band/Volume: [30](#)

Autor(en)/Author(s): Hausknecht Roland, Kühn Ralph, Pirga Bartosz, Gula Roman

Artikel/Article: [Molekulargenetisches Monitoring von Wildtierpopulationen am Beispiel von Wolfsrudeln in Polen 203-211](#)