

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Zoologie

Molekulare Genetik im Artenschutz von Großraubtieren – Eine Fallstudie am Wolf

Roland M. Hausknecht

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Luksch

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. R. Kühn

2. Univ.-Prof. Dr. H. H. D. Meyer

Die Dissertation wurde am 06. 09. 2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 09. 11. 2010 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungen	IV
Danksagung	V
Zusammenfassung	VII
Abstract	IX
1 Einleitung	1
1.1 Artenschutz und Verpflichtung zur wissenschaftlichen Datenerhebung.....	1
1.2 Zielsetzung	2
2 Genetik im Artenschutz.....	3
2.1 Probenahme und Besonderheiten der nicht-invasiven Probenahme	3
2.2 Sequenzanalysen und deren Auswertung	5
2.3 Mikrosatellitenanalyse und deren Auswertung	6
3 Soziobiologie des Wolfes	10
4 Material und Methoden	12
4.1 Probenahme und DNA-Extraktion	12
4.2 Quantifizierung der DNA-Konzentration in nicht-invasiv gewonnenen Proben	13
4.3 Mikrosatelliten-Genotypisierung.....	14
4.4 Sequenz-Analyse	14
4.5 Geschlechtsbestimmung	15
4.6 Statistische Auswertung	15
5 Ergebnisse und Diskussion.....	18
5.1 Probenahme und Optimierung nicht-invasiv genetischer Analysen	18
5.2 Molekular genetische Charakterisierung von Individuen und Populationen	25
5.3 Populationszuordnung und phylogenetische Untersuchungen	29
6 Schlussfolgerung und Perspektiven.....	31
7 Literatur.....	34
Wissenschaftliche Mitteilungen	43
Lebenslauf	45
Anhang	46

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lage der Untersuchungsgebiete in Polen und Ungarn und Anzahl der Proben aus dem jeweiligen Untersuchungsgebiet.....	12
Abb. 2: Zusammenhang zwischen Fehlerraten der einzelnen Mikrosatellitenloci und der DNA-Konzentration von Urinproben. Fehlerkategorie 0 = keine Amplifizierung; Kategorie 1 = nur eine erfolgreiche Amplifizierung oder drei unterschiedliche Genotypisierungsergebnisse; Kategorie 2 = zwei identische Genotypisierungsergebnisse und eine ausgefallene PCR oder ein abweichendes Ergebnis; Kategorie 3 = drei kongruente Ergebnisse (n = Anzahl an Vergleichen je Fehlerkategorie; aus Hausknecht et al. 2007).....	20
Abb. 3: Verteilung nicht-invasiv gesammelter Wolf- (n = 197) und Otterproben (n = 142) entsprechend ihrer Häufigkeit je DNA-Konzentrationsklasse (aus Hausknecht et al. in press).	21
Abb. 4: Abhängigkeit des Amplifikationserfolges (Rauten) bzw. der Rate abweichender Allele (Punkte) von der DNA-Konzentration der entsprechenden Extrakte über alle Loci. Jede/r Raute/Punkt entspricht einem DNA-Extrakt (nur Konzentrationen unter 10 ng / μ L berücksichtigt), welches drei- bis viermal über 6 Mikrosatellitenloci genotypisiert wurde (verändert aus Hausknecht et al. in press).	22
Abb. 5: Anteil erfolgreicher Amplifikationen (Polymerase-Ketten-Reaktion [PCR]) und <i>mismatching alleles</i> dargestellt mit Medianen und entsprechenden Quartilen für alle genotypisierten Wolfsproben, und für die Proben >5 pg/ μ L und >25 pg/ μ L DNA im Extrakt. Minimum- und Maximumwerte sind ebenfalls gezeigt (verändert aus Hausknecht et al. in press).....	23
Abb. 6: Anzahl an Proben und an nach wiederholten Analysen ermittelten Genotypen für alle Wolfs- und Otterproben, sowie für die Proben, deren DNA-Gehalt die Schwellenwerte von 5 pg/ μ L und 25 pg/ μ L im Extrakt überschreiten (aus Hausknecht et al. in press).....	24
Abb. 7: Ermittelte Wolfsgenotypen und ihr Geschlecht zusammen mit dem Jahr ihrer Anwesenheit im Untersuchungsgebiet in Aggtelek. Verwandte Wölfe sind mit durchgezogenen Linien entsprechend der Wahrscheinlichkeitsberechnung mit der PARENTE-Software verbunden (aus Hausknecht et al. 2010).	25
Abb. 8: Räumliche Autokorrelation aufgetragen über 13 Distanzklassen (in km) von 39 Wolfsproben. r = Korrelationskoeffizient; U und L = oberes und unteres Konfidenzintervall (95 %) um die Nullhypothese (H_0 = keine räumliche Struktur genetischer Verwandtschaftsverhältnisse).....	27
Abb. 9: Lage und Zuordnungswahrscheinlichkeit von drei genetischen Gruppen im Untersuchungsgebiet. Die individuelle <i>posterior</i> Zuordnungswahrscheinlichkeit zu einem der drei Cluster (helle Flächen bedeuten Zuordnung zur gleichen Gruppe) ist zusammen mit den wichtigsten Habitatmerkmalen (Hauptstrassen, Städte und Siedlung entlang der Straßen) getrennt für die jeweiligen Cluster gezeigt (a, b, c; aus Gula et al. 2009).	28
Abb. 10: Median-Joining Netzwerk osteuropäischer Wolfs- (<i>Canis lupus</i>) und Hundehaplotypen (<i>Canis familiaris</i>) basierend auf mt-DNA Control Region Sequenzen. GenBank-Referenznummern, Herkunft der Haplotypen und analysierte Haplotypen aus Ungarn (Hun2), Polen (Bes3, Bia4 und Bia8) sowie Slowakei (Sk013). Punktierte Linien fassen Haplotypen-Gruppen entsprechend der Medianvektoren und Mutationsschritte zusammen (aus Hausknecht et al. 2010).	30

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Untersuchte Mikrosatellitenloci für die Gentoypisierung von Wolfsproben, Bereich der Allellängen (pb) und ermittelte Anteile erfolgreicher PCRs, Falschallele (FA), ausgefallener Allele (ADO; bei heterozygoten Loci), sowie mittlere Allelfehlerrate und Standardabweichung. (verändert aus Hausknecht et al. in press). 21

Abkürzungen

A	Adenin
ADO	<i>allelic dropout</i>
BNatSchg	Bundesnaturschutzgesetz
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribnukleotidtriphosphat
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FA	Falschallele
FFH-RL	Flora-Fauna-Habitat-Richtlinie
G	Guanin
H _E	erwartete Heterozygotie
H _O	beobachtete Heterozygoie
mt-DNA	mitochondriale DNA
NJ-Netzwerk	<i>Neighborjoining</i> -Netzwerk
PCR	Polymerasekettenreaktion
qPCR	quantitative real-time PCR
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SNP	<i>Single Nucleotid Polymorphism</i>
T	Thymin
UV	Ultraviolett
U	Unit

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatten.

Zunächst möchte ich mich bei PD Dr. Ralph Kühn für die Themenstellung und für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe bedanken. Ich danke ihm für die lehrreichen Diskussionen und Gespräche, für die Möglichkeit unabhängig und selbstständig die Arbeit voranzubringen und für die Unterstützung bei der Anfertigung der Publikationen.

Außerdem bedanke ich mich bei dem Vorsitzenden der Prüfungskommission Prof. Dr. H. Luksch und bei Prof. Dr. Dr. H.D.D. Meyer für die Übernahme des Koreferates und die Unterstützung bei der Anfertigung der Dissertation.

Ohne die Unterstützung und Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern und Kollegen in Polen und Ungarn sowie in der Arbeitsgruppe „Molekulare Zoologie“ wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Zunächst bedanke ich mich bei Assoc. Prof. Dr. Roman Gula, Polnische Akademie der Wissenschaften, für die enge und freundschaftliche Zusammenarbeit in der gemeinsamen Planung und Untersuchung von Forschungsthemen, für die Bereitstellung der Proben und die lehrreichen Diskussionen. Auch seinen Mitarbeitern M. Barreteau, B. Brzezowska, M. Diemert, S. Drevet, J. Eggermann, M. Januszczak, M. Le Peutrec, L. Lichtenberg, K. Meyer, B. Pirga, S. Rouys, N. Schmidt, Assoc. Prof. Dr. J. Theuerkauf und H. Tsunoda sei gedankt. Auch bei Ádám Szabó, Gábor Firmánszky und Gy. Gadó von der „Foundation for Large Carnivores in Hungary“ bedanke ich mich für die Zusammenarbeit in der Untersuchung der Aggtelek-Wölfe.

Nur durch die Zusammenarbeit und Unterstützung durch meine Kollegen im Labor und meine Diplomanden konnte ich die nicht-invasiv genetischen Untersuchungen verschiedener Tierarten und deren Methodik in dieser Form etablieren, und konnte gleichzeitig die Forschung an Wolfs- und Habichtskauzvorkommen in Europa durchführen. Im Labor haben mir Nadine Bernhard, Gaby Schwabedissen, Christine Seidl, Elke Siegl und Birgit Suppan großartig geholfen. Aus der Zusammenarbeit mit unseren Diplomanden Petra Gorny, Helmut Hiller, Eike Müller und Kristina Salzer habe ich sehr viel gelernt und wir haben gemeinsam interessante Untersuchungsergebnisse erarbeitet. Ebenso bedanke ich mich bei Ursula Kühn für die Durchsicht der Manuskripte – gerade auch wenn die Zeit wieder knapp geworden ist, hat sie uns trotzdem gerne geholfen.

Ich bin auch den Freunden und Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe und des ehemaligen Fachbereichs für Wildbiologie dankbar für die gemeinsamen Jahre, die freundschaftliche Zusammenarbeit und lehrreichen Gespräche. Ein großes Danke an Helmut Bayerl, Prof. Dr. Jürgen Geist, Christine Gerschlager, Dr. Bernhard Gum, Christof Janko, Tatiana Käser, Dr. Andreas König, Maren Laube, Christian Ludt, Ivan Nikolov, Stefanie Pietsch, Prof. Dr. Wolf Schröder, Vjerena Wagner und Dorle Zanantonio. Außerdem bedanke ich mich bei Silke und Ted Migdall für die Durchsicht des Abstracts sowie Prof. Dr. Jürgen Geist und Bernhard Stoeckle für die Durchsicht einer früheren Version des Manuskriptes.

Vor allem möchte ich Bernhard Stoeckle ganz herzlich für die tiefe Freundschaft und die gemeinsamen Jahre im Labor und Büro danken. Danke, dass Du alle Wendungen meiner Arbeit miterlebt und mitgetragen hast, und mich immer dann bestärkt hast, wenn es scheinbar nicht mehr weiter ging.

Schließlich danke ich meiner Frau Britta von ganzem Herzen, dass sie das Gelingen meiner Arbeit, sowie deren Höhen und Tiefen begleitet hat und mich immer bestärkt und unterstützt hat. Gerade in den letzten Wochen und Monaten hast Du mir großen Rückhalt und Freiheiten gegeben, und mich immer wieder darin bestärkt diese Arbeit unter den derart veränderten Bedingungen zum Ende zu bringen. Ich danke Dir!

Zusammenfassung

Die drei Großraubtierarten Wolf, Luchs und Braunbär sind nach starken Rückgängen ihrer Populationsgrößen seit den 1980er Jahren international unter Schutz gestellt. Vor allem die Flora-Fauna-Habitat-Richtlinie regelt für die Europäische Gemeinschaft den Schutz von Tier- und Pflanzenarten und deren Lebensraum, und verpflichtet die Vertragsstaaten zu fortlaufenden Untersuchungen des Erhaltungszustandes der genannten Arten und zu einem regelmäßigen Berichtswesen. Zur Erhebung der dazu notwendigen Populationsinformationen können sowohl feldökologische wie auch molekulargenetische Methoden eingesetzt werden.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, den Informationsbeitrag molekulargenetischer Untersuchungen zum Schutz von Großraubtieren am Beispiel des Wolfes darzustellen. Dazu werden zunächst methodische Aspekte der nicht-invasiv genetischen Probenahme betrachtet. Anhand von Proben aus einem polnischen Untersuchungsgebiet wird einerseits die Eignung von Urin im Schnee zur großräumigen genetischen Untersuchung von Wolfsrudeln dargestellt. Andererseits wurde mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR eine Methode entwickelt entsprechend der DNA-Gehalte nicht-invasiv gewonnener Losungs- und Urinproben deren Eignung für weitere Analysen zu prüfen. Damit können die nicht-invasiv genetischen Untersuchungen frei lebender Wolfsrudel angesichts ihrer spezifischen analytischen Herausforderungen kosten- und zeiteffizienter gestaltet werden.

Über den rein methodischen Aspekt hinaus wird anhand von Gewebe- und Blutproben aus Polen, sowie von nicht-invasiv gewonnenen Proben aus Ungarn dargestellt, welche Informationen genetische Untersuchungen zum Artenschutz liefern können. Im ungarischen Untersuchungsgebiet konnten durch nicht-invasiv genetische Analysen erstmals wissenschaftliche Informationen zur Anzahl an Wolfsindividuen, ihrer genetischen Verwandtschaft und ihrer wahrscheinlichsten Zugehörigkeit zu anderen osteuropäischen Populationen ermittelt werden. Im polnischen Untersuchungsgebiet konnte anhand von Blut- und Gewebeproben gezeigt werden, dass noch keine Zerteilung der Population nachweisbar ist und damit die natürliche Ausbreitung von Wölfen trotz der zunehmenden Habitatzersiedlung noch möglich ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die abschließende Diskussion zeigen, dass molekulargenetische Untersuchungen an Großraubtieren Erkenntnisse liefern, welche bei Anwendung von feldökologischen Methoden nur unter sehr großem Aufwand oder

z.T. gar nicht erhoben werden können. Genetische Methoden können dabei auch hervorragend für Fragestellungen anderer Disziplinen eingesetzt werden und leisten so einen Beitrag zur umfassenden Einschätzung von Populationsparametern, Gefährdungen und Schutzwürdigkeiten der Vorkommen von Großraubtierarten.

Abstract

Additional to many animal and plant species the large carnivore species wolf, lynx and bear were internationally protected since the 1980ies. The Habitats Directive especially describes the regulations for protection of animal and plant species and commits the signatories to continuous monitoring of the conservation status of the listed species as well as to regular reporting of conservation efforts and statuses. The requested population information can either be collected with field based or molecular genetic approaches.

The objective of this study is to describe the information necessary for conservation of large carnivores that could be obtained from molecular genetic analysis from the examples of wild wolves. One focus of the work lies on the genetic analyses of non-invasively collected samples. Based on samples from a study site in Poland the applicability of wolf urine samples collected in snow is examined to carry out a large-scale genetic survey on wolf packs. In addition, the quantification of DNA-contents of non-invasively collected samples was established with the use of quantitative real-time PCR. Based on this DNA quantification samples can be evaluated regarding their suitability for subsequent genetic analysis. With respect to their inherent challenges, it is shown that non-invasive genetic analyses of free ranging wolves can be carried out more cost and time efficient after samples were selected according to their DNA contents.

Beyond the methodological aspects this study focuses on population information necessary for carnivore conservation that can be gained from genetic analyses of wolf samples from Poland and Hungary. Applying of non-invasive genetic analyses of wolf samples scientific data on the number of individuals, their genetic relationship and their most likely origin from East European wolf populations could be determined for the first time in Hungary. Based on the analyses of blood and tissue samples from the Polish study area, it could be shown that the natural dispersal behaviour of wolves is not yet restricted by habitat fragmentation in this area and a subdivision of these wolves was not yet detected by genetic analyses.

The results of this study and the final conclusion show that molecular genetic analyses support data obtained from field based monitoring methods and provide additional information on wild wolves. Molecular genetic methods can also be used to analyse research questions of other scientific disciplines and contribute to a comprehensive understanding of population parameters, trends and conservation needs in occurrences of large carnivores.

1 Einleitung

1.1 Artenschutz und Verpflichtung zur wissenschaftlichen Datenerhebung

Die drei in Europa vorkommenden Großraubtierarten, Wolf, Luchs und Bär, sind durch nationale wie internationale Gesetze und Konventionen geschützt. International führt u.a. die Berner Konvention (82/72/EWG) diese drei Arten als geschützte Arten (Anhänge II und III) und fordert zur internationalen Zusammenarbeit der Vertragsstaaten bei Schutzbemühungen für die gelisteten Arten auf. Ebenso unterliegen die Arten durch die „Richtlinie zur Erhaltung der natürlichen Lebensräume sowie der wildlebenden Tiere und Pflanzen“, kurz FFH - Richtlinie (92/43/EWG), einem strengen Schutz (Anhänge II und IV). Im Bundesnaturschutzgesetz wird die FFH-Richtlinie in nationales Gesetz zum Schutz der biologischen Vielfalt sowie der Leistungs- und Funktionsfähigkeit des Naturhaushalts umgesetzt (BNatSchG 29. Juli 2009). Dabei kommt dem ‚günstigen Erhaltungszustand der natürlichen Lebensräume und wildlebenden Tier- und Pflanzenarten‘ (FFH-Richtlinie Artikel 1 i); 2 (2)), wie von Linnell et al. (2008) für Großräuber präzisiert, besondere Bedeutung zu. Die Realisierung von (Arten-) Schutzbemühungen im Sinne der FFH-Richtlinie kann allerdings nur dadurch erfolgen, dass für das geforderte Berichtswesen und die Durchführung konkreter Schutzmaßnahmen die wichtigsten Populationsparameter der betreffenden Tierart bekannt sind und fortlaufend überwacht werden (siehe dazu ‚Leitfaden zum strengen Schutzsystem für Tierarten von gemeinschaftlichem Interesse im Rahmen der FFH-Richtlinie 92/43/EWG 2007‘). Diese Populationsparameter beinhalten u.a. Vorkommen, Biologie, Ökologie, langfristige Überlebensaussichten, Erhaltungsbedarf und Populationsdynamik der betreffenden Art. Zu deren Erhebung gibt es eine ganze Reihe von Methoden mit unterschiedlicher Intensität an Feldarbeit und Datenqualität (Linnell et al. 1998). Obwohl viele der dort genannten feldökologischen Methoden eine gute Datengrundlage liefern, ist der Nachweis der kontinuierlichen, reproduktiven Anwesenheit von Tierarten, ihr Erhaltungsbedarf oder ihrer Populationsdynamik nur bedingt möglich. Um den Verpflichtungen aus der FFH-Richtlinie hinsichtlich der Schutzbemühungen und des Berichtswesens in Deutschland nachzukommen, wurde im Auftrag des Bundesamtes für Naturschutz ein Fachkonzept für Management- und Erhaltungsmaßnahmen für den Wolf erarbeitet (Reinhardt und Kluth 2007). Ergänzend dazu wurden zuletzt Empfehlungen zur bundesweiten Überwachung aller drei Großraubtierarten nach EU-Vorgaben zur Sicherstellung der Qualität und Vergleichbarkeit erhobener Daten gegeben (Kaczensky et

al. 2009). In beiden Berichten wird die Anwendung molekulargenetischer Methoden zur Untersuchung von Großraubtiervorkommen gefordert.

1.2 Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit besteht in der Darstellung der Daten und Populationsinformationen, welche molekulargenetische Untersuchungen an frei lebenden Wölfen (*Canis lupus*) in Polen und Ungarn für den Artenschutz liefern können.

Im Einzelnen wird untersucht, ob die Verwendung von Wolfsurin im Schnee eine geeignete Möglichkeit darstellt, das Repertoire an nicht-invasiv gewonnenen Proben für genetische Analysen auszuweiten. Des Weiteren soll die genetische Analytik nicht-invasiv gewonnener Wolfsproben vor dem Hintergrund der unten dargestellten Herausforderungen optimiert werden. Dabei geht es vor allem darum, zu untersuchen, wie die Effizienz der Analysen und die Qualität der ermittelten Daten durch eine Selektion von Proben gesteigert werden können. Diese Selektion basiert dabei auf der Anwendung der qPCR und dem Ausschluss von Proben, welche einen spezifischen DNA-Gehalt nicht überschreiten.

Über die methodische Betrachtung genetischer Analysen hinaus, wird dargestellt, welche Daten durch genetische Untersuchungen frei lebender Wolfsvorkommen erhoben werden können und welchen Informationsgehalt sie für den Artenschutz haben. Dafür werden zwei unterschiedliche Fragestellungen in den Untersuchungsgebieten in Polen und Ungarn betrachtet. Im polnischen Untersuchungsgebiet wird untersucht, in wie weit die natürliche Ausbreitung von Wölfen durch eine zunehmende Zersiedlung der Landschaft beeinflusst und damit der Populationszusammenhang gefährdet wird. Im ungarischen Untersuchungsgebiet zielen die genetischen Untersuchungen dahingegen auf die Bestätigung und Charakterisierung des dortigen Wolfsvorkommens ab.

In der abschließenden Betrachtung werden weitere Untersuchungsmöglichkeiten und Fragestellungen, sowie die Optimierung der Datenerhebung im Artenschutz durch Integration verschiedener Arbeitsfelder des Naturschutzes diskutiert.

2 Genetik im Artenschutz

Die Naturschutzgenetik (*Conservation genetics*) kombiniert als Teilbereich der Naturschutzbiologie unterschiedliche genetische Disziplinen, wie z.B. molekulare Genetik, quantitative Genetik oder Populations- und Evolutionsgenetik, und zielt zusammen mit anderen Arbeitsbereichen des Naturschutzes, wie z.B. Populationsbiologie, Insel-Biogeographie oder Ökologie, auf die Sicherung der Biodiversität. Im Speziellen konzentriert sich die Naturschutzgenetik auf die Untersuchung genetischer Faktoren, die zum Aussterberisiko von Arten oder Populationen beitragen und auf genetisch basierte Managementstrategien, die solche Risiken minimieren (Frankham et al. 2002; Kühn 2004).

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über Methoden der Naturschutzgenetik gegeben.

2.1 Probenahme und Besonderheiten der nicht-invasiven Probenahme

Für genetische Untersuchungen lassen sich drei Formen der Probenahme unterscheiden (Taberlet et al. 1999). Bei der destruktiven Probenahme werden die entsprechenden Untersuchungstiere getötet, um Probenmaterial für genetische Analysen zu gewinnen. Für nichtgefährdete Insektenarten ist diese Probenahme geeignet (Stoeckle et al. 2010).

Die nicht-destruktive Probenahme erfolgt meist durch die Entnahme von Gewebe-, Haar-, Feder- oder Blutproben von zuvor gefangenen Untersuchungstieren (Taberlet et al. 1999). Obwohl diese Probenahme die Gewinnung von Proben guter Qualität ermöglicht, erfordert sie meist den Fang und ggf. die Immobilisation der Untersuchungstiere. In Abhängigkeit von der Lebensweise der betroffenen Tierart, ihrer Fangbarkeit und ihres Gefährdungsgrades ist diese Probenahme schwierig und aufwendig.

Die nicht-invasive Probenahme stützt sich dagegen auf Proben, die die zu untersuchenden Tiere in ihrem Lebensraum hinterlassen und die ohne irgendeine Störung, Beeinflussung oder den Fang der Tiere gesammelt werden können. Als nicht-invasiv gesammelte Proben werden daher Losungs- und Urinproben, Mauserfedern, Häutungen von Reptilien oder Haare aus Haarfallen genutzt (Beja-Pereira et al. 2009).

Nicht-invasiv gewonnene Proben stellen aber aufgrund ihrer geringen DNA-Qualität und -Quantität große Anforderungen an analytische Methoden. So weisen diese Proben meist eine geringe Anzahl an körpereigenen Epithelzellen auf, aus denen nur eine geringe DNA-Menge für nachfolgende Analysen extrahiert werden kann (Hausknecht et al. 2009).

Außerdem wirken sich die Art der aufgenommenen Nahrung bzw. deren Bestandteile (Murphy et al. 2003; Maudet et al. 2004; Fernando et al. 2003) und das Vorkommen von Bakterien-DNA in Losung (Bradley und Vigilant 2002) negativ auf das Verhältnis der DNA-Konzentration zwischen der Zieltierart und der mitextrahierten Fremd-DNA aus. Ebenso können sich PCR-Inhibitoren, sprich Moleküle, die aus Nahrungsresten in der Losung extrahiert werden und die nachfolgende enzymatischen Reaktionen der PCR inhibieren, erschwerend auswirken (Monteiro et al. 1997). Darüber hinaus führen UV-Strahlung, hohe Temperatur und Feuchtigkeit (Nsubuga et al. 2004; Sanitini et al. 2007; Lucchini et al. 2002) zur verstärkten DNA-Degradation der Proben im Freiland, bis diese endgültig archiviert werden. Zuletzt kann sich auch die Dauer der Probenlagerung nachteilig auf die DNA-Konzentration der nicht-invasiv gewonnenen Proben auswirken (Santini et al. 2007; Hájková et al. 2006).

Bei den nachfolgenden Analysen kann der geringe DNA-Gehalt zum Ausfall der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) an einzelnen Genorten (Taberlet et al. 1999) und zum Auftreten von Genotypisierungsfehlern führen. Diese können als *allelic dropout*, dem Ausfall eines von zwei Allelen eines heterozygoten Genortes, oder als Falschallel (*false allele*), der Detektion eines zusätzlichen, eigentlich nicht vorhandenen Allels, auftreten (Taberlet et al. 1999). Auch die Geschlechtsbestimmung von nicht-invasiv gewonnenen Proben kann fehlerhaft werden, wenn mitextrahierte DNA eines Beutetieres das eigentliche Geschlecht des zu untersuchendes Tieres in der Analyse verschleiert (Murphy et al. 2003).

Bleiben diese Fehlerquellen unberücksichtigt, können sie zur Überschätzung der Populationsgröße (Creel et al. 2003; Waits und Leberg 2000), falschen Einschätzung der Abstammungs- oder Geschlechterverhältnisse führen (Diskussion dazu in Pompanon et al. 2005). Daher erfordern nicht-invasiv genetische Studien Maßnahmen und Strategien zur Erkennung und Vermeidung solcher Fehler. Zunächst werden intensive Vorstudien zur Etablierung der DNA-Extraktion, der genetischen Marker und deren Genotypisierung empfohlen (Taberlet und Luikart 1999; Valière et al. 2007). Für die Analysen selbst werden verschiedene methodische Herangehensweisen vorgeschlagen (siehe Beja-Pereira et al. 2009) von denen der *multiple-tube*-Ansatz, sprich die mehrfach wiederholte Analyse aller Proben an den jeweils zu untersuchenden Genorten (Taberlet et al. 1996), ein weit verbreiteter Ansatz ist.

Neben den oben beschriebenen Arten der Probenahme von rezenten Tierarten, stellen in Museen archivierte Tierexponate und fossile Proben eine weitere wichtige DNA-Quelle dar. Die genetische Untersuchung dieser „antiken“ DNA ermöglicht die Gegenüberstellung der historischen genetischen Diversität mit der heutigen, die Ermittlung der genetischen Beziehungen ausgestorbener Arten mit ihren zeitgenössischen Verwandten oder deren Populationsgeschichte und Phylogeographie (Hofreiter et al. 2001; Pääbo et al. 2004; Wandeler et al. 2007). Wegen ihrer Behandlung zur Archivierung in naturkundlichen Sammlungen, ihres hohen Alters bzw. ihrer Lagerung unter ungünstigen Bedingungen im Falle von fossilen Proben, ist die DNA jedoch verschiedenen Abbau- und Umwandlungsprozessen ausgesetzt (Pääbo et al. 2004). Neben der damit einhergehenden DNA-Degradation besteht die Gefahr der Kontamination mit zeitgenössischer DNA oder Fremd-DNA. Diese Faktoren erschweren die Analyse solcher Proben oder können ebenfalls zu o.g. Genotypisierungsfehlern führen und erfordern daher zur Sicherung der Datenqualität strikte Standards vor allem in der Laboranalytik aber auch in der Auswertung der genetischen Daten (Pääbo et al. 2004; Wandeler et al. 2007).

2.2 Sequenzanalysen und deren Auswertung

Die Sequenz-Analysen haben die Darstellung der Nukleotidabfolgen bestimmter DNA-Abschnitte und damit die Ermittlung der Nukleotidvariationen dieser Abschnitte zwischen verschiedenen Arten, Unterarten oder Populationen einer Tierart zum Ziel. Vor allem in der molekularen Phylogenetik und Phylogeographie werden Sequenzdaten zur Untersuchung stammesgeschichtlicher Zusammenhänge herangezogen (Knoop und Müller 2009).

Neben der seit den 1970er Jahren etablierten Strang-Abbruch-Methode nach Sanger hat sich in jüngster Zeit die Pyrosequenzierung bzw. *next-generation sequencing* etabliert (Knoop und Müller 2009). Bei der Strang-Abbruch-Methode werden während der Neusynthese eines DNA-Stranges neben den notwendigen Desoxynukleotiden nach dem Zufallsprinzip auch Didesoxynukleotide (Stopp-Nukleotide) in den neuen Strang eingebaut. Infolge dessen bricht an dieser Stelle die weitere DNA-Synthese des neuen Stranges ab. Dadurch entsteht eine Menge unterschiedlich großer Moleküle, welche mit dem Kettenabbruch die Position wiedergeben, an der das entsprechende Nukleotid im Ablesestrang vertreten ist. Durch eine abschließende elektrophoretische Auftrennung der Sequenzbruchstücke, kann die Nukleotidabfolge der Ausgangssequenz ermittelt werden.

Bei den moderneren Sequenzierungstechniken werden nicht mehr die Produkte der Sequenzierreaktion untersucht. Stattdessen wird direkt der Einbau der einzelnen Nukleotide in den neuen DNA-Strang während der DNA-Synthese durch ein dabei freiwerdendes Lichtsignal detektiert (Knoop und Müller 2009). Obwohl nur kürzere Leseweiten als bei der Strangabbruchmethode erreicht werden (200-300 bp gegenüber >1000 bp), wird dieses Verfahrens wegen seiner höheren Sequenziergeschwindigkeit und der großen Zahl ermittelter Sequenzen zunehmend eingesetzt.

Die auf Nukleotidsequenzen basierenden phylogenetischen Untersuchungen erfolgen dann entweder über die Berechnung evolutionärer Distanzen zwischen den Taxa und ihrer Darstellung in einem Abstammungsbaum oder über so genannten Baumsuchverfahren. Dabei werden unter Berücksichtigung verschiedener Modelle der Sequenzevolution Stammbäume getestet und jene mit der größten statistischen Verlässlichkeit dargestellt (Kühn 2004; Knoop und Müller 2009). Auch Bayesische Berechnungsmodelle zur Bestimmung von Phylogenien können angewandt werden (Holder und Lewis 2003).

Die Rekonstruktion von Abstammungsverhältnissen auf Populationsebene ist bei o.g. Verfahren problematisch, da hier aufgrund von sexueller Fortpflanzung, geringeren Mutationshäufigkeit bzw. von Rekombination die Verhältnisse zwischen Individuen nicht hierarchisch sind (Posada und Crandall 2001). Phylogenetische Netzwerke eignen sich daher für Populationen besser, da alternative evolutionäre Wege über Schleifen dargestellt alle Mutationsschritte zwischen verschiedenen Sequenzabschnitten berücksichtigen. Das Programm NETWORK 4.5.1.0 (Fluxus Technology Ltd. 2009; nach Bandelt et al. 1999) dient der Ermittlung phylogenetischer Beziehungen innerhalb von Populationen.

Neben phylogenetischen Fragestellungen kann die genetische Variabilität von Populationen auch über Nukleotidvariationen von Sequenzabschnitten dargestellt werden. Die genetische Variabilität von Nukleotidsequenzen kann dabei entweder über die Anzahl polymorpher Sequenzen, über die Anzahl an Nukleotidsubstitutionen oder über die Nukleotiddiversität ermittelt werden (Kühn 2004).

2.3 Mikrosatellitenanalyse und deren Auswertung

Mikrosatelliten haben sich als wichtige genetische Marker zur Unterscheidung von Individuen und Populationen etabliert. Es handelt sich dabei um DNA-Abschnitte mit einfachen, sich wiederholenden Motiven, wie z.B. (GT)_n oder (GA)_n, welche 10 bis 50mal

wiederholt werden. Sie sind im gesamten Genom verteilt und zeigen, wie von Scribner und Pearce (2000) zusammengefasst, unterschiedliche Motivlängen, wodurch sich Individuen von einander unterscheiden lassen. Mikrosatelliten weisen hohe Mutationsraten auf (10^{-2} bis 10^{-5}) und sind meist in Längen zwischen 100 und 300 bp für viele verschiedene Tierarten etabliert. In jüngster Zeit werden auch zunehmend *single nucleotide polymorphism* (SNP)-Analysen zur Individuenunterscheidung oder zur Ermittlung quantitativer Merkmale eingesetzt (Slate et al. 2009).

Zur Untersuchung phylogenetischer Fragestellungen mit Mikrosatelliten-Daten werden ausgehend von zuvor angenommen Modellen der DNA-Mutation die genetische Distanzen zwischen den untersuchten Taxa berechnet und mit graphischen Abbildungsverfahren dargestellt (Diskussion in Kühn 2004).

Wegen ihrer großen Polymorphien eignen sich Mikrosatellitenanalysen besonders für populationsgenetische Untersuchungen. Die Variabilität von Populationen kann so über die Allelzahl, die Allelfrequenz, den Heterozygotiegrad oder über die *allelic richness*, ein standardisiertes Maß für die Allelzahl, festgestellt werden (Frankham et al. 2002; El Mousadik und Petit 1996).

Bedingt durch das Unterbleiben der Panmixie (z.B. durch *isolation-by-distance*) oder durch Ausbreitungsbarrieren kann der Genfluss innerhalb einer Population einer Tierart unterbunden werden, was zu einer genetischen Strukturierung der Population führt. Diese Strukturierung der Gesamtpopulation in verschiedene Teilpopulationen kann zum Verlust genetischer Diversität infolge von Drift und/oder von Inzucht innerhalb der Teilpopulationen führen (Frankham et al. 2002).

Hinweise über eine Untergliederung einer Population in Subpopulationen lassen sich über traditionelle populationsgenetische Parameter, wie z.B. die Heterozygotie (Vergleich von H_O mit H_E), über die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (infolge von Heterozygotendefizit oder -überschuss) oder über Fixationsindices erheben (Frankham et al. 2002; Hedrick 2005).

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Populationsuntergliederung besteht in der Anwendung individuenbasierter Programme, welche auf der Basis von Multilocus-Genotypen eine Zuordnung von Individuen zu genetisch ähnlichen Gruppen ermöglichen. Im Gegensatz zu den o.g. traditionellen populationsgenetischen Parametern, benötigen diese Programme keine *a priori* Definition von Populationen, denn viele natürliche

Populationen sind ohnehin nicht in räumlich klar abgegrenzte Populationen untergliedert (Schwartz und McKelvey 2008). Stattdessen kann mit Hilfe verschiedener Gruppierungsstatistiken (*Clustering-*) die optimale Anzahl genetischer Gruppen (*Cluster*) bestimmt und die Individuen oder Anteile ihrer Genotypen entsprechend der Wahrscheinlichkeitsverteilung den geeigneten Populationen oder genetischen Gruppen zu geordnet werden. Diese Clustering-Methoden eignen sich v.a. wenn genetische Daten von keiner bzw. nicht von allen potentiellen Ausgangspopulationen verfügbar sind oder Populationsgrenzen nicht klar definiert werden können (Manel et al. 2005). Wichtige biologische Fragen, wie solche nach der Individuenherkunft, der Populationsstruktur, genetische *mixture-* und *admixture-*Analysen oder Hybridisierungen, können mit diesen Methoden bearbeitet werden (ebd.). Je nach spezieller Fragestellung können unterschiedliche Cluster-Methoden angewandt werden (siehe Excoffier und Heckel 2006).

Diese Strukturierung von Populationen kann allerdings durch das Auftreten von Genfluss, also dem genetischen Austausch bedingt durch Bewegungen von Individuen zwischen Teilpopulationen (Hedrick 2005), reduziert werden. Gerade für kleine, isolierte Teilpopulationen ist der genetische Austausch von großer Bedeutung, um die Folgen von Inzucht zu verringern (Frankham et al. 2002). Der Genfluss zwischen Populationen kann mit indirekten Methoden, wie der F-Statistik (Hedrick 2005), mit Klassifikationsmethoden, also Methoden, welche Individuen zu vordefinierten Kategorien zu ordnen oder mit Clustering-Methoden ermittelt werden (Manel et al. 2005). Gerade die Clustering-Methoden erfordern keine *a priori* Definition von Populationen und ordnen Individuen genetisch ihren Herkunftspopulationen zu (z.B. in Riley et al. 2006).

Ein neuer Ansatz zur Darstellung der genetischen Populationsstruktur besteht in der Anwendung der *landscape genetics* (Manel et al. 2003) als Kombination von Landschaftsökologie und Populationsgenetik. Durch die Analyse geographischer und genetischer Daten ohne vorherige Definition diskreter Populationen kann untersucht werden, wie Landschafts- oder Umweltmerkmale die genetische Variation auf Populations- und Individuenebene strukturieren. Über die bloße Nutzung von geographischen Koordinaten sollten aber zusätzlich die Effekte der Landschaftszusammensetzung durch gesonderte räumlich-geographischer Untersuchungen quantifiziert werden (Storfer et al. 2007; Holderegger und Wagner 2008).

Als statistische Methoden zur Auswertung von geographischen und genetischen Zusammenhängen eignen sich (1) der Mantel-Test, (2) die räumliche Autokorrelation oder

(3) die Bayesischen Clusteringmethoden. Während beim Mantel-Test lediglich paarweise genetische und geographische Distanzmatrizen von Individuen korreliert werden (Mantel 1967), wird die genetisch-räumliche Struktur einer Population bei der *spatial autocorrelation* mit Hilfe des Autokorrelationskoeffizienten dargestellt (Smouse und Peakall 1999). Dieser gilt als Maß für die genetische Ähnlichkeit von Individuen deren geographische Entfernung zu einander in eine bestimmte geographische Distanzklasse fällt (Double et al. 2005). Beide Berechnungen können mit z.B. mit der GENALEX-Software (Peakall und Smouse 2005) durchgeführt werden. Bayesischen-Methoden, wie z.B. GENELAND (Guillot et al. 2005a; 2005b; Guillot et al. 2008; Guillot 2008), beziehen geographische Daten in die Analyse ein und ordnen so Individuen oder Anteile ihres Genoms bestimmten genetischen Gruppen entsprechend ihrer geographischen Lage zu.

3 Soziobiologie des Wolfes

Der Wolf *Canis lupus* ist der größte Vertreter der Familie der Hundeartigen (Canidae) und gehört mit dem Luchs und Bär zu den bedeutendsten Mitgliedern der Ordnung der Raubtiere (Carnivora) in der nördlichen Hemisphäre. Die ursprüngliche Verbreitung des Wolfes erstreckte sich in historischer Zeit über alle Habitate nördlich des 20. Breitengrades nördlich von Mexiko, Saudi-Arabien bzw. Indien bis in die Polarregion (Fuller et al. 2003). Dabei besiedelten die Wölfe so unterschiedliche Lebensräume, wie nördliche Tundren, unterschiedliche Waldtypen Nordamerikas und Eurasiens, Steppen, Wüsten oder Hochgebirgsregionen (Fuller et al. 2003; Okarma und Langwald 2002). Die Voraussetzung für das Vorkommen von Wölfen ist vor allem ein ausreichend großes Angebot an Beutetieren. Der Wolf weist dabei eine große Flexibilität in seinem Nahrungsverhalten auf und nutzt die im jeweiligen Gebiet dominante Beute, wenn sie groß genug ist, häufig genug vorkommt und ausreichend leicht zu erwerben ist (Peterson und Ciucci 2003). Entsprechend der lokalen Gegebenheiten ernähren sich die Wölfe vor allem von wildlebenden Huftierarten (Cerviden, Boviden oder Suiden), aber auch von kleinen Beutearten, wie z.B. Hasen, Bibern o.ä., von menschlichen Abfällen oder in stark unterschiedlichem Ausmaß von Hausvieh (Peterson und Ciucci 2003; Stubbe 2008).

Im Laufe des 18 und 19. Jahrhunderts erfolgte ein massiver Bestandes- und Arealrückgang des Wolfes in Folge einer rücksichtslosen Verfolgung bis hin zur regionalen Ausrottung in weiten Teilen Nordamerikas, Europas und Russlands (Fritts et al. 2003; Stubbe 2008). Die geringste Ausbreitung des Wolfes war in den 1940er bis 1960er Jahren zu verzeichnen (Salvatori & Linnell 2005). In Folge der allmählichen Unterschutzstellung des Wolfes in verschiedenen Ländern, sowie der Sensibilisierung der Bevölkerung bzw. ihrer veränderten Einstellung gegenüber Wölfen konnte sich der Wolf in vielen Gebieten eigenständig ausbreiten (Boitani 2003). Die zügige Wiederbesiedlung vieler Gebiete war dabei nur aufgrund der großen Mobilität der Wölfe möglich. Sie zeigen eine beachtliche Ausbreitungsfähigkeit, indem sie ausgehend vom eigenen Rudel teils mehrtägige Exkursionen unternehmen oder ohne vorherige Ausflüge weiträumige Wanderungen über hunderte von Kilometern unternehmen, um neue Territorien zu erkunden oder zu etablieren (Mech und Boitani 2003). So erfolgte z.B. die Wiederbesiedlung der französischen Alpen und der Schweiz, sowie der skandinavischen Halbinsel durch einzelne weit wandernde Wölfe (Vilà et al. 2003a; Valière et al. 2003).

Die Wölfe leben in Rudeln deren Kern im Wesentlichen der Familienverband aus den sich paarenden Altwölfen und deren Nachkommen ist (Mech und Boitani 2003). Die Nachkommen können einige Jahre im elterlichen Rudel integriert sein, verlassen aber meist im Alter von 11 bis 24 Monaten das Rudel. Sie suchen dabei nach einem Paarungspartner und der Möglichkeit ein eigenes Territorium zu etablieren. Die Territorien können sich dabei in der Nachbarschaft des elterlichen Rudels, in davon weit entfernten, entlegenen Gebieten befinden oder sich auch an anthropogenen Habitatmerkmalen orientieren (ebd.). Voraussetzung ist, dass das neue Territorium im Jahresverlauf ein ausreichend großes Beutetierangebot aufweist. Dies kann auch dazu führen, dass manche Wolfsrudel, wie z.B. in Nordkanada migrierenden Beutetierherden folgen (ebd.). Meist richtet sich die Territoriengröße nach der geographischen Breite bzw. dem vorkommenden Beutetierangebot, so dass deren Größe meist bei 100 bis 200 km², in nördlichen Gebieten bis über 1000 km² betragen kann (Mech und Boitani 2003; Fuller et al. 2003).

Die große Anpassungsfähigkeit der Wölfe zeigt sich auch darin, dass sie nicht nur auf vom Menschen unbeeinflussten Wildnisgebieten angewiesen sind – auch wenn diese für ihr Überleben in vielen Gebieten von Bedeutung waren – sondern auch in mehr oder weniger dicht vom Menschen besiedelten Arealen vorkommen (Fritts et al. 2003). Sie passen sich dabei der Gegenwart des Menschen an, in dem sie je nach Vorkommen jegliche Aktivitäten am Tageslicht vermeiden (ebd.) oder eine räumlich-zeitliche Meidung menschlichen Aktivitäten zeigen (Theuerkauf et al. 2003, 2007). Auch wenn Wölfe in Nachbarschaft zu Ortschaften oder sogar in rein landwirtschaftlichen Gebieten vorkommen (Blanco und Cortes 2007), machen die großräumige Lebensraumnutzung und die beachtliche Fähigkeit menschlichen Aktivitäten auszuweichen ihre Beobachtung und Untersuchung schwierig.

4 Material und Methoden

4.1 Probenahme und DNA-Extraktion

Die Proben dieser Studie wurden im Rahmen von zwei Kooperationsprojekten jeweils nördlich und südlich des Karpatenbogens in den Untersuchungsgebieten in Polen und Ungarn gesammelt (Abb. 1). Die polnischen Blut- und Gewebeproben stammen aus dem 5000 km² großen Untersuchungsgebiet im östlichen Teil der polnischen Karpaten, welches die Gebiete Beskid-Niski-Berge, Bieszczady Berge und die Przemyśl-Dynów Hügellandschaft (Gula et al. 2009) umfasst. Die Gewebeproben wurden von verunfallten bzw. tot aufgefundenen Wölfen und die Blutproben von zur Besenderung gefangenen Wölfen gewonnen. Die Urin- und Losungsproben wurden in den Territorien von vier Wolfsrudeln in den Bieszczady Bergen und einem Rudel in der Przemyśl-Dynów Hügellandschaft während der Winterfeldarbeit (Radio-Telemetrie und Abspüren im Schnee) gesammelt (Gula 2008). Die ungarischen Wolfsproben stammen aus dem Aggtelek Nationalpark im Nordosten Ungarns (Hausknecht et al. 2010) und wurden ebenfalls während der Spurensuche im Winter gesammelt.

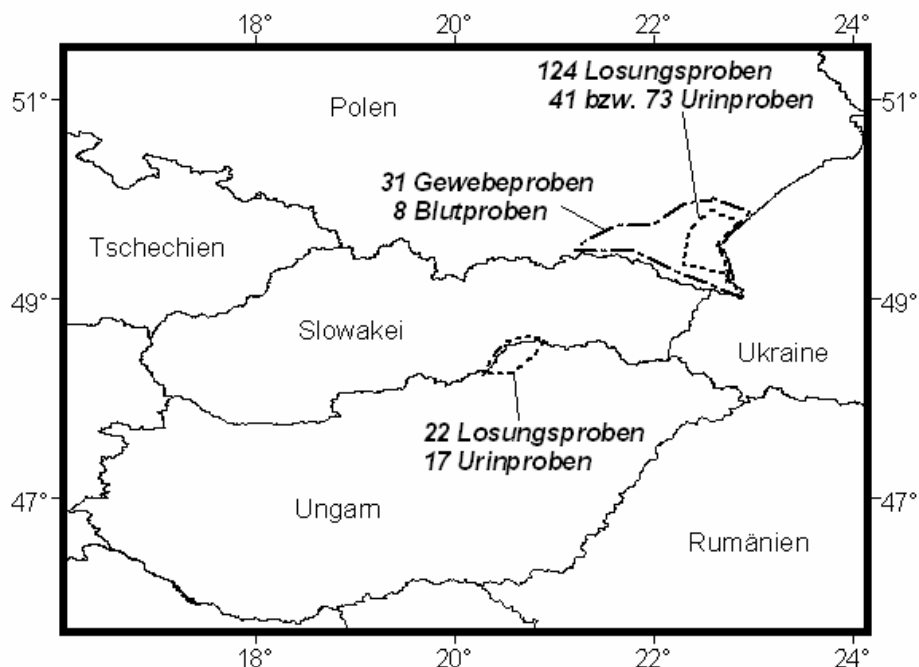


Abb. 1: Lage der Untersuchungsgebiete in Polen und Ungarn und Anzahl der Proben aus dem jeweiligen Untersuchungsgebiet.

Die DNA-Extraktion aus den Gewebeproben erfolgte modifiziert nach Hogan et al. (1986; Gula et al. 2009). Blutproben wurden mit der gleichen Methodik oder mit dem NucleoSpin® Blood QuickPure Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) extrahiert (Gula et al. 2009). Die Extraktion der DNA aus Lösungsproben erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Stool MiniKits (QIAGEN, Hilden, Germany). Das Herstellerprotokoll wurde dahingehend modifiziert, dass die Säulen vor der DNA-Elution für 10 min bei RT getrocknet wurden und die DNA in einem reduzierten Volumen von 100 µL AE-Puffer gelöst wurde. Zur DNA-Extraktion aus Urin wurden zunächst DNA und Zellreste aus ca. 15 ml Schnee-Urin-Gemisch mit 1.5 ml Natriumacetat (3M, pH5.2) und 33 ml Ethanol (99 %) übernacht bei -20 °C präzipitiert. Die eigentliche Extraktion erfolgte dann mit dem QIAamp DNA Stool MiniKits (QIAGEN, Hilden, Germany) in einem Lösungsvolumen von 80 µL Elutionspuffer.

4.2 Quantifizierung der DNA-Konzentration in nicht-invasiv gewonnenen Proben

Zur DNA-Quantifizierung wurde basierend auf Wolfsequenzen ein neues Primerpaar in der flankierenden Region des Mikrosatellitenlocus ZuBeCA 65 (AJ 609292; Klukowska et al. 2004) mit Hilfe der Primer3 Software (Rozen und Skaletsky 2000) etabliert (Gorny 2005).

Die Bestimmung der DNA-Konzentration nicht-invasiver DNA-Extrakte erfolgte in einer quantitativen Echtzeit-PCR (*quantitative real time PCR*; qPCR) mit dem SYBR-Green Fluoreszenzsystem in einem LightCycler® 1.0 Gerät (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) und mit der LightCycler® 3-Software. Das qPCR wurde ursprünglich für Urinproben in einem 10 µL Ansatz mit 3 mM MgCl₂, 1 µL LightCycler Mix, 0.1 µM Primerlösung und 1.0 µL template-DNA etabliert (Hausknecht et al. 2007). Nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt (15 s bei 95 °C) erfolgte die Amplifizierung in 40 Zyklen (10 sec bei 59 °C, 20 sec bei 72 °C und 3 sec bei 77 °C) mit Fluoreszenzdetektion in jedem Zyklusende und abschließender Schmelzkurvenanalyse (63 °C bis 99 °C; ebd.). Dieses Protokoll wurde für die Quantifizierung von Lösungs-DNA durch die Auslassung des MgCl₂ und Veränderung der PCR-Bedingungen (anfängliche Denaturierung für 10 min bei 95 °C; 40 Zyklen mit 15 s bei 95 °C, 10 sec bei 59 °C, und 20 sec bei 72 °C) optimiert.

Die Konzentration der DNA-Extrakte wurde über eine absolute Quantifizierung mit externen Kalibrierungskurven ermittelt. Die Kalibrierungskurven wurden durch dreifache Quantifizierung einer Verdünnungsreihe aus 11 bzw. 17 Verdünnungsschritten einer Wolfs-Gewebeprobe, deren DNA-Gehalt zuvor photometrisch gemessen wurde, bestimmt. Aus der Steigung (*slope*) und dem y-Achsen-Abschnitt (*Y_{int}*) dieser Kalibrierungskurven wurde die DNA-Konzentration nach der Formel $[Konz] = 10^{((Ct - Y_{int}) / slope)}$ (Morin et al. 2001) berechnet. Mit Hilfe einer abschließenden Schmelzkurvenanalyse und dem Vergleich der Schmelzkurven der Losungs- und Urinproben mit denen der Gewebeproben wurde die Spezifität der DNA-Quantifizierung für Wolfs-DNA sichergestellt.

4.3 Mikrosatelliten-Genotypisierung

Die genetische Charakterisierung von Wolfsindividuen erfolgte mit sechs bzw. acht Mikrosatelliten-Systemen (Fredholm und Winterø 1995; Francisco et al. 1996). Das 15 µL Reaktionsvolumen setzte sich aus 1.5 mM (FH2096, FH2088, FH2079) bzw. 3 mM MgCl₂ (CPH2, CPH4, CPH8, CPH12, C09.250), 0.2 mM dNTPs, 1x Reaktionspuffer, 0.2 µM Primer und 0.6 U FirePol Taq Polymerase (Solis Biodyne) zusammen. Die Amplifizierung erfolgte mit 35 Zyklen für Gewebe- und Blutproben bzw. 40 Zyklen für Urin- und Losungsproben in einem BIOMETRA UNO II Cyclyer oder EPPENDORF MASTER Gradientencycler. Die Detektion der Allele erfolgte in einem ALFExpress II DNA Analyzer (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) mit der Allelelinks Software 1.02 (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Die Genotypisierung von Losungs- und Urinproben wurde zunächst dreimal für jeden Loci (analog zu Taberlet und Luikart 1999) wiederholt. Aus diesen Wiederholungen wurde ein Consensus-Genotyp ermittelt, um durch den Vergleich dieses Consensus-Genotyps mit den Ergebnissen der einzelnen Analysewiederholungen die Genotypisierungsabweichungen festzustellen. Konnte der Consensus-Genotyp jedoch nicht nach unten beschriebenen Regeln ermittelt werden, wurden ggf. weitere Wiederholungsanalysen durchgeführt.

4.4 Sequenz-Analyse

Die Tierartbestimmung und die phylogenetischen Vergleiche erfolgten durch eine Sequenzanalyse eines variablen Abschnitts der *Control region* (d-Loop) der mitochondrialen DNA. Das 342 bp lange Fragment wurde mit dem in Valière et al. (2003)

beschriebenen Primerpaar L15995 / H16498 in einem 12.5 μL Ansatz (3 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs, 1x Reaktionspuffer, 0.2 μM Primer, 0.5 U FirePol Taq DNA Polymerase (Solis Biodyne) und 1.8 μL DNA) mit einem Biometra UNO II Cycluser amplifiziert. Für jede Probe wurde der *forward* und *reverse* DNA-Strang von Eurofins MWG Operon, Ebersberg Germany, sequenziert. Die Übereinstimmung der jeweiligen DNA-Stränge wurde mit Geneious Software 3.0.4 (Drummond et al. 2007) kontrolliert und die ermittelten Haplotypen wurden in BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit öffentlich zugänglichen Sequenzen verglichen. Außerdem wurden die ermittelten Sequenzen mit 21 Haplotypen, für welche eine Herkunft aus Ost- und Südosteuropa angegeben war (Randi et al. 2000; Valière et al. 2003; Jędrzejewski et al. 2005; Pilot et al. 2006) mit Hilfe von CLUSTALW in der MEGA-SOFTWARE (Tamura et al. 2007) aliniert. Mit diesem *Alignment* wurde ein Median-Joining Netzwerk (Bandelt et al. 1999) mit Hilfe der Network 4.5.1.0 Software (Fluxus Technology Ltd. 2009).

4.5 Geschlechtsbestimmung

Die Geschlechtsbestimmung der Losungs- und Urin-Proben erfolgte in einer multiplex-PCR, wobei die flankierende Region des ZuBeCa65-Mikrosatellitenlocus (AJ609292; Klukawska et al. 2004) als Positivkontrolle und der geschlechtsspezifische Locus MS41 (Olivier et al. 1999; modifiziert durch Sundqvist et al. 2001) amplifiziert wurde (Hiller 2007). Der Reaktionsansatz (15 μL) setzte sich aus 2 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs, 1x Reaktionspuffer, 0.14 μM of ZuBeCa65-Primer und 0.4 μM of MS 41-Primer, 0.6 U FirePol Taq DNA Polymerase (Solis Biodyne) und 2.4 μL DNA zusammen. Die PCRs wurden in einem Biometra UNO II Cycluser (Germany) in 40 Zyklen durchgeführt (Anfangsdenaturierung bei 94 °C für 3 min; 40 Zyklen mit 94 °C für 30 sec, 58 °C für 30 sec, 72 °C für 30 s; abschließende Elongation bei 72 °C für 3 min).

4.6 Statistische Auswertung

Populationsgenetische Parameter, wie z.B. Allelzahl, *allelic richness*, beobachtete und erwartete Heterozygotie, wurden mit MS Excel Microsatellite ToolKit (Park 2001), mit GenAlEx Software Version 6.0 (Peakall und Smouse 2005) und mit FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001) bestimmt. Die GENEPOP Software Version 3.4 (Raymond und Rousset 1995) wurde benutzt, um zu testen, ob die Teilpopulation der Wölfe in Polen im Hardy-Weinberg-

Gleichgewicht bzw. im Linkage Gleichgewicht liegen. Die *probability of identity* (PID) und der *probability of identity* für Geschwister (PIDsibs; siehe Waits et al. 2001) wurde als Maß für die Auftrennschärfe der angewandten Mikrosatellitenloci ebenfalls mit GENALEX berechnet. Die paarweise genetische Verwandtschaft von Wolfsindividuen wurde mit dem MER Programm Version 3 (Wang 2002) durchgeführt und die auf dieser Verwandtschaft beruhende individuelle genetische Distanz mit der Formel $d_{\text{MER}} = 1 - r_{\text{MER}}$ in MS Excel bestimmt.

Der Zusammenhang zwischen paarweise genetischer Distanz von Individuen und deren geographischer Distanz wurde mit dem Mantel-Test (Mantel 1967) und mit der räumlichen Autokorrelationsanalyse mit der GENALEX Software Version 6.0 (Peakall und Smouse 2005) untersucht.

Zur Untersuchung der genetischen Strukturierung der polnischen Wölfe wurde das Programm STRUCTURE 2.1 (Pritchard et al 2000) benutzt und daraus die mittlere posterior Wahrscheinlichkeit für die höchste Anzahl genetischer Cluster und der ΔK -Wert nach Evanno et al. (2005) berechnet. Zusätzlich wurde mit Hilfe des GENELAND Softwarepakets (Guillot et al. 2005a; 2005b; Guillot et al. 2008; Guillot 2008) das Vorhandensein und die Lage genetischer Diskontinuitäten in der polnischen Population bestimmt.

Zur Bestimmung der Fehlerraten beim wiederholten Genotypisieren nicht-invasiv gewonnener Proben, wurde basierend auf den einzelnen Genotypisierungswiederholungen der jeweiligen Probe ein Consensus-Genotyp aus den jeweiligen Wiederholungen ermittelt. Dieser Consensus-Genotyp wurde als richtig akzeptiert, wenn jedes Allel bei heterozygoten Genotypen mindestens zweimal und bei homozygoten Genotypen mindestens dreimal ermittelt wurde. Der Consensus-Genotyp wurde dann mit den entsprechenden Ergebnissen der Analysewiederholungen verglichen, um daraus die Rate an Genotypisierungsfehlern zu ermitteln. Die Fehlerraten wurden für das Auftreten von *allelic dropout* und *false alleles* mit den Formeln von Broquet und Petit (2004), sowie für die Rate abweichender Allele (*mismatching alleles*) nach Pompanon et al. (2005) ermittelt. Zusätzlich wurde der Amplifizierungserfolg als Rate erfolgreicher Amplifizierungen (PCR) bestimmt. Zur Darstellung der Fehlerraten wurden entweder die Proben in Fehlerkategorien eingeteilt (siehe Abb. 2) oder die prozentualen Werte der Fehlerraten angegeben.

Um den Einfluss von Schwellenwerten der DNA-Konzentration auf den Genotypisierungserfolg und –aufwand zu untersuchen, wurde (1) die Rate an erfolgreichen

PCRs und Genotypisierfehlern für alle analysierten Lösungs- und Urinproben ($n = 197$) bestimmt, (2) alle Proben unter den u.g. DNA-Schwellenwerten ausgeschlossen und (3) die Raten an erfolgreichen PCRs und Genotypisierfehlern für die Proben oberhalb dieser Schwellenwerte berechnet. Analog zu den Empfehlungen von Morin et al. (2001) Kategorien von DNA-Konzentration für die Genotypisierung festzulegen, wurden hier zwei Schwellenwerte zum Ausschluss von Proben für Mindestkonzentrationen an DNA von $5 \text{ pg}/\mu\text{L}$ und $25 \text{ pg}/\mu\text{L}$ getestet.

Mit Hilfe der GIMLET Software 1.3.3 (Valière 2002) wurden die *multi-locus*-Wiederholungen der Genotypen mit einander verglichen und Genotypen dann als korrekt akzeptiert, wenn mindestens zwei identische Ergebnisse aus den Wiederholungen für heterozygote und drei identische Ergebnisse für homozygote Proben ermittelt wurden. Die Bestimmung individueller Genotypen erfolgte mit GENE CAP 1.2.2 (Wilberg und Dreher 2004), da sich mit diesem Programm auch Genotypen darstellen lassen, welche sich nur mit einem oder zwei Allele unterscheiden. Eine mögliche Verwandtschaft bzw. Abstammung zwischen Wolfsgenotypen wurde außerdem mit der PARENTE Software (Cercueil et al. 2002) ermittelt. PARENTE benötigt keine vorherige Auswahl von Kandidatenväter oder -mütter zur Einschätzung der Abstammung. Stattdessen wird die wahrscheinlichste Mutter- / Vaterschaft bzw. Elternschaft (simultan für zwei mögliche Eltern) basierend auf genetischen Inkompatibilitäten zwischen allen infrage kommenden Individuen ermittelt.

Mit Hilfe von STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK) wurden die Korrelationen zwischen DNA-Konzentration und Amplifizierungserfolg bzw. Rate an abweichenden Allelen untersucht.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Probenahme und Optimierung nicht-invasiv genetischer Analysen

Wölfe lassen sich wegen ihrer Verhaltensanpassungen an die Anwesenheit von Menschen (Theuerkauf et al. 2003; Fritts et al. 2003) nur schwer beobachten und untersuchen. Das Abspüren von Wölfen bei Schneelage ist daher eine verbreitete Methode, um Populationsdaten zu erheben (Linnell et al. 1998; Kaczensky et al. 2009). Aus diesem Grund bietet sich die nicht-invasive Probenahme zur Untersuchung von Wolfsvorkommen an. Obwohl Urin von Wildtieren bereits als DNA-Quelle beschrieben wurde (Valière und Taberlet 2000), fehlte bislang der Nachweis, dass sich Urinproben im Schnee zur großräumigen Erhebung von Populationsdaten eignen.

Im polnischen Untersuchungsgebiet Bieszczady konnten mit 0.5 Stellen pro km mehr Markierungsstellen mit Urin gefunden werden als Losungsstellen (0.1 Stellen pro km). Ein ähnliches Ergebnis wurde in Nordostpolen gefunden, wo sechsmal häufiger Urinmarkierungen gefunden wurden als Losungsstellen (Zub et al. 2003). Während der winterlichen Feldarbeit, z.B. beim Abspüren, lassen sich also weitaus mehr Urinproben sammeln als Losungsproben.

Nach wiederholter Genotypisierung erbrachten 14 Urinproben aus dem Gebiet von drei Wolfsrudeln übereinstimmende Genotypisierungsergebnisse in den einzelnen Wiederholungen. Aus diesen Proben konnten neun verschiedene Individuen bestätigt werden. Damit wurde zwar das Vorkommen im Vergleich zu den Abspürergebnissen (18 Individuen) unterschätzt, was aber auf die kleine Probenzahl zurückzuführen ist. Die Rate an Genotypisierungsfehlern war vergleichbar mit den Daten anderer Studien, wie von Broquet und Petit (2004) zusammengefasst. Aufgrund der höheren Auffindungsrate, der leichteren Lagerung und Analytik sowie der Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Studien, eignen sich Urinproben als DNA-Quelle für Populationsuntersuchungen. Bei der Probenahme ist allerdings darauf zu achten, dass nur dort Urin gesammelt wird, wo anhand der Fährten im Schnee ersichtlich ist, dass nur ein Individuum dorthin uriniert hat.

Für die Untersuchung der Urinproben wurde außerdem die quantitative real-time PCR erfolgreich zur Untersuchung von Wolfs-DNA etabliert. Dazu wurde in der flankierenden Region des Mikrosatellitenlocus ZuBeCA 65 ein Primerpaar gelegt, welches ein 110 pb langes Fragment amplifiziert (Gorny 2005). In verschiedenen Amplifikationstests wurde mit Proben von potentiellen Beutearten (Reh-, Rot-, Schwarzwild; Kaninchen) überprüft,

dass die Primer nur Wolfs- und keine Beute-DNA amplifizieren (ebd.). Ein großer Vorteil der qPCR im Vergleich zu herkömmlichen Methoden ist dabei die größere Messgenauigkeit bei geringen DNA-Konzentrationen und die Spezifität für die Ziel-DNA wie Hausknecht et al. (2009) an Steinbockproben zeigen konnten. Photometrische Methoden der DNA-Quantifizierung nutzen die Lichtabsorption der DNA im ultravioletten Spektralbereich (260 nm). Sie liefern daher zuverlässige Ergebnisse erst bei verhältnismäßig hohen DNA-Konzentrationen und ermitteln den Gesamt-DNA-Gehalt einer Probe (ebd.). Da nicht zwischen der DNA der zu untersuchenden Tierart und mitextrahierter Fremd-DNA, z.B. aus Losungsproben, unterschieden werden kann, besteht so die Gefahr der Überschätzung der DNA-Konzentration.

In 33 von 41 Proben konnte der Gehalt an amplifizierbarer DNA bestimmt werden. Die Gegenüberstellung der Fehlerkategorien mit den entsprechenden DNA-Konzentrationen zeigte, dass Proben mit hohen DNA-Konzentrationen mehr übereinstimmende Ergebnisse in auf einander folgenden Analysewiederholungen erbrachten als Proben mit geringen DNA-Konzentrationen (Abb. 2). Dieser Zusammenhang zeigte sich für alle sechs getesteten Mikrosatelliteloci.

Mit diesem Ergebnis wurden die Ergebnisse der von Taberlet et al. (1996) durchgeführten Simulationsstudie bestätigt, dass mit zunehmender DNA-Konzentration die Rate an Genotypisierungsfehlern abnimmt.

Die Kenntnis der DNA-Konzentration in nicht-invasiven Extrakten erlaubt einerseits die gezielte Wiederholung von Genotypisierungen bestimmter DNA-Klassen, wie von Morin et al. (2001) und Arandjelovic et al. (2009) vorgeschlagen. Andererseits eröffnet sie die Möglichkeit der Vorauswahl von Proben. Die Proben, welche aufgrund ihres geringen DNA-Gehaltes keine Ergebnisse erwarten lassen, könnten so vor der eigentlichen Mikrosatellitengentotypisierung aussortiert und damit der Aufwand der Genotypisierungen reduziert werden.

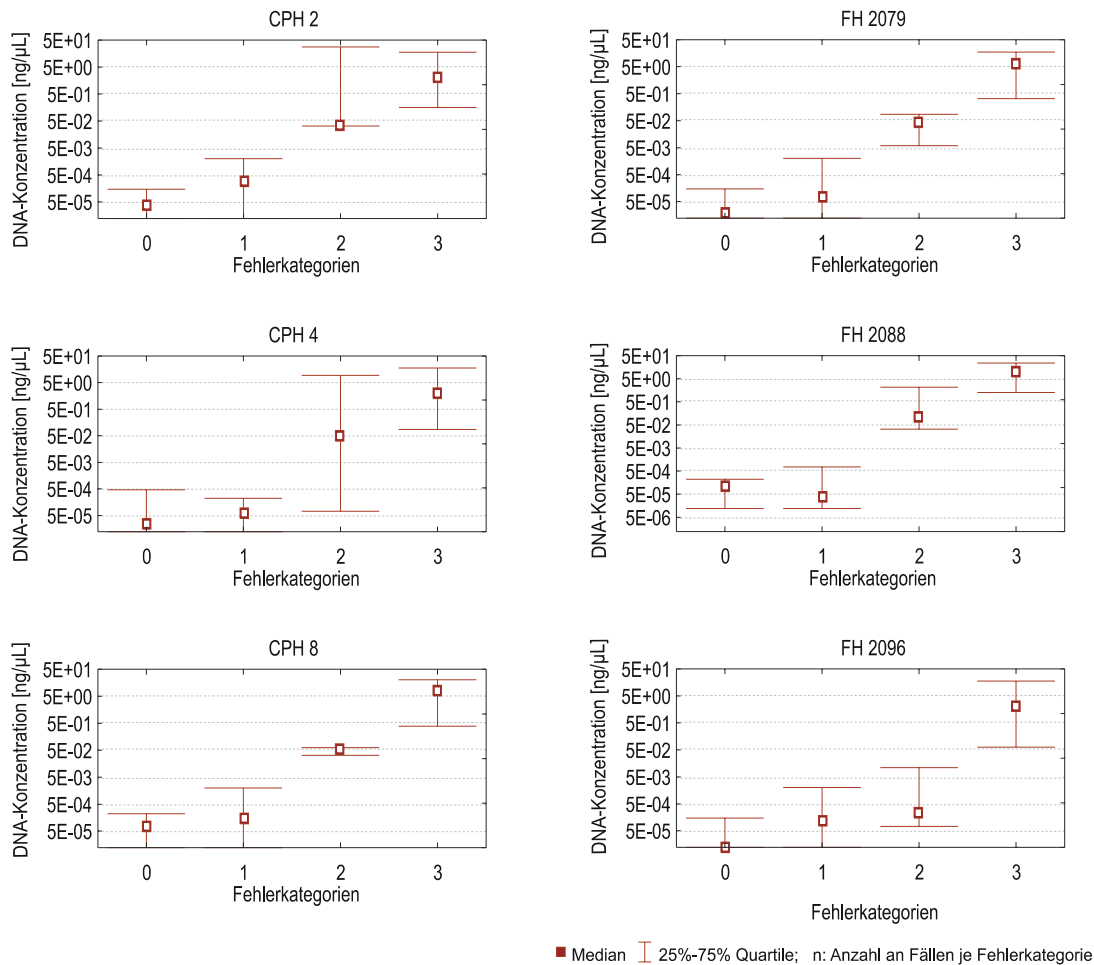


Abb. 2: Zusammenhang zwischen Fehlerraten der einzelnen Mikrosatellitenloci und der DNA-Konzentration von Urinproben. Fehlerkategorie 0 = keine Amplifizierung; Kategorie 1 = nur eine erfolgreiche Amplifizierung oder drei unterschiedliche Genotypisierungsergebnisse; Kategorie 2 = zwei identische Genotypisierungsergebnisse und eine ausgefallene PCR oder ein abweichendes Ergebnis; Kategorie 3 = drei kongruente Ergebnisse (n = Anzahl an Vergleichen je Fehlerkategorie; aus Hausknecht et al. 2007).

Um dies an einer größeren Probenzahl zu zeigen, wurde die Methodik der qPCR auf Lösungsproben übertragen und eine größere Probenzahl analysiert. Von insgesamt 197 Lösungs- und Urinproben konnte in 145 Proben (74 %) die Konzentration nukleärer DNA festgestellt werden, während die qPCR für 52 Proben (26 %) kein Ergebnis erbrachte. Die Mehrzahl der Proben enthielt aber DNA-Konzentrationen von unter 1 ng/μL (Abb. 3).

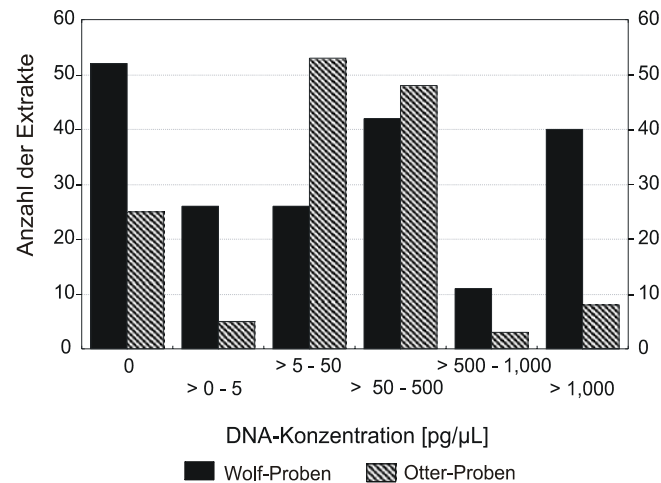


Abb. 3: Verteilung nicht-invasiv gesammelter Wolf- (n = 197) und Otterproben (n = 142) entsprechend ihrer Häufigkeit je DNA-Konzentrationsklasse (aus Hausknecht et al. in press).

Basierend auf 2338 erfolgreichen PCRs konnten die Rate an Genotypisierfehlern entsprechend des Anteils von Falschallelen (8.8 %), ausgefallenen Allelen (8.3 %) und von abweichenden Allelen (8.9 %) ermittelt werden. Die Fehlerrate zwischen den Loci schwankte dabei erheblich (Tab. 1).

Tab. 1: Untersuchte Mikrosatellitenloci für die Gentoypisierung von Wolfsproben, Bereich der Allellängen (bp) und ermittelte Anteile erfolgreicher PCRs, Falschallele (FA), ausgefallener Allele (ADO; bei heterozygoten Loci), sowie mittlere Allelfehlerrate und Standardabweichung. (verändert aus Hausknecht et al. in press).

Locus	Längenbereiche der Allele (bp)	erfolgreiche PCR (%)	Anteil FA ^a (%)	Anteil ADO ^a (%)	Mittlere Allelfehlerrate ^b (%)
Wolf (n = 197)					
CPH2	94 - 106	80.4	9.5	4.5	8.4
CPH4	140 - 148	65.5	11.9	7.9	11.6
CPH8	198 - 214	61.1	8.9	13.3	10.1
FH2079	268 - 284	55.8	2.7	18.2	4.8
FH2088	92 - 132	60.9	8.3	7.7	8.9
FH2096	96 - 108	71.9	10.1	6.5	8.8
Durchschnitt		65.9	8.8	8.3	8.9
SD		8.9	3.1	5.1	2.3

^a Formeln von Broquet und Petit (2004)

^b Formeln von Pompanon et al. (2005)

Die Gegenüberstellung der Raten an Genotypisierungsfehlern (hier als Rate abweichender Allele, *mismatching alleles*, gezeigt) bzw. erfolgreicher PCRs und der DNA-Konzentration der entsprechenden Proben bestätigte den Zusammenhang zwischen Genotypisierungserfolg und ermittelter DNA-Konzentration (Abb. 4).

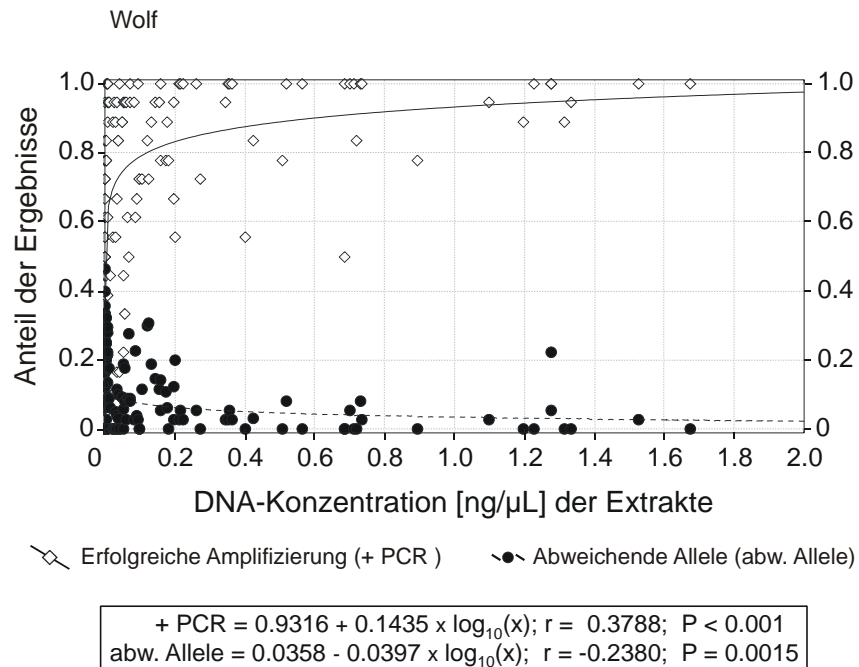


Abb. 4: Abhängigkeit des Amplifikationserfolges (Rauten) bzw. der Rate abweichender Allele (Punkte) von der DNA-Konzentration der entsprechenden Extrakte über alle Loci. Jede/r Raute/Punkt entspricht einem DNA-Extrakt (nur Konzentrationen unter 10 ng / μL berücksichtigt), welches drei- bis viermal über 6 Mikrosatellitenloci genotypisiert wurde (verändert aus Hausknecht et al. in press).

Je höher die DNA-Konzentration im Extrakt war, desto besser ließen sich die entsprechenden DNA-Abschnitte in der PCR amplifizieren und desto geringer war die Fehlerrate. Diese Korrelation stellt einen Tierart unabhängigen Zusammenhang dar, nachdem sie für Tierarten mit unterschiedlicher Ernährungsbiologie und unterschiedlichen Probenmaterialien ermittelt werden konnte (Morin et al. 2001; Salzer 2006; Geist et al. 2008; Arandjelovic et al. 2009; Hausknecht et al. 2009; Hausknecht et al. in press).

Um die Eignung der qPCR als Hilfsmittel zur Auswahl geeigneter Proben zu testen, wurde die Rate an Genotypisierungsfehlern sowohl für alle analysierten Proben (n = 197) als auch für alle jene Proben bestimmt, welche die Konzentrationsschwellen von 5 pg/μL (n = 119) bzw. 25 pg/μL (n = 104) DNA im Extrakt überschritten.

Die Einführung von DNA-Schwellenwerten führte zu einem größeren PCR-Erfolg und zu einer verminderten Fehlerrate (Abb. 5). Mit dem Ausschluss von Proben, welche

geringere DNA-Konzentrationen als die gewählten Schwellenwerte hatten, stiegen die Raten erfolgreicher PCRs von 66 % auf 85 % an der 5 pg-Schwelle und auf 87 % an der 25 pg-Schwelle. Der Median des PCR-Erfolgs von Urinproben stieg von 77 % auf 94 %. Die Rate an Genotypisierfehlern (*mismatching alleles*) nahm von 8.9 % für alle Proben (2338 PCR Reaktionen) auf 6.0 % oberhalb der 5 pg-Schwelle (1812 Reaktionen) und auf 4.9 % oberhalb der 25 pg-Schwelle (1628 Reaktionen) ab. Dementsprechend reduzierte sich die Rate an ausgefallenen Allelen (von 8.3 % auf 7.6 % bzw. 7.5 %) und Falschallelen (von 8.8 % auf 5.4 % bzw. 4.0 %).

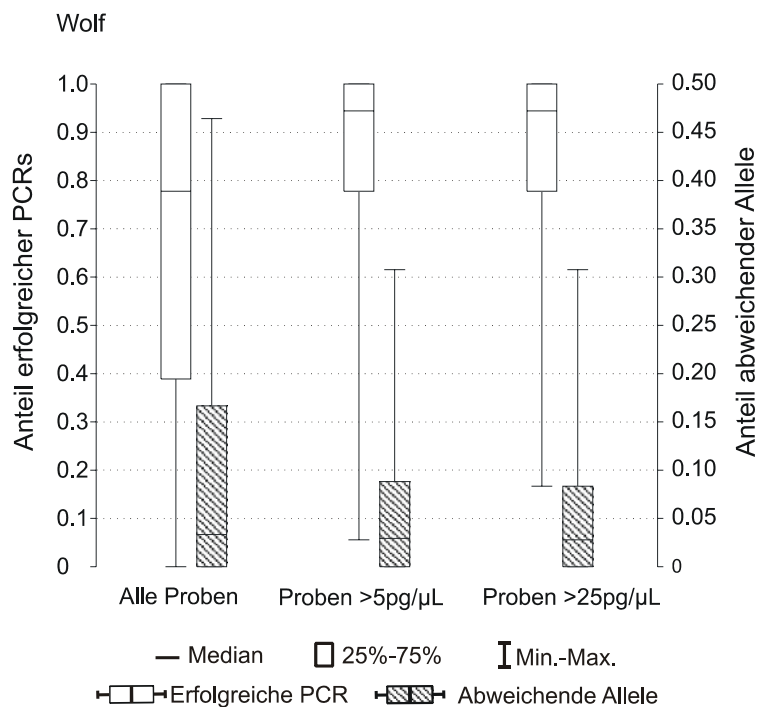


Abb. 5: Anteil erfolgreicher Amplifikationen (Polymerase-Ketten-Reaktion [PCR]) und *mismatching alleles* dargestellt mit Medianen und entsprechenden Quartilen für alle genotypisierten Wolfsproben, und für die Proben >5 pg/µL und >25 pg/µL DNA im Extrakt. Minimum- und Maximumwerte sind ebenfalls gezeigt (verändert aus Hausknecht et al. in press).

Ebenso konnte durch den Ausschluss ungeeigneter Proben der Genotypisierungsaufwand reduziert werden (Abb. 6). Nach wiederholter Genotypisierung konnten in 197 Proben 87 vollständige Genotypen detektiert werden. Nach Ausschluss der Proben mit Konzentrationen <5 pg/µL bzw. <25 pg/µL konnte die Anzahl zu analysierender Proben auf 119 bzw. 104 Proben reduziert werden, wobei je Konzentrationsschwelle 86 bzw. 82 Genotypen detektiert werden – ein Verlust von nur 1 % bzw. 6 %.

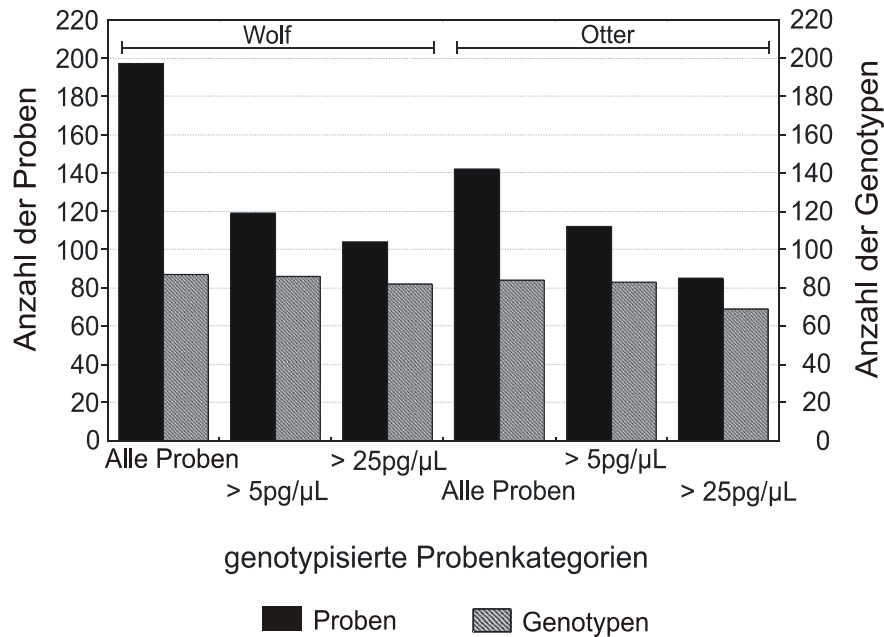


Abb. 6: Anzahl an Proben und an nach wiederholten Analysen ermittelten Genotypen für alle Wolfs- und Otterproben, sowie für die Proben, deren DNA-Gehalt die Schwellenwerte von 5 pg/μL und 25 pg/μL im Extrakt überschreiten (aus Hausknecht et al. in press).

Mit dem Ausschluss ungeeigneter Proben konnte so der Genotypisieraufwand dahin gehend optimiert werden, dass das Verhältnis zwischen der Anzahl ermittelter Genotypen und der Zahl analysierter Proben von 0.44 auf 0.79 gesteigert werden konnte. Die Effizienz der Genotypisierungen der nicht-invasiv gesammelten Proben konnte somit durch die Selektion der Proben deutlich gesteigert werden.

Eine ganze Reihe von Ansätzen zur Minimierung der oben erwähnten Genotypisierungsfehler, wie beispielsweise optimierte Probenarchivierung, multiplex-PCR-Techniken oder *multiple-tube*-Ansätze bis hin zu speziellen Methoden zur Datenauswertung wurden an unterschiedlichen Tierarten getestet (Beja-Pereira et al. 2009). Der Vorteil der hier vorgestellten Probenauswahl mittels qPCR liegt dabei darin, dass sich die Maßnahmen zur Fehlervermeidung auf die Proben beschränken, welche aufgrund ihres DNA-Gehaltes zur Individuencharakterisierung als geeignet erscheinen. Die oftmals zeitlich und finanziell beschränkten Ressourcen können so weit effizienter eingesetzt werden als bei herkömmlichen Ansätzen (Hausknecht et al. in press).

5.2 Molekular genetische Charakterisierung von Individuen und Populationen

Durch eine Kombination aus feldökologischen und molekulargenetischen Methoden konnten erstmals Berichte über die Anwesenheit von Wölfen in Nordungarn mit wissenschaftlichen Untersuchungen bestätigt werden. Während die Suche nach Wolfsspuren im Winter Hinweise auf die Lebensraumnutzung der Wölfe und ihre mögliche Anzahl erbrachte, konnten auch Urin- und Losungsproben aus dem Untersuchungsgebiet gesammelt werden.

Mit Hilfe der Mikrosatellitengenotypisierung wurden aus den ungarischen Urin- und Losungsproben 20 Genotypen ermittelt, welche sich auf die Jahre 2004 (7 Genotypen in 12 Proben), 2005 (4 Genotypen aus 13 Proben) und 2006 (9 Genotypen aus 14 Proben) verteilten. Die verbleibenden Proben konnten entweder nicht amplifiziert werden oder erbrachten inkonsistente Ergebnisse bei der Genotypisierung. Diese 20 Genotypen setzten sich aus sechs verschiedenen Genotypen, d.h. Wolfsindividuen, mit 4 weiblichen und zwei männlichen Wölfen zusammen. Die Untersuchung der Verwandtschaftsbeziehungen ergab, dass der weibliche Genotyp 1, welcher im ersten und dritten Jahr detektiert wurde, zusammen mit dem männlichen Genotypen 3, welcher in allen drei Jahren nachgewiesen wurde, das wahrscheinlichste Elternpaar für die anderen drei Wölfe 2, 4 und 5 sind (Abb. 7). Der weibliche Wolf 6 wurde nur in einer Probe aus 2006 ermittelt und könnte entweder die Schwester von Genotyp 3 sein oder dessen Tochter zusammen mit einer anderen Wölfin.

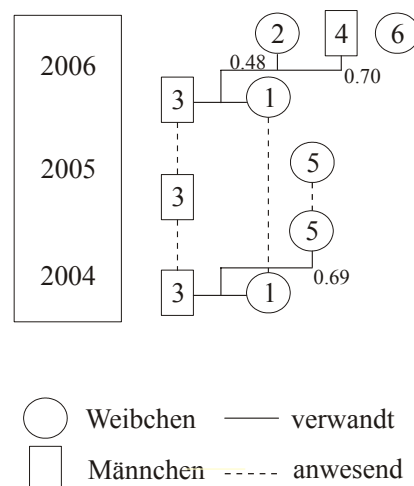


Abb. 7: Ermittelte Wolfsgenotypen und ihr Geschlecht zusammen mit dem Jahr ihrer Anwesenheit im Untersuchungsgebiet in Aggtelek. Verwandte Wölfe sind mit durchgezogenen Linien entsprechend der Wahrscheinlichkeitsberechnung mit der PARENTE-Software verbunden (aus Hausknecht et al. 2010).

Die Verteilung von Wolfsproben über ein kleineres Gebiet als ein durchschnittliches Wolfsterritorium (Gula 2008), die Detektion einer stabilen Anzahl an Wölfen über 3 Jahre, sowie die Ergebnisse der Spurensuche im Schnee weisen auf eine permanente Anwesenheit von Wölfen im Untersuchungsgebiet hin. Ebenso bestätigen die mehrjährige Nutzung eines Wurfbaues, die akustische Ortung von Jungwölfen sowie das Auffinden eines verendeten Jungwolfs die Ergebnisse der genetischen Untersuchungen.

Bezug nehmend auf die Studie im polnischen Untersuchungsgebiet, konnte mit Hilfe der Mikrosatellitengenotypisierung die polnische Teilpopulation genetisch charakterisiert werden. Die Bestimmung der genetischen Diversität der Teilpopulation polnischer Wölfe ergab Werte von $H_O = 0.56$ (SD = 0.09) für die beobachtete und $H_E = 0.66$ (SD = 0.11) für die erwartete Heterozygotie, eine durchschnittliche Allelzahl von 5.75 Allelen und eine *allelic richness* zwischen 3.97 und 7.95. Obwohl Vergleiche mit anderen Studien (aufgrund unterschiedlicher Charakteristiken der Mikrosatellitenloci) vorsichtig zu führen sind, weist doch die untersuchte Teilpopulation polnischer Wölfe eine ähnliche genetische Diversität auf wie die italienische Population (Lucchini et al. 2002: kolonisierende Population: $H_O = 0.524$, $H_E = 0.517$; Quellpopulation: $H_O = 0.650$, $H_E = 0.598$).

Mit Hilfe des Manteltests konnte keine Korrelation zwischen der paarweise genetischen und geographischen Distanz der untersuchten Wolfsindividuen ermittelt werden. Weder in der Gesamtheit der untersuchten Wolfsproben ($r = 0.129$; $p = 0.05$) noch bei der nach Geschlechtern getrennten Betrachtung der genetischen und geographischen Distanz konnte ein Zusammenhang zwischen enger genetischer Verwandtschaft und enger räumlicher Nähe gefunden werden (values: $r_m = 0.138$; $p_m = 0.08$; $r_f = 0.06$; $p_f = 0.26$).

Auch durch die räumliche Autokorrelationsanalyse konnte keine genetische Strukturierung der untersuchten Teilpopulation der polnischen Wölfe nachgewiesen werden (Abb. 8). Das Fehlen einer genetischen Strukturierung als Funktion der geographischen Distanz zeigt an, dass die untersuchte Teilpopulation weder durch *isolation-by-distance* noch durch das Vorkommen von Ausbreitungsbarrieren untergliedert ist. Vielmehr deutet das Fehlen einer räumlich-genetischen Strukturierung innerhalb der untersuchten Distanzklassen bis 100 km auf eine zufällige Verteilung der Genotypen im Untersuchungsgebiet.

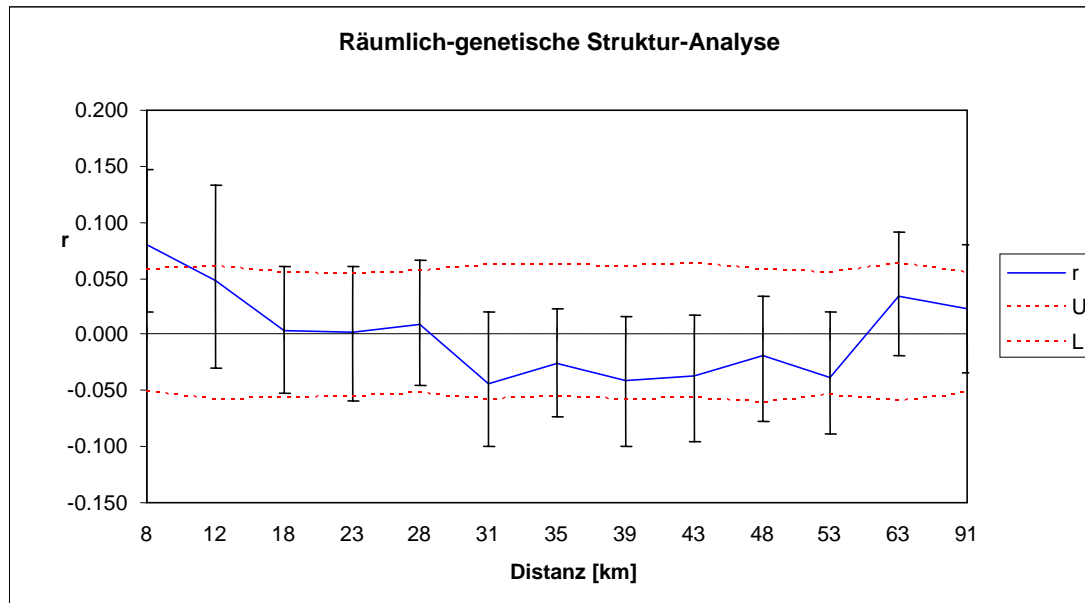


Abb. 8: Räumliche Autokorrelation aufgetragen über 13 Distanzklassen (in km) von 39 Wolfsproben. r = Korrelationskoeffizient; U und L = oberes und unteres Konfidenzintervall (95 %) um die Nullhypothese (H_0 = keine räumliche Struktur genetischer Verwandtschaftsverhältnisse).

Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen aus anderen Wolfspopulationen. Nach Linnell et al. (2005) reichen 60 % aller Ausbreitungsereignisse von Wölfen bis 100 km. Kojola et al. (2006) konnten zeigen, dass die Ausbreitungsdistanz der expandierenden finnischen Population im Median bei 98.5 km liegt, während die mittlere Ausbreitungsdistanz einer spanischen Population bei lediglich 32 km liegt (Blanco und Cortes 2007). Deshalb war keine räumlich-genetische Strukturierung der Wolfspopulation innerhalb der mittleren Ausbreitungsdistanz zu erwarten und die Wölfe Südpolens können sich im Untersuchungsgebiet trotz zunehmender Beeinträchtigung des Landschaftszusammenhangs noch ungehindert ausbreiten.

Die Bestimmung der Anzahl genetischer Cluster für die polnischen Wölfe mit Hilfe der STRUCTURE Software, ergab eine Unterteilung in 3 Gruppen, sowohl im Mittel der Zuordnungswahrscheinlichkeiten aus 20 wiederholten Berechnungen als auch im ΔK -Wert. Auch mit GENELAND wurden drei genetische Gruppen ermittelt, deren individuellen Zuordnungswahrscheinlichkeiten allerdings nur für zwei genetische Gruppen über 70 % (Gruppe 1: 0.703 bis 0.713; Gruppe 2: 0.807 bis 0.880) lagen, während sie für die dritte Gruppe lediglich zwischen 0.244 und 0.573 lagen.

Mit der beobachteten Wanderung des besenderten Wolfes im polnischen Untersuchungsgebiet konnten zwar Beobachtungen von Langstreckenwanderungen von

Wölfen bestätigt werden (Ciucci et al. 2009). Offen blieb aber die Frage, ob es sich dabei um eine außergewöhnliche Wanderung eines Einzeltieres oder um einen Aspekt der natürlichen, regelmäßig vorkommenden Ausbreitungsbewegung der Wölfe im Gebiet handelt. Mit Hilfe der GENELAND-Software und einem geografisches Informationssystem (ArcGIS 8.3; Esri) konnte die räumliche Lage der genetischen Cluster ermittelt werden (Abb. 9).

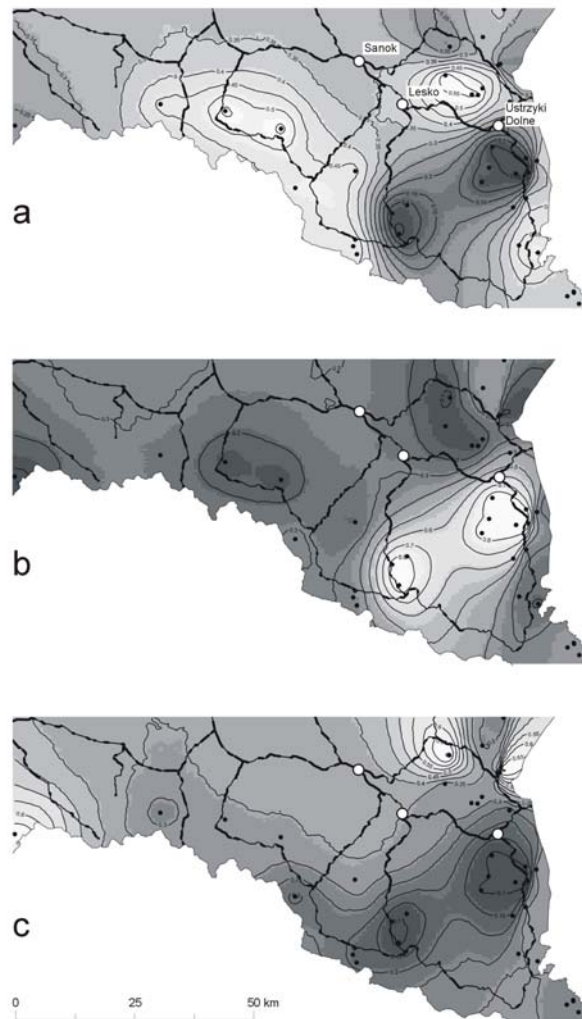


Abb. 9: Lage und Zuordnungswahrscheinlichkeit von drei genetischen Gruppen im Untersuchungsgebiet. Die individuelle *posterior* Zuordnungswahrscheinlichkeit zu einem der drei Cluster (helle Flächen bedeuten Zuordnung zur gleichen Gruppe) ist zusammen mit den wichtigsten Habitatmerkmalen (Hauptstrassen, Städte und Siedlung entlang der Straßen) getrennt für die jeweiligen Cluster gezeigt (a, b, c; aus Gula et al. 2009).

Die Lage dieser drei genetischen Gruppen stand dabei nicht in Abhängigkeit von anthropogenen Habitatstrukturen, wie z.B. Hauptverkehrswegen oder Siedlungen. Stattdessen wurden Individuen, welche mit hohen Wahrscheinlichkeiten der gleichen Gruppe zugeordnet wurden, in verschiedenen Regionen des Untersuchungsgebietes gefunden. Die geringen Zuordnungswahrscheinlichkeiten für die einzelnen Cluster sowie die landschaftsübergreifende Lage der Cluster im Gebiet deuten auf eine ungestörte Ausbreitung der Wölfe im gesamten Untersuchungsgebiet hin.

5.3 Populationszuordnung und phylogenetische Untersuchungen

Zur Untersuchung der phylogenetischen Zusammenhänge osteuropäischer Wölfe konnte von Wolfsproben aus Bieszczady und Bialowieza, Polen, und Aggtelek, Ungarn, ein 342 bp langes Fragment der mitochondrialen *Control-region* erfolgreich sequenziert werden. Die ungarischen Wölfe wiesen dabei einen einzigen Haplotypen auf, welcher mit einem Haplotypen aus Rumänien (AF338810; Valière et al. 2003) identisch war. Die Sequenzen der Wölfe aus den polnischen Karpaten stimmen mit einem in Bulgarien ermittelten Haplotypen (W16, AF115701; Randi et al. 2000) überein und sind nur mit einer Nukleotidsequenz von den ungarischen – rumänischen Sequenzen getrennt. Im NJ-Netzwerk wurden diese Haplotypen mit solchen aus der Slowakei, Bulgarien (AF115700; Randi et al. 2000) und benachbarten Regionen (DQ 421804 und DQ 421805, Pilot et al. 2006) assoziiert (Abb. 10). Die Sequenzen aus Białowieża, Nordost-Polen, zeigten zwei verschiedene Haplotypen, welche identisch mit früher publizierten Haplotypen aus Nordpolen bzw. Weißrussland waren (AF344299, AF344300; Jędrzejewski et al. 2005). In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungsergebnissen mitochondrialer DNA (Randi et al. 2000; Pilot et al. 2006) zeigte das ermittelte genealogische Netzwerk kein explizites geographisches Muster in der Verteilung der mt-DNA-Haplotypen auf. Vielmehr verteilten sich die einzelnen mt-DNA-Linien über weite Gebiete Osteuropas, was unter Berücksichtigung des besonderen Ausbreitungsvermögens der Wölfe (Mech und Boitani 2003; Linnell et al. 2005) auf einen großräumigen Genfluss hindeutet.

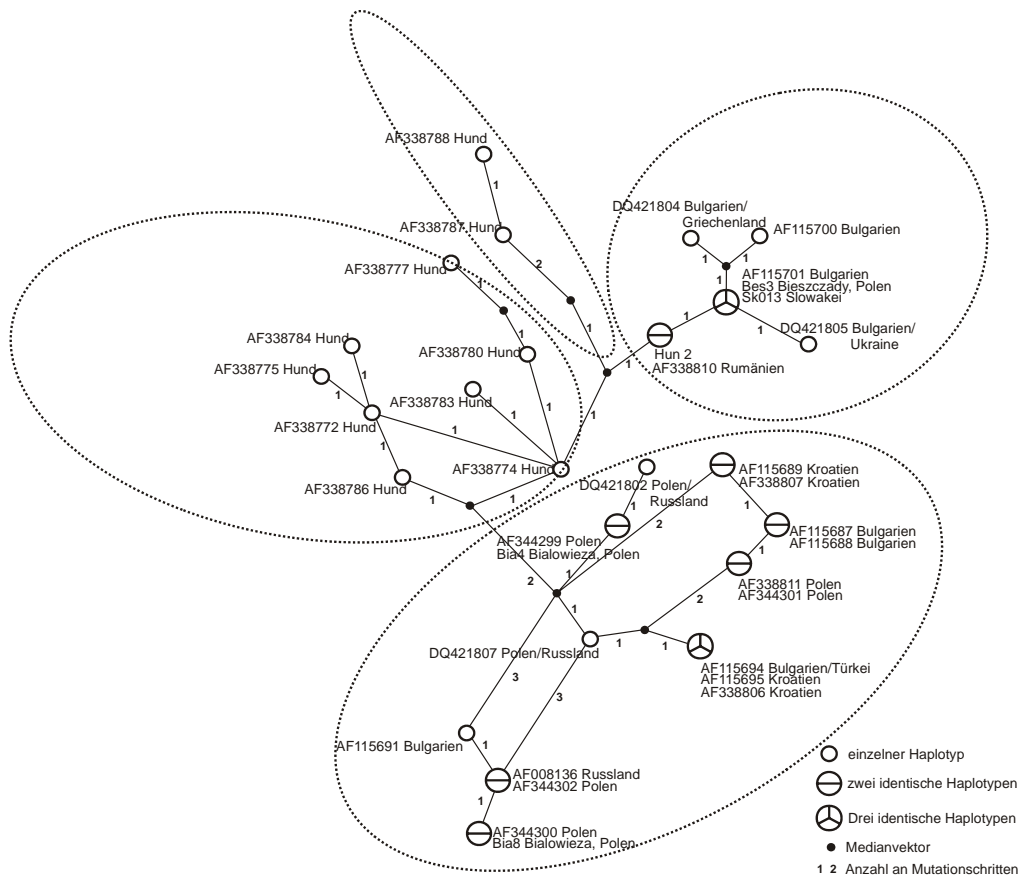


Abb. 10: Median-Joining Netzwerk osteuropäischer Wolfs- (*Canis lupus*) und Hundehaplotypen (*Canis familiaris*) basierend auf mt-DNA Control Region Sequenzen. GenBank-Referenznummern, Herkunft der Haplotypen und analysierte Haplotypen aus Ungarn (Hun2), Polen (Bes3, Bia4 und Bia8) sowie Slowakei (Sk013). Punktierte Linien fassen Haplotypen-Gruppen entsprechend der Medianvektoren und Mutationsschritte zusammen (aus Hausknecht et al. 2010).

6 Schlussfolgerung und Perspektiven

Unabhängig von der betrachteten Tierart besteht aufgrund ethischer (Primack 1995) und rechtlicher Verpflichtungen (FFH-RL; BNatSchG) die Notwendigkeit, effektive Maßnahmen zum Schutz gefährdeter Arten zu ergreifen. Ob diese Maßnahmen dabei auf ein Schutzgebietssystem oder auf *ex-situ*-Erhaltungsstrategien (Primack 1995) abzielen oder auf die Integration von Artenschutz und menschlicher Landschaftsnutzung (Linnell et al. 2008), ist nur eine Frage der Realisierung der bestmöglichen Strategien. Die Grundlage für Maßnahmen jedweder Art ist aber die ausreichende Kenntnis der Populationsparameter, der Gefährdungsursachen und eine fortlaufende Überwachung sowohl des Erhaltungszustandes als auch der Wirkungen ergriffener Maßnahmen (FFH-RL). Die Anwendung moderner molekulargenetischer Methoden aus dem Arbeitsbereich der Naturschutzgenetik kann dabei entscheidend dazu beitragen eine brauchbare Datengrundlage auf verschiedenen Ebenen zu schaffen.

Wie oben dargestellt liefert die genetische Charakterisierung von Individuen wichtige Erkenntnisse über das Vorkommen von Großraubtierarten, auch beim Auftreten in bislang unbesiedelten Habitaten (Lucchini et al. 2002). Mit Hilfe dieser Individuendifferenzierung kann die Gruppen- oder Populationsgröße (auch mit *capture-mark-recapture*-Methoden, Lukacs und Burnham 2005) bestimmt und genetische Verwandtschaften innerhalb dieser Gruppen dargestellt werden (z.B. Vonholdt et al. 2008). Die Kenntnis von Raubtierindividuen anhand genetischer Merkmale ist auch von Bedeutung, um z.B. Wanderungsbewegungen nach zu vollziehen (Landratsamt Starnberg, Presse-Information 115/06) oder um Schadensfälle an Haustieren zu klären (Sundqvist et al. 2008).

Bei Betrachtung von Raubtierarten auf Populationsebene kann ihre Isolierung in getrennte Teilvorkommen zu gravierenden genetischen Folgen führen, wie z.B. dem Verlust genetischer Variabilität und Inzuchtdepression, und damit das jeweilige Vorkommen der Art gefährden (Frankham et al. 2002). Direkte Beobachtungen von wandernden Individuen werden meist nur sporadisch gemacht (Gula et al. 2009; Ciuccia et al. 2009), sagen aber nichts darüber aus, ob der Genfluss zwischen den infrage kommenden Populationen realisiert ist. Dies ist nur dann geschehen, wenn sich die wandernden Individuen in ihrer neuen Population auch erfolgreich fortgepflanzt haben (Hedrick 2005). Nur genetische Untersuchungen der Populationen liefern Hinweise auf den bestehenden Zusammenhalt von Großraubtierpopulationen (Vilà et al. 2003a) oder auf bereits eingetretene Wirkungen der Habitatfragmentierung (Dixon et al. 2007).

Trotz der möglichen Hinweise aus morphologischen Untersuchungen, können gerade mit genetischen Untersuchungen das Auftreten und die Folgen von interspezifischen Hybridisierungen ermittelt werden (Frankham et al. 2002). Gerade bei Hund-Wolf-Hybridisierungen kann deren Ausmaß nur mit aufwendigen genetischen Analysen unterschiedlicher Marker ermittelt werden (Vilà et al. 2003b; Iacolina et al. 2010).

Auch bei der Planung von Schutzmaßnahmen können genetische Erkenntnisse gewinnbringend eingesetzt werden. Die Ausrichtung von Schutzmaßnahmen an Verwaltungseinheiten, wie z.B. Bundesländern oder Staatsgrenzen, scheint für Großraubtiere wegen ihres großräumigen Lebensraumanspruchs langfristig nicht geeignet zu sein (Linnell et al. 2008). Stattdessen kann sich die Planung von Maßnahmen auch an Populationseinheiten, wie sie beispielsweise als *evolutionary significant units* diskutiert werden (Crandall et al. 2000; Kühn 2004), orientieren.

Über die genetische Charakterisierung von Individuen und damit von Populationen hinaus eröffnen moderne methodische Ansätze vollkommen andere Sichtweisen auf Populationen und deren Charakteristika. Genomweite Sequenzinformationen (*Conservation Genomics*) von den entsprechenden Tierarten erlauben mittlerweile eine repräsentativere Bestimmung der genetischen Variabilität als mit den bislang verbreiteten Markern und damit bessere Einblicke in die Demographie, Genfluss oder Populationshistorie (Kohn et al. 2006). Die *Transcriptomics* zielt dagegen auf die Untersuchung der Genaktivität von Populationen als Funktion der jeweiligen Habitateigenschaften (Ouborg et al. 2010). Damit können in Zukunft funktional genetische Veränderungen von Populationen als Folge von Anpassung an Habitatfragmentation oder Inzuchtdepression untersucht werden. Alle diese Informationen dienen der Auswahl von prioritären Populationen bzw. erhaltenswerter genetischer Eigenschaften und Anpassungen der Arten an die jeweiligen Umweltfaktoren, welche ihre Überlebensfähigkeit als Art optimieren.

Ein weiteres Themengebiet, welches auch mit genetischen Methoden bearbeitet werden kann, ist die Parasitologie. Gerade mit Hilfe der nicht-invasiven Probenahme können Untersuchungen zum Befall von Wildtieren mit Parasiten und Pathogenen durchgeführt werden (Dinkel et al. 1998; Acton 2007). Mit Kenntnissen der Befallsraten von Raubtierarten können sowohl mögliche Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit einzelner, befallener Vorkommen der Arten als auch eine mögliche Gefährdung der menschlichen Bevölkerung ermittelt werden (König und Janko 2009).

Die vielfältigen Möglichkeiten der molekularen Genetik sollten zur Integration der *Conservation Genetics* mit anderen Disziplinen genutzt werden, um so ein tieferes Verständnis für die betrachteten Großraubtierarten und deren Populationen zu erreichen. Denn aus der Vernetzung von molekulargenetischen Untersuchungen mit Methoden der *landscape genetics* (Holderegger und Wagner 2008), der Freilandökologie (z.B. Harris et al. 2009) oder der Endokrinologie (Millspaugh und Washburn 2004) können umfassende Einblicke in den aktuellen Populationszustand und dessen Einflussfaktoren gewonnen, und entsprechende Managementstrategien ausgearbeitet werden.

7 Literatur

- Acton A.E.B. (2007). Evaluation of Noninvasive Molecular Monitoring for Fecal Pathogens Among Free-Ranging Carnivores. PhD Thesis submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University. Raleigh NC, USA.
- Arandjelovic M., Guschanski K., Schubert G., Harris T.R., Thalmann O., Siedel H. und Vigilant L. (2009). Two-step multiplex polymerase chain reaction improves the speed and accuracy of genotyping using DNA from noninvasive and museum samples. *Molecular Ecology Resources* 9: 28-36.
- Bandelt H.J., Forster P. und Röhl A. (1999). Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenetics. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Beja-Pereira A., Oliveira R., Alves P.C., Schwartz M.K. und Luikart G. (2009). Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources* 9: 1279-1301.
- Blanco J.C. und Cortes Y. (2007). Dispersal patterns, social structure and mortality of wolves living in agricultural habitats in Spain. *Journal of Zoology* 273: 114-124.
- Boitani L. (2003). Wolf Conservation and Recovery. In: Mech L.D. und Boitani L. (eds). *Wolves, ecology and conservation*. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Bradley B.J. und 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: 602-605.
- Broquet T. und Petit E. (2004). Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics. *Molecular Ecology* 13: 3601-3608.
- Cercueil A., Bellemain E. und Manel, S. (2002). PARENTE: a computer program for parentage analysis. *Journal of Heredity* 93: 458-459.
- Ciucci P., Reggioni W., Maiorano L. und Boitani L. (2009). Long-Distance dispersal of a rescued wolf from the Northern Apennines to the Western Alps. *Journal of Wildlife Management* 73: 1300–1306.
- Crandall K.A., Bininda-Emonds O.R.P., Mace G.M. und Wayne R.K. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 290-295.
- Creel, S., Spong G., Sands J.L., Rotella J., Zeigle J., Joe L., Murphy K.M. und Smith D. (2003). Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology Notes* 12: 2003-2009.
- Dinkel A., Von Nickisch-Roseneck M., Bilger B., Merli M., Lucius R. und Romig T. (1998). Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 1871–1876.

- Dixon J.D., Oli M.K., Wooten M.C., Eason T.H., McCown J.W. und Cunningham M.W. (2007). Genetic consequences of habitat fragmentation and loss: the case of the Florida black bear (*Ursus americanus floridanus*). *Conservation Genetics* 8:455–464.
- Double M.C., Peakall R., Beck N.R. und Cockburn A. (2005). Dispersal, philopatry and infidelity: dissecting local genetic structure in superb fairy-wrens *Malus cyaneus*. *Evolution* 59: 625-635.
- Drummond A.J., Ashton B., Cheung M., Heled J., Kearse M., Moir R., Stones-Havas S., Thierer T. und Wilson A. (2007). GENEIOUS v3.0. (available from <http://www.geneious.com/>).
- El Mousadik A. und Petit R.J. (1996). High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 832-839.
- Evanno G., Regnaut S. und Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- Excoffier L. und Heckel G. (2006). Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nature Reviews Genetics* 7: 745-758.
- Fernando P., Vidya T.N., Rajapakse C., Dangolla A. und Melnick D.J. (2003). Reliable noninvasive genotyping: fantasy or reality? *Journal of Heredity* 94: 115-123.
- Francisco L.V., Langston A.A., Mellersh C.S., Neal C.L. und Ostrander E.A. (1996). A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome* 7: 359-362.
- Frankham R., Ballou J.D. und Briscoe D.A. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Fluxus Technology Ltd. (2009). <http://www.fluxus-engineering.com>.
- Fredholm M. und Winterø A.K. (1995). Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mammalian Genome* 6: 11-18.
- Fritts S.H., Stephenson R.O., Hayes R.D. und Boitani L. (2003). Wolves and humans. In: Mech L.D. und Boitani L. (eds). *Wolves, ecology and conservation*. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Fuller T.K., Mech L.D. und Cochrane J.F. (2003). Wolf population dynamics. In: Mech L.D., Boitani L. (eds). *Wolves, ecology and conservation*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Geist J., Wunderlich H. und Kuehn R. (2008). Use of mollusc shells for DNA-based molecular analyses. *Journal of Molluscan Studies* 74: 337-343.

- Gorny P. (2005). Optimierung und Weiterentwicklung genetischer Analysen auf der Basis nicht-invasiver Proben mit Schwerpunkt Urin. Diplomarbeit im Fachbereich Wildbiologie und Wildtiermanagement, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Technische Universität München.
- Goudet J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Updated from Goudet J (1995). FSTAT (vers. 1.2) a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.
- Guillot G., Estoup A., Mortier F. et al (2005a). A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170: 1261-1280.
- Guillot G., Mortier F. und Estoup A. (2005b). GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5: 708-711.
- Guillot G., Santos F. and Estoup A. (2008). Analysing georeferenced populations genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics* 24: 1406-1407.
- Guillot G. (2008). Inference of structure in subdivided populations at low levels of genetic differentiation. The correlated allele frequencies model revisited. *Bioinformatics* 24: 2222-2228.
- Gula R. (2008). Wolf depredation on domestic animals in the Polish Carpathian Mountains. *Journal of Wildlife Management* 72: 283-289.
- Gula R., Hausknecht R. und Kühn R. (2009). Evidence of wolf dispersal in anthropogenic habitats of the Polish Carpathian Mountains. *Biodiversity and Conservation* 18: 2173-2184.
- Hájková P., Zemanová B., Bryja J., Hájek B., Roche K., Tkadlec E. und Zima J. (2006). Factors affecting success of PCR amplification of microsatellite loci from otter faeces. *Molecular Ecology Notes* 6: 559-562.
- Harris T.R., Caillaud D., Chapman C.A. und Vigilant L. (2009). Neither genetic nor observational data alone are sufficient for understanding sex-biased dispersal in a socialgroup-living species. *Molecular Ecology* 18: 1777-1790.
- Hausknecht R., Gula R., Pirga B., und Kuehn R. (2007). Urine - a source for noninvasive genetic monitoring in wildlife. *Molecular Ecology Notes* 7: 208-212.
- Hausknecht R., Salzer K., Filli F. und Kühn R. (2009). Techniques for noninvasive genetic monitoring of Alpine Ibex (*Capra ibex*). *Acta Theriologica* 54: 277-287.
- Hausknecht R., Szabó A., Firmánszky G., Gula R. und Kühn R. (2010). Confirmation of wolf residence in Northern Hungary by field and genetic monitoring. *Mammalian Biology* 75: 348-352.
- Hausknecht R., Bayerl H., Gula R. und Kühn R. (in press). Application of quantitative real-time polymerase chain reaction for non-invasive genetic monitoring. *Journal of Wildlife Management* (in press).

- Hedrick P.W. (2005). *Genetics of Populations*. 3rd edition. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury Massachusetts, USA.
- Hiller H. (2007). Monitoring three wolf packs in the Bieszczady Mountain region (Poland) by means of noninvasive sampling. Master thesis. School of Forest Science and Resource Management. Technische Universität München.
- Hofreiter M., Serre D., Poinar H.N., Kuch M. und Pääbo S. (2001). Ancient DNA. *Nature Reviews in Genetics* 2: 353-359.
- Hogan B.L.M., Constantini F. und Lacy E. (1986). *Manipulating the mouse embryo*, section D. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Holder M. und Lewis P.O. (2003). Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature Reviews – Genetics* 4: 275-284.
- Holderegger R. und Wagner H.H. (2008). *Landscape Genetics*. *Bioscience* 58: 199-207.
- Iacolina L., Scandura M., Gazzola A., Cappai N., Capitani C., Mattioli L., Vercillo F. und Apollonio M. (2010). Y-chromosome microsatellite variation in Italian wolves: A contribution to the study of wolf-dog hybridization patterns. *Mammalian Biology* 75: 341–347.
- Jędrzejewski W., Branicki W., Veit C., Medugorac I., Pilot M., Bunevich A.N., Jędrzejewska B., Schmidt K., Theuerkauf J., Okarma H., Gula R., Szymura L. und Förster M. (2005). Genetic diversity and relatedness within packs in an intensely hunted population of wolves *Canis lupus*. *Acta Theriologica* 50: 3-22.
- Kaczensky P., Kluth G., Knauer F., Rauer G., Reinhardt I. und Wotschikowsky U. (2009). *Monitoring von Großraubtieren in Deutschland*. BfN-Skripten 251. Bonn.
- Klukowska J., Szczerbal I., Rickli O., Switonski M., Dolf G. und Schelling C (2004). Seven bacterial artificial chromosome-derived canine microsatellite-linking physical and genetic maps. *Animal Genetics* 35: 252-253.
- Knoop V. und Müller K. (2009). *Gene und Stammbäume – Ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- König A. und Janko C. (2009). Erfolgreiche Entwurmung von Füchsen (*Vulpes vulpes*) im südlichen Oberbayern gegen den Kleinen Fuchsbandwurm (*Echinococcus multilocularis*). *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 34: 263-267.
- Kohn M.H., Murphy W.J., Ostrander E.A. und Wayne R.K. (2006). Genomics and conservation genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 21: 629–637.
- Kojola I., Aspi J., Hakala A., Heikkinen S., Ilmoni C. und Ronkainen S. (2006). Dispersal in an expanding wolf population in Finland. *Journal of Mammalogy* 87: 281–286.
- Kühn 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.

- Landratsamt Starnberg Presse-Information Nr. 115/06 (2006). Wolf aus Italien bei Pöcking gefunden. <http://www.lk-starnberg.de/index.phtml?NavID=603.26>.
- Leitfaden zum strengen Schutzsystem für Tierarten von gemeinschaftlichem Interesse im Rahmen der FFH-Richtlinie 92/43/EWG Endgültige Fassung, Februar 2007; http://circa.europa.eu/Public/irc/env/species_protection/library?l=/commission_guidance/german/env-2007-00702-00-00-de-/_EN_1.0_&a=d
- Linnell J.D.C., Swenson J.E., Landa A. und Kvam T. (1998). Methods for monitoring European large carnivores – a worldwide review of relevant experience. NINA Oppdragsmelding 549: 1-38.
- Linnell J.D.C., Brøseth H., Solberg E.J. and Brainerd S.M. (2005). The origins of the southern Scandinavian wolf *Canis lupus* population: potential for natural immigration in relation to dispersal distances, geography and Baltic ice. *Wildlife Biology* 11: 383-391.
- Linnell J.D.C., Salvatori V. und Boitani L. (2008). Guidelines for population level management plans for large carnivores in Europe. A Large Carnivore Initiative for Europe report prepared for the European Commission (contract 070501/2005/424162/MAR/B2).
- Lucchini V., Fabbri E., Marucco F., Ricci S., Boitani L. und Randi E. (2002). Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Molecular Ecology* 11: 857-868.
- Lukacs P.M. und Burnham K.P. (2005). Review of capture–recapture methods applicable to noninvasive genetic sampling. *Molecular Ecology* 14: 3909-3919.
- Manel S., Schwartz M.K., Luikart G. und Taberlet P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 189-197.
- Manel S., Gaggiotti O.C. und Waples R.S. (2005). Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 136-142.
- Mantel N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Maudet C., Luikart G., Dubray D., von Hardenberg A. und Taberlet P. (2004). Low genotyping error rates in wild ungulate faeces sampled in winter. *Molecular Ecology Notes* 4: 772-774.
- Mech L.D. und Boitani L. (2003) Wolf social ecology. In: Mech L.D., Boitani L. (eds). *Wolves, ecology and conservation*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Millspaugh J. und Washburn B.E. (2004). Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. *General and Comparative Endocrinology* 138: 189–199.

- Monteiro L., Bonnemaïson B., Vekris A., Petry K.G., Bonnet J., Vidal R., Cabrita J. und Megraud F. (1997). Complex Polysaccharides as PCR Inhibitors in Feces: *Helicobacter pylori* Model. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 995-998.
- Morin P.A., Chambers K.E., Boesch C. und Vigilant L. (2001). Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology* 10: 1835-1844.
- Murphy M.A., Waits L.P. und Kendall K.C. (2003). The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*). *Molecular Ecology* 12: 2261-2265.
- Nsubuga A.M., Robbins M.M., Roeder A.D., Morin P.A., Boesch C. und Vigilant L. (2004). Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Molecular Ecology* 13: 2089-2094.
- Okarma H. und Langwald D. (2002). *Der Wolf – Ökologie, Verhalten, Schutz*. 2. neubearbeitete Auflage. Parey Buchverlag im Blackwell Verlag GmbH, Berlin.
- Olivier M., Breen M., Binns M. und Lust G. (1999). Localization and characterization of nucleotide sequences from the canine Y chromosome. *Chromosome Research* 7: 223-233.
- Ouborg N.J., Pertoldi C., Loeschke V., Bijlsam R.K. und Hedrick P.W. (2010). Conservation genetics in transition to conservation genomics. *Trends in Genetics* 26: 177-187.
- Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaennike-Després V., Hebler J., Rohland N., Kuch M., Krause J., Vigilant L. und Hofreiter M. (2004). Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Reviews of Genetics*. 38: 645–679.
- Park S.D.E. (2001). Trypanotolerance in West African Cattle and the population genetic effects of selection [Ph.D. thesis], University of Dublin.
- Peakall R. und Smouse P.E. (2005). GenAlEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Peterson R.O. und Ciucci P. (2003) The wolf as a carnivore. In: Mech L.D., Boitani L. (eds). *Wolves, ecology and conservation*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Pilot M., Jedrzejewski W., Branicki W., Sidorovich V.E., Jędrzejewska B., Stachura K., Funk S.M. (2006). Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular Ecology* 15: 4533-4553.
- Pompanon F., Bonin A., Bellemain E. und Taberlet P. (2005). Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* 6: 847–856.
- Posada D. und Crandall K. (2001). Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 37-45.

- Primack R.B. (1995). Naturschutzbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Pritchard J.K., Stephens M. und Donnelly P.J. (2000). Inference of population structure using multi-locus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Randi E., Lucchini V., Christensen M.F., Mucci N., Funk S., Dolf G., Loeschcke V. (2000). Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conservation Biology* 14: 464–473.
- Raymond M. und Rousset F. (1995) GENEPOP Version 1.2: population genetic software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 86: 248-249.
- Reinhardt I. und Kluth G. (2007). Leben mit Wölfen – Leitfaden für den Umgang mit einer konfliktträchtigen Tierart in Deutschland. BfN-Schriftenreihe 201. Bonn.
- Richtlinie 92/43/EWG des Rates vom 21. Mai 1992 zur Erhaltung der natürlichen Lebensräume sowie der wildlebenden Tiere und Pflanzen FFH-Richtlinie. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1992L0043:20070101:DE:PDF>
- Riley S.P.D., Pollinger J.P., Sauvajot R.M., York E.C., Bromley C., Fuller T.K. und Wayne R.K. (2006). A southern California freeway is a physical and social barrier to gene flow in carnivores. *Molecular Ecology* 15: 1733-1741.
- Rozen, S. und Skaletsky H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 132: 365–386.
- Salzer K. (2006). Establishment of molecular genetic methods for the analysis of non-invasive samples, using alpine ibex (*Capra ibex*) as an example. Diplomarbeit. Universität Lüneburg, Fakultät III Umwelt und Technik, Umweltwissenschaften und Technische Universität München, Fachgebiet für Wildbiologie und Wildtiermanagement.
- Salvatori V. und Linnell J. (2005). Report on the conservation status and threats for wolf (*Canis lupus*) in Europe. Convention on the Conservation of the European wildlife and natural habitats. T-PVS/Inf (2005) 1.
- Santini A., Lucchini V., Fabbri E. und Randi R. (2007). Ageing and environmental factors affect PCR success in wolf (*Canis lupus*) excremental DNA samples. *Molecular Ecology Notes* 7: 955-961.
- Schwartz M.K. und McKelvey K.S. (2008). Why sampling scheme matters: the effect of sampling scheme on landscape genetic results. *Conservation Genetics* 10: 441-452.
- Scribner K.T. und Pearce J.M. (2000). Microsatellites: Evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population and phylogenetic levels. In: Baker A.J. (2000). *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science Ltd. UK.
- Slate J., Gratten J., Beraldi D., Stapley J., Hale M. und Pemberton J.M. (2009). Gene mapping in the wild with SNPs: guidelines and future directions. *Genetica* 136: 97-107.

- Smouse P.E. und Peakall R. (1999). Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* 82: 561-573.
- Stoeckle B., Dworschak K., Gossner M.M. und Kuehn R. (2010). The perfect solution: influence of sampling fluids for arthropods on insect genotyping reliability. *Entomologia Experimentalis Applicata*, 135: 217-223.
- Storfer A., Murphy M.A., Evans J.S., Goldberg C.S., Robinson S., Spear S.F., Dezzani R., Delmelle E., Vierling L. und Waits L.P. (2007). Putting the 'landscape' in landscape genetics. *Heredity* 98: 128-142.
- Stubbe C. (2008). Der Wolf in Russland – historische Entwicklung und Probleme. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* Bd. 33: 325-264.
- Sundqvist A.K., Ellegren H., Olivier M. und Vilà C. (2001). Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Molecular Ecology* 10: 1959-1966.
- Sundqvist A.K., Ellegren H. und Vilà C. (2008). Wolf or dog? Genetic identification of predators from saliva collected around bite wounds on prey. *Conservation Genetics* 9: 1275–1279.
- Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L.P. und Bouvet J. (1996). Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 24: 3189-3194.
- Taberlet P. und Luikart G. (1999). Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 41-55.
- Taberlet P., Waits L.P., und Luikart G. (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 323–327.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. und Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology Evolution* 24: 1596-1599.
- Theuerkauf J., Jędrzejewski W., Schmidt K. und Gula R. (2003). Spatiotemporal segregation of wolves from humans in the Białowieża forest (Poland). *Journal of Wildlife Management* 67: 706-716.
- Theuerkauf J., Gula R., Pirga B., Tsunoda H., Eggermann J., Brzezowska B., Rouys S. und Radler S. (2007). Human impact on wolf activity in the Bieszczady Mountains, SE Poland. *Annales Zoologici Fennici* 44: 225-231.
- Übereinkommen über die Erhaltung der europäischen wildlebenden Pflanzen und Tiere und ihrer natürlichen Lebensräume (82/72/EWG); Berner Konvention. <http://conventions.coe.int/Treaty/ger/Treaties/Html/104.htm>
- Valière N. und Taberlet P. (2000). Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Molecular Ecology* 9: 2150-2154.

- Valière N. (2002). GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* 2: 377-379.
- Valière N., Fumagalli L., Gielly L., Miquel C., Lequette B., Poulle M.L., Weber J.M., Arlettaz R. und Taberlet P. (2003). Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from noninvasive genetic sampling over a period of 10 years. *Animal Conservation* 6: 83-92.
- Valière N., Bonenfant C., Toïgo C., Luikart G., Gaillard J.-M. und 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.
- Vilà C., Walker C., Sundqvist A.K., Flagstad Ø., Seddon J., Björnerfeldt S., Kojola I., Casulli A., Sand H., Wabakken P. und Ellegren H. (2003a). Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single migrant. *Proceedings of the Royal Society London B* 270: 91-97.
- Vilà C., Walker C., Sundqvist A.K., Flagstad Ø., Andersone Z., Casulli A., Kojola I., Valdmann H., Halverson J. und Ellegren H. (2003b). Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity* 90: 17-24.
- Vonholdt B.M., Stahler D.R., Smith D.W., Earl D.A., Pollinger J.P. und Wayne R.K. (2008). The genealogy and genetic viability of reintroduced Yellowstone grey wolves. *Molecular Ecology* 17: 252–274.
- Wandeler P., Hoeck P.E.A. und Keller L.F. (2007). Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 634-642.
- Wang J. (2002). An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160: 1203-1215.
- Waits J.L. und Leberg P.L. (2000). Biases associated with population estimation using molecular tagging. *Animal Conservation* 3: 191-199.
- Waits L.P., Luikart G. und Taberlet P. (2001). Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* 10: 249–256.
- Wilberg M.J. und Dreher B.P. (2004). GENECAP: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture-recapture population estimation. *Molecular Ecology Notes* 4: 783-785.
- Zub K., Theuerkauf J., Jędrzejewski W., Jędrzejewska B., Schmidt K. und Kowalczyk R. (2003). Wolf pack territory marking in the Białowieża primeval forest (Poland). *Behaviour* 140: 635 – 648.

Wissenschaftliche Mitteilungen

Publikationen

Hausknecht R. (2001). Damwild – ökologische Nische eines Neubürgers. Beiträge zur Jagd- und Wildforschung Bd. 26: 49-60.

Hausknecht R., Pirga B., Gula R. und Kühn R. (2005). Molekulargenetisches Monitoring von Wildtierpopulationen am Beispiel von Wolfsrudeln in Polen. Beiträge zur Jagd- und Wildforschung Bd. 30: 203-211.

Hausknecht R., Gula R., Pirga B. und Kuehn R. (2007). Urine - a source for noninvasive genetic monitoring in wildlife. Molecular Ecology Notes 7: 208-212.

Hausknecht R. und Kühn R. (2007). Molecular genetic assistance in the breeding program of the Ural Owl (*Strix uralensis*) in Bavarian Forest National Park. European Ural Owl Workshop, Bavarian Forest National Park. Nationalpark Bayerischer Wald Tagungsbericht – Heft 8: 82-87.

Hausknecht R., Salzer K., Filli F. und Kühn R. (2009). Techniques for noninvasive genetic monitoring of Alpine Ibex *Capra ibex*. Acta Theriologica 54: 277-287.

Gula R., **Hausknecht R.** und Kühn R. (2009). Evidence of wolf dispersal in anthropogenic habitats of the Polish Carpathian Mountains. Biodiversity and Conservation 18: 2173-2184.

Hausknecht R., Szabó A., Firmánszky G., Gula R. und Kühn R. (2010). Confirmation of wolf residence in Northern Hungary by field and genetic monitoring. Mammalian Biology 75: 348-352.

Hausknecht R., Bayerl H., Gula R. und Kühn R. (in press). Application of quantitative real-time polymerase chain reaction for non-invasive genetic monitoring. Journal of Wildlife Management (in press).

Vorträge

Hausknecht R. (2005). Molekulargenetisches Monitoring von Wildtierpopulationen am Beispiel von Wolfsrudeln in Polen. Internationales Symposium „Wildtiere im Grenzbereich zwischen Schutz und Nutzung“ (unter dem besonderen Aspekt der EU-Erweiterung) in Chorin vom 16. bis 19. Juni 2005.

Hausknecht R., Gula R. und Kühn R. (2007). Application of quantitative real time PCR in genetic analyses of non-invasive samples. Presentation: International Workshop on Molecular Methods in Conservation. Sponsored by A. von Humboldt Foundation, in Bialowieza, Poland, on 10-14 October 2007.

Hausknecht R. (2007). Tiergarten – Nationalpark – Universität: eine Kooperation für den Habichtskauz. Eingeladener Vortrag im Tiergarten Nürnberg anlässlich der Langen Nacht der Wissenschaften, 20. Oktober 2007.

Lebenslauf

Roland Hausknecht
geb. 09. April 1973 in Homburg / Saar

Persönliche DatenSchulbildung

Grundschule

1979 - 1983

Allgemeine Hochschulreife
Gymnasium Johanneum, Homburg / Saar

1983 - 1992

Studium

Diplom-Biologie
Universität (TH) Fridericiana Karlsruhe
Vordiplom

10 / 1993 – 09 / 1996

Diplom-Biologie
Georg-August Universität Göttingen

10 / 1996 – 08 / 2000

Master of Science in *Sustainable Resource
Management*
Technische Universität München

11 / 2001 – 03 / 2004

Promotion
AG Molekulare Zoologie; Lehrstuhl für Zoologie
Technische Universität München

04 / 2004 – heute

Berufliche Tätigkeiten

Teilzeitmitarbeiter
LSG SkyChefs GmbH, Flughafen München

04 / 2004 – 04 / 2007

Wissenschaftlicher Mitarbeiter
AG Molekulare Zoologie; Lehrstuhl für Zoologie
Technische Universität München
Molekular genetische Unterstützung eines
Erhaltungszuchtprogramms (*Strix uralensis*)

02 / 2007 – 04 / 2009

Förderung durch die Bundesagentur für Arbeit

05 / 2009 – 10 / 2009

Medpace Germany GmbH / Medical Consulting
Dr. Schlichtiger GmbH, München

10 / 2009 – heute

Anhang

Aus der vorliegenden Promotionsarbeit gingen die im Anhang aufgeführten wissenschaftlichen Publikationen hervor:

Anhang 1:

Hausknecht R., Gula R., Pirga B., und Kuehn R. (2007). Urine - a source for noninvasive genetic monitoring in wildlife. *Molecular Ecology Notes* 7: 208-212.

Anhang 2:

Hausknecht R., Bayerl H., Gula R. und Kühn R. (in press). Application of quantitative real-time polymerase chain reaction for non-invasive genetic monitoring. *Journal of Wildlife Management* (in press).

Anhang 3:

Gula R., **Hausknecht R.** und Kühn R. (2009). Evidence of wolf dispersal in anthropogenic habitats of the Polish Carpathian Mountains. *Biodiversity and Conservation* 18: 2173-2184.

Anhang 4:

Hausknecht R., Szabó A., Firmánszky G., Gula R. und Kühn R. (2010). Confirmation of wolf residence in Northern Hungary by field and genetic monitoring. *Mammalian Biology* 75: 348-352.

Anhang 1

Hausknecht R., Gula R., Pirga B. und Kuehn R. (2007). Urine - a source for noninvasive genetic monitoring in wildlife. *Molecular Ecology Notes* 7: 208-212.

TECHNICAL ARTICLE

Urine — a source for noninvasive genetic monitoring in wildlife

ROLAND HAUSKNECHT,* ROMAN GULA,† BARTOSZ PIRGA† and RALPH KUEHN*

*Molecular Ecology and Conservation Genetics Unit, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU Muenchen, Am Hochanger 13, D-85354 Freising, Germany, †Carpathian Wildlife Research Station, Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences, Ogródowa 10, 38-700 Ustrzyki Dolne, Poland

Abstract

Noninvasive samples are of increasing importance to study wild populations. In this study, we investigate the applicability of urine samples as the sole source of DNA for routine noninvasive genetic monitoring of wildlife using wolves (*Canis lupus*) as an example. Within the scope of a long-term wolf population survey, we collected during winter snow tracking in Bieszczady Mountains, Poland 41 urine samples considered as utilizable for genetic analyses. DNA concentration was determined by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and six microsatellite loci were genotyped in threefold repeated genotyping experiments to assess the reliability of genetic analyses of urine. DNA concentration of 33 urine samples was successfully quantified and of 14 samples, we obtained congruent results for all analysed loci and all repeated genotyping experiments. The gender of urine samples was identified with a Y-chromosome-linked marker. Considering the high discovery rate of urine in conjunction with its genotype reliability, our study confirms that urine is a valuable source in noninvasive genetic monitoring. Additionally, preselection of samples via qPCR proved to be a powerful tool contributing to a beneficial cost-value ratio of genetic analyses by minimizing genotyping errors.

Keywords: individual molecular tracking, molecular sexing, qPCR, sampling efficiency, snow tracking, wolf

Received 14 May 2006; revision accepted 23 October 2006

Introduction

Noninvasive monitoring of wildlife using genetic data offers great opportunities to record information of endangered species. Scats, urine, hairs, feathers and regurgitates provide valuable sources of DNA. The noninvasive genetic approach is applied in various research on species differentiation (Dalen *et al.* 2004), population size and habitat use (Kohn *et al.* 1999; Lucchini *et al.* 2002), recolonization (Valiere *et al.* 2003), tracking of individuals and sexing (Constable *et al.* 2001; Murphy *et al.* 2003). Despite its usefulness, genotyping errors, i.e. allelic dropout and false alleles, need to be taken into account (Taberlet & Luikart 1999; Pompanon *et al.* 2005). These errors can lead to misinterpretation of genotypes (Taberlet *et al.* 1999) and sex (Murphy *et al.* 2003), and to

distorting results in population studies (Creel *et al.* 2003). With increasing relevance of the noninvasive approach, different methods such as the multiple-tube approach (Taberlet & Luikart 1999), the maximum-likelihood approach (Miller *et al.* 2002), the consensus-genotype approach (Valiere 2002) and the pairwise-mismatching method (Paetkau 2003) have been proposed to circumvent these errors or to avoid misinterpretation of genotypes, respectively. Morin *et al.* (2001) suggested the prescreening of template DNA via quantitative polymerase chain reaction (qPCR) to set threshold DNA contents, which allow the reduction of genotyping repetitions.

Faecal, hair and feather samples are widely recognized as source of DNA for genetic monitoring, however, only a few studies have shown that urine samples can support molecular genetic analysis (Vu *et al.* 1999; Valiere & Taberlet 2000; Hedmark *et al.* 2004). Using the example of wolves, we demonstrate that urine collected in the field has a

Correspondence: Ralph Kuehn, Fax: +49-8161-714615; E-mail: kuehn@wzw.tum.de

remarkable potential to be applied in routine noninvasive genetic monitoring and landscape genetics of wildlife.

Methods

During two winters of 2002 and 2003 we snow-tracked wolves (230 km in total) in three known wolf pack territories situated in the Bieszczady Mountains, Poland. The trackers followed wolf tracks, recorded wolf routes, counted the numbers of wolves and marked each urination and defaecation site with global positioning system (GPS) data logger. We stored and processed the GPS data in the ARCGIS 8.3 software and calculated track lengths, urination and defaecation frequencies. The number of wolves occupying given territory was estimated as a maximum number of individuals recorded during snow-tracking at once. Samples consisting of a mixture of snow and urine were collected only if the tracker was able to make a distinction according to footprints that only a single wolf had urinated in the site. The snow–urine mixture was stored frozen (−20 °C) in 50 mL tubes until DNA extraction.

DNA extraction was performed similarly to Valiere & Taberlet (2000). Briefly, DNA and cellular remains were precipitated from approximately 15 mL of urine–snow mixture by addition of 1.5 mL of sodium acetate (3 M; pH 5.2) and 33 mL of ethanol (99%). After incubation overnight at −20 °C, we pelleted the DNA by cold centrifugation (5500 g, 35 min, 6 °C). The DNA extraction was performed according to the manufacturer's protocol of the QIAamp Stool Minikit (QIAGEN) and DNA was finally eluted in 80- μ L elution buffer. This template volume is necessary for comprehensive genotyping studies with repetitions. Negative controls were included in the DNA extractions and all subsequent amplifications in order to monitor for contamination.

DNA concentration of each extract was determined by qPCR using the SYBR Green detection system in a LightCycler (Roche). qPCR enables the evaluation of the quantity of amplifiable DNA template. For the establishment of the qPCR we sequenced a wolf-specific amplicon of the dog microsatellite ZuBeCa65 (AJ 609292; Klukowska *et al.* 2004) and designed a new forward primer (5'-CAATGGACATCTGGGCTCTTT-3') in the repeat flanking region using PRIMER3 software (Rozen & Skaletsky 2000). This primer pair amplifies a shorter fragment (110 bp) by excluding the repeat region and therefore avoids misquantifications due to heterozygote signals. The use of these primers based on a microsatellite sequence allows a canine specific product differentiation by melting curve analysis (Ririe *et al.* 1997).

Amplifications of the qPCR were performed in 10- μ L reactions consisting of 3 mM MgCl₂, 1 μ L LightCycler mix (containing dNTPs, *Taq* polymerase), 0.1 μ M of each primer and 1.0 μ L template DNA. After an initial denaturation (15 s at 95 °C), the qPCR was carried out in 40 cycles (10 s

at 59 °C, 20 s at 72 °C and 3 s at 77 °C each) with a final continuous fluorescence acquisition (63 °C to 99 °C) for the melting curve analysis. Absolute quantification was conducted with external calibration using 17 dilutions (100 ng, 50 ng, 10 ng, 7.5 ng, 5 ng, 2.5 ng, 1 ng, 750 pg, 500 pg, 250 pg, 100 pg, 75 pg, 50 pg, 25 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg) of a tissue DNA standard, previously quantified by absorbance (A260) in a spectrophotometer. DNA concentrations were calculated from the slope and the Y-intercept (Y_{int}) from the trendline of this calibration curve with the formula: DNA amount = $10^{[(Ct - Y_{int})/slope]}$ with a trendline correlation coefficient of 0.97.

For genotyping analysis we used six microsatellite loci previously applied in a noninvasive wolf study (Lucchini *et al.* 2002) to test the applicability of urine in routine genetic monitoring of wolves. The microsatellite panel included three dinucleotides (CPH 2, CPH 4, CPH 8; Fredholm & Wintero 1995) and three tetranucleotides (FH 2079, FH 2088, FH 2096; Francisco *et al.* 1996). Amplification was carried out in a 15- μ L reaction volume containing 3 mM or 1.5 mM MgCl₂, respectively, 0.2 μ M dNTP, 1 \times reaction buffer, 0.04 μ g/ μ L bovine serum albumin, 0.2 μ M of each primer and 0.02 U Qbiogene *Taq* Polymerase. DNA template volume was 1.8 μ L. After an initial denaturation (3 min, 94 °C), amplification was performed in 40 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 59 °C (CPH 2, CPH 4, FH 2096), 58 °C (FH 2088, FH 2079), 57 °C (CPH 8), respectively, and 30 s at 72 °C, with a final elongation for 3 min at 72 °C. Each genotyping experiment was conducted with three independent PCR (i.e. three extractions/sample) on an ALFexpress II DNA Analyser (Amersham Pharmacia) in order to test the genotyping reliability.

The sex determination was performed in a multiplex PCR according to Kuehn *et al.* (2002). A fragment of the cytochrome *b* gene (375 bp) was amplified as internal positive control, while the amplification of an SRY gene fragment (150 bp) indicated male sex (primer: see Kuehn *et al.* 2002). The 15- μ L reaction volume contained 2 mM MgCl₂, 0.2 μ M dNTPs, 1 \times reaction buffer, 0.04 μ g/ μ L BSA, 0.2 μ M of each primer and 0.02 U Qbiogene *Taq*. A 3-min predenaturation step was followed by 35 cycles of amplification with 45 s at 94 °C, 45 s at 57 °C and 45 s at 72 °C with a final added 3-min extension step.

Results and Discussion

The overall urination frequency rate recorded during snow-tracking was 0.5 urination sites per kilometre when overall defaecation rate was 0.1 scat sites per kilometre. This finding is equivalent with results obtained in Bialowieza Forest, where urination rates were almost six times higher than defaecation frequencies (Zub *et al.* 2003). Forty-one of 122 urination sites (34%) trackers were sure that only one wolf had urinated in the site, and samples

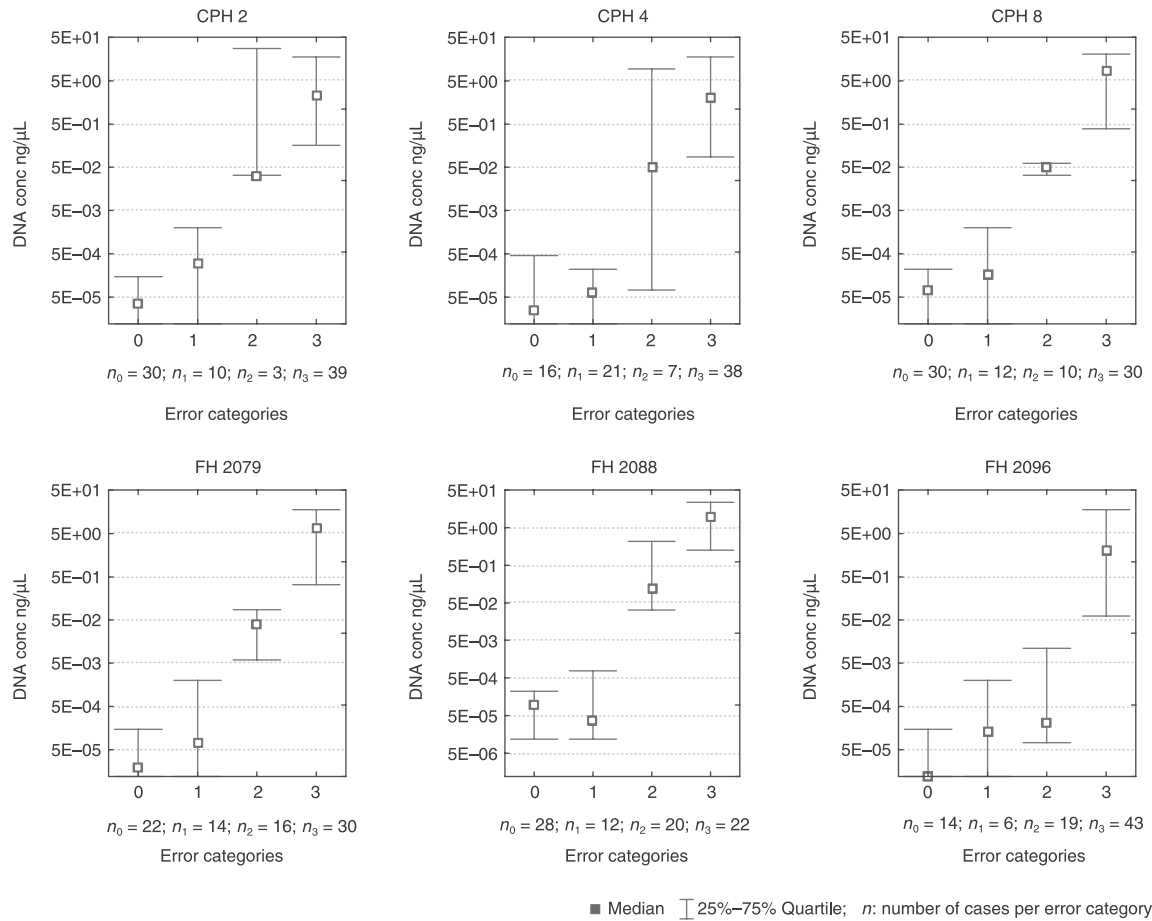


Fig. 1 Relationships between error rates at microsatellite loci and DNA concentration. Error category 0, no amplification; category 1, only one successful amplification or three different genotyping results; category 2, two congruent genotyping results with one failed amplification or one deviating result; category 3, three congruent genotyping results.

were collected for genetic analyses. Since only 22 scats were collected on the same tracks, the collection of utilizable urine samples for genotyping was twice as efficient as scat collection. The collection of urine samples consisting of a snow–urine mixture is restricted to species that can be monitored in areas with snowy winter, such as wolf, lynx, wolverine or fox. Nonetheless, the potential for noninvasive sampling of these species based on fresh scat samples during snow-free periods is also limited by low recovery rates of scats and their fast decomposition during nonfreezing temperatures.

The qPCR was successful for 33 samples (80%) with 4 samples containing less than 1 pg/μL (average 0.41 pg/μL, std 0.18 pg), 12 samples containing between 1 pg and 500 pg/μL (average 78 pg/μL, std 128 pg), 6 samples between 501 pg and 5.0 ng/μL (average 1.95 ng/μL, std 1.18 ng), 1 sample up to 50 ng (i.e. 18.1 ng/μL) and 10 samples more than 50 ng/μL (average 230 ng/μL, std 253 ng) DNA in the 80-μL eluate. Eight samples could not be amplified either due to PCR inhibitors or to the lack of wolf DNA. This

proportion of amplified urine samples at nuclear loci is higher than that published for faeces samples (Dallas *et al.* 2003; Prugh *et al.* 2005). However, species- and loci-related differences need to be considered in such a comparison. In addition, urine contains predominantly DNA of the correspondent individual (Yokota *et al.* 1998), and therefore, no dietary remains affect genetic analyses (see Murphy *et al.* 2003).

Because the true genotypes were unknown, the reliability of genotypes derived from urine samples is shown by the multiple-tube approach in four different error categories (Fig. 1, with n : allele-specific number of cases per error category). Category 0 contains those samples, which could not be amplified at all, while category 1 contains samples, of which we obtained only one amplicon (with two failed PCRs) or three differing results per allele. Urine samples that were found in these categories contained the least DNA concentrations. With increasing DNA concentration, we achieved two congruent results with one failed PCR or one deviating allele (category 2) or three congruent results

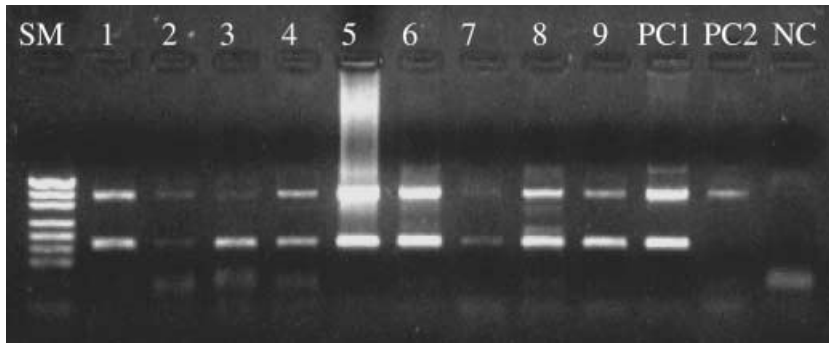


Fig. 2 Sex identification of nine confirmed genotypes found in urine samples. Upper band, cytochrome *b* (375 bp); lower band, SRY (157 bp); SM, size marker; PC1, male positive control; PC2, female positive control (both PC, tissue samples); NC, negative control.

(category 3) in the genotyping repetitions. In 738 PCR experiments, we obtained 58% positive amplifications. Allelic dropout occurred in four cases (2.1% of heterozygote genotypes) and false alleles in 18 genotypes (4.2% of positive amplifications). Therefore, the main factor influencing genotyping accuracy is the failure of amplification (308 cases). The proportion of positive PCRs and the error rates are within the ranges given by Broquet & Petit (2004). The average number of alleles was 4.2 alleles/locus and expected heterozygosity was 0.56.

We found that amplification and accuracy of obtained genotypes is dependent on the analysed loci. Loci with small allele sizes (CPH 2, mean allele length 97.5 bp; FH 2096 mean allele length 100.4 bp) have in tendency smaller values of the lower quartile in category 3 (*t*-test; $P = 0.074$) than long loci (CPH 8, mean allele length 208.1 bp; FH 2079 mean allele length 269.5 bp) with mean DNA concentrations of 96.4 pg/ μ L and 341 pg/ μ L, respectively. This result supports the findings of Buchan *et al.* (2005). With regard to microsatellite composition, there was no difference between di- and tetranucleotide loci (*t*-test, $P = 0.47$). A minimum DNA concentration of 160 pg/ μ L was required to obtain three congruent genotyping results (14 samples) at all loci of this panel of microsatellites. We determined nine distinct genotypes in these 14 samples, with one genotype found in two distinct samples and one in five samples. Accepting at least two congruent results (19 samples) a minimum DNA concentration of 32.6 pg/ μ L was required and we determined 14 different genotypes. The number of wolves occupying these three monitored territories counted on the basis of snow tracking records was 18.

The sex identification of individuals based on urine samples is a straightforward procedure, which is not affected by DNA of prey remains as observed in scats (Murphy *et al.* 2003). The nine genotypes of category 3 were exclusively determined as male wolves in repeated tests (Fig. 2). This result might be caused by the small number of samples, or it can be the evidence of the sex-biased urine marking behaviour of wolves (Harrington & Asa 2003). The behaviour caused bias has to be considered in particular using urine samples for calculating sex ratios in noninvasive genetic monitoring studies.

Conclusions

Though a small number of analysed samples, this study clearly shows the great potential of urine samples for noninvasive genetic monitoring in wildlife. Advantages of the sample collection lie in the higher discovery frequency of urine samples in snow and in the easy collection and storage of samples. With regard to laboratory procedures, urinary DNA is more easily extracted and analysed than faecal DNA because samples are more homogenous and contain no dietary DNA and less inhibitors. Through the determination of urinary DNA quality and quantity, the qPCR proves to be a valuable tool for a preselection of samples and contributes to more effective analyses with reduced genotyping errors. In addition, accurate and reproducible results in individual and gender identification are obtained. Possible gender specific differences in urination behaviour are still to be considered in the determination of population size and sex ratio from urine-derived DNA. High discovery rates and genotype reliability are the main requirements for sample material applied in noninvasive genetic monitoring analyses and it is not restricted to wolf monitoring, but can also be applied to all species depositing recognizable amounts of urine on snow.

Acknowledgements

This study is performed within the scope of the Bieszczady Wolf Project in the Polish Carpathians. Fieldwork was founded by the Polish National Committee for Scientific Research (KBN 6P04F 006). We thank P. Gorny for her great help in the laboratory and B. Brzezowska, S. Drevet, M. Januszczak, N. Schmidt for their help during fieldwork. We also thank B. Gum and Z. Banks for their comments on the manuscript. Special thanks go to J. Strasburg and three anonymous referees for their helpful comments and support on the manuscript.

References

- Broquet T, Petit E (2004) Quantifying genotyping errors in non-invasive population genetics. *Molecular Ecology*, **13**, 3601–3608.
- Buchan JC, Archie EA, Van Horn RC, Moss CJ, Alberts SC (2005) Locus effects and sources of error in noninvasive genotyping. *Molecular Ecology Notes*, **5**, 680–683.

- Constable JL, Ashley MV, Goodall J, Pusey AE (2001) Noninvasive paternity assignment in Gombe chimpanzees. *Molecular Ecology*, **10**, 1279–1300.
- Creel S, Spong G, Sands JL *et al.* (2003) Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology*, **12**, 2003–2009.
- Dalen L, Götherström A, Angerbjörn A (2004) Identifying species from pieces of faeces. *Conservation Genetics*, **5**, 109–111.
- Dallas JF, Coxon KE, Sykes T *et al.* (2003) Similar estimates of population genetic composition and sex ratio derived from carcasses and faeces of Eurasian otter *Lutra lutra*. *Molecular Ecology*, **12**, 275–282.
- Francisco LV, Langston AA, Mellersh CS, Neal CL, Ostrander EA (1996) A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome*, **7**, 359–362.
- Fredholm M, Wintero AK (1995) Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mammalian Genome*, **6**, 11–18.
- Harrington FH, Asa CS (2003) Wolf communication. In: *Wolves—Behavior, Ecology and Conservation* (eds Mech LD, Boitani L). The University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Hedmark E, Flagstad Ø, Segerström P *et al.* (2004) DNA-based individual and sex identification from wolverine (*Gulo gulo*) faeces and urine. *Conservation Genetics*, **5**, 405–410.
- Klukowska J, Szczerbal I, Rickli O *et al.* (2004) Seven bacterial artificial chromosome-derived canine microsatellite-linking physical and genetic maps. *Animal Genetics*, **35**, 252–253.
- Kohn MH, York EC, Kamradt DA *et al.* (1999) Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **266**, 657–663.
- Kuehn R, Schwab G, Schroeder W, Rottmann O (2002) Molecular sex diagnosis in Castoridae. *Zoo Biology*, **21**, 305–308.
- Lucchini V, Fabbri E, Marucco F *et al.* (2002) Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Molecular Ecology*, **11**, 857–868.
- Miller CR, Joyce P, Waits LP (2002) Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics*, **160**, 357–366.
- Morin PA, Chambers KE, Boesch C, Vigilant L (2001) Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology*, **10**, 1835–1844.
- Murphy MA, Waits LP, Kendall KC (2003) The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*). *Molecular Ecology*, **12**, 2261–2265.
- Paetkau D (2003) An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. *Molecular Ecology*, **12**, 1375–1387.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, **6**, 847–859.
- Prugh LR, Ritland CE, Arthur SM, Krebs CJ (2005) Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. *Molecular Ecology*, **14**, 1585–1596.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, **245**, 154–160.
- Rozen S, Skaletsky H (2000) PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, **132**, 365–386.
- Taberlet P, Luikart G (1999) Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**, 41–55.
- Taberlet P, Waits LP, Luikart G (1999) Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology & Evolution*, **14**, 323–327.
- Valiere N (2002) GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*, **10**, 1471–8278.
- Valiere N, Taberlet P (2000) Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Molecular Ecology*, **9**, 2150–2154.
- Valiere N, Fumagalli L, Gielly L *et al.* (2003) Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. *Animal Conservation*, **6**, 83–92.
- Vu NT, Chaturvedi AK, Canfield DV (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.
- Yokota M, Tatsumi N, Tsuda I, Takubo T, Hiyoshi M (1998) DNA extraction from human urinary sediment. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **12**, 88–91.
- Zub K, Theuerkauf J, Jedrzejewski W *et al.* (2003) Wolf pack territory marking in the Białowieża primeval forest (Poland). *Behaviour*, **140**, 635–648.

Anhang 2

Hausknecht R., Bayerl H., Gula R. und Kühn R. (in press). Application of quantitative real-time polymerase chain reaction for non-invasive genetic monitoring. *Journal of Wildlife Management* (in press).



Tools and Technology Article

Application of Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for Noninvasive Genetic Monitoring

ROLAND HAUSKNECHT, *Molecular Zoology Unit, Chair of Zoology, Technische Universitaet Muenchen, Hans-Carl-von-Carlowitz-Platz 2, 85354 Freising, Germany*

HELMUT BAYERL, *Molecular Zoology Unit, Chair of Zoology, Technische Universitaet Muenchen, Hans-Carl-von-Carlowitz-Platz 2, 85354 Freising, Germany*

ROMAN GULA, *Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences, Wilcza 64, PL-00679, Warsaw, Poland*

RALPH KUEHN,¹ *Molecular Zoology Unit, Chair of Zoology, Technische Universitaet Muenchen, Hans-Carl-von-Carlowitz-Platz 2, 85354 Freising, Germany*

1

ABSTRACT Noninvasive genetic monitoring of animal populations has become a widely used method in animal conservation and wildlife management due to its known advantages in sample availability of endangered or elusive species. A variety of methods have been suggested to overcome the difficulties of collecting reliable genetic data despite poor DNA quality and quantity of samples. We used quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) to quantify DNA contents and preselect extracts suitable for microsatellite genotyping of noninvasive samples from 2 carnivore species, wolf (*Canis lupus*) and Eurasian otter (*Lutra lutra*). We tested 2 concentration thresholds for DNA extracts containing either 5 pg/μL or 25 pg/μL at minimum and evaluated the effect of excluding samples from genotyping falling below either of these DNA concentrations. Depending on species and threshold concentration applied, we reduced the genotyping effort by 21% to 47% and genotyping errors by 7% to 45%, yet we could still detect 82% to 99% of available genotypes. Thus, qPCR may potentially reduce genotyping effort and enhance data reliability in noninvasive genetic studies. Genetic laboratories working on noninvasive population genetic studies could transfer this approach to other species, streamline genetic analyses and, thus, provide more efficiently wildlife managers with reliable genetic data of wild populations.

KEY WORDS *Canis lupus*, genetic monitoring, genotyping errors, *Lutra lutra*, noninvasive sampling, quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR).

Noninvasive genetic monitoring of animals is an attractive approach by which to study wild populations, because it precludes the necessity for directly observing or disturbing animals of interest (Taberlet et al. 1999). This approach is being increasingly applied to numerous species and research questions (Waits and Paetkau 2005, Broquet et al. 2007) even though pilot studies have been recommended setting appropriate laboratory procedures (e.g., appropriate markers, necessary samples sizes, quality controls; Pompanon et al. 2005, Valière et al. 2007).

The inherent challenges of noninvasive monitoring, such as the occurrence of genotyping errors, are widely acknowledged (Bonin et al. 2004, Broquet and Petit 2004, McKelvey and Schwartz 2004, Pompanon et al. 2005, Waits and Paetkau 2005). Several methods to circumvent these difficulties have been described, including sample storage and DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR), and replicated genotyping, as well as postlaboratory procedures such as evaluation of genotyping results and testing for errors or data inconsistencies (e.g., DeWoody et al. 2006, Beja-Pereira et al. 2009).

Quantification of DNA from noninvasive samples was suggested (Taberlet and Luikart 1999), among other approaches to facilitate noninvasive studies (e.g., Piggott et al. 2004, Hansen et al. 2008), because a correlation between low DNA concentration in extracts and the extent of genotyping errors was revealed in a simulation study by

Taberlet et al. (1996). This correlation was later confirmed experimentally in different species and was also used to adjust the number of genotyping repetitions to different categories of initial DNA template amounts (Morin et al. 2001, Geist et al. 2008, Arandjelovic et al. 2009, Hausknecht et al. 2009).

Furthermore, DNA quantification may be performed on a preselection of samples before genotyping analyses to exclude from further analyses unsuitable samples that fall below a certain DNA concentration threshold. However, it is unknown how a preselection of samples affects efficiency of noninvasive genetic studies in terms of genotyping effort and accuracy.

Therefore, our goal was to apply quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) to many noninvasively collected samples of 2 carnivore species and to investigate its suitability for preselecting samples exceeding a certain amount of template DNA, thereby reducing both genotyping errors and genotyping effort. To address this goal, we 1) quantified the amount of DNA in fecal and urine samples of wolves (*Canis lupus*) and Eurasian otters (*Lutra lutra*), 2) genotyped these samples repeatedly at 6 or 10 microsatellite loci, respectively, and 3) contrasted genotyping results of the entire set of analyzed samples with those of a subset of samples exceeding given threshold DNA concentrations.

STUDY AREA

Fecal and urinary samples of wolves were collected in the eastern part of Polish Carpathian Mountains in southeast-

¹ E-mail: kuehn@wzw.tum.de

ern Poland (Hausknecht et al. 2007, Gula 2008). We collected fecal samples of otters from 2 areas in the Bavarian Forest in Germany. There we chose one sampling area in the catchment area of the river Schwarzer Regen and a second one about 50 km southeast in the catchment area of the river Großer Michelbach. In each sampling area, we included one fish farm for sampling.

METHODS

We collected wolf samples during snow-tracking and radiotelemetry of wolves from 5 packs (Hausknecht et al. 2007, Theuerkauf et al. 2007, Gula 2008) and otter samples at fixed control points set mainly under bridges, using only freshly deposited spraints from the previous night. To avoid DNA cross-contamination between samples, we only collected spraints or parts of spraints that had no physical contact with other spraints. In total, we examined 197 noninvasive wolf (73 urine and 124 fecal samples) and 142 noninvasive otter samples (58 anal jelly [secretion of the anal glands] and 84 fecal samples). We extracted fecal and jelly samples with a slightly modified protocol of the QIAamp[®] DNA Stool MiniKit (QIAGEN, Hilden, Germany; Qiagen 2007), whereas we extracted DNA from urinary samples as described in Hausknecht et al. (2007). We eluted urinary and fecal DNA of wolf samples in 80 μ L or 100 μ L elution buffer, respectively, whereas we eluted otter DNA from fecal and jelly samples in 120 μ L.

We quantified DNA concentrations of extracts by qPCR using a SYBR Green-based assay in a LightCycler[®] 1.0 Instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). We improved a previous quantification protocol for wolf samples (Hausknecht et al. 2007) by omitting MgCl₂ from the reaction mix and applying the following cycling conditions: initial denaturation for 10 minutes at 95° C; 40 cycles (15 sec at 95° C, 10 sec at 59° C, and 20 sec at 72° C) with single fluorescence acquisition at 78° C at the end of each cycle, and a final melting-curve analysis with continuous fluorescence acquisition (63–99° C). We conducted qPCR for otter samples as touchdown PCR in 45 cycles (15 sec at 95° C, 10 sec starting at 65° C and decreasing 1° C/cycle to 57° C, 20 sec at 72° C, and single fluorescence acquisition at 74° C) after initial denaturation (10 min at 95° C), and followed by final melting-curve analysis (65° C to 95° C).

The reaction mix for wolf samples consisted of 1 μ L LightCycler mix (LightCycler[®] FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I; Roche Applied Science), 0.1 μ M of the ZuBeCa65 primer system (Hausknecht et al. 2007), and 1.0 μ L template DNA in a total volume of 10 μ L. For otter samples we established a new primer system (LutRT2) in the repeat flanking region of the microsatellite locus Lut615 (Dallas and Piertney 1998; GenBank Accession no. Y16301.1) and designed primers using PRIMER3 software (Rozen and Skaletsky 2000). Primer sequences were: 5'-CTTTGATCTCCCATGCAAAA-3' (forward) and 5'-ACAGGCCAGTTCAACAAAC-3' (reverse). We performed amplifications in 10- μ L reaction mixes containing 2 μ L LightCycler mix (LightCycler[®] FastStart

DNA MasterPLUS SYBR Green I; Roche Applied Science), 0.04 mg/mL bovine serum albumine, 0.2 μ M of each primer, and 1.0 μ L template DNA.

We performed an absolute quantification with external calibration curves obtained from the 3-fold quantification of 11 standards with known DNA concentrations of the respective species (according to Hausknecht et al. 2009; wolf: $y = -3.990x + 39.162$, $R^2 = 0.996$; otter: $y = -3.954x + 44.999$, $R^2 = 0.996$). We then determined DNA concentration of extracts using the equation in Morin et al. (2001).

We genotyped wolf samples at 6 microsatellite loci as described in Hausknecht et al. (2007) and otter samples at 10 microsatellite loci established by Dallas and Piertney (1998; see Table 1). To ensure genotyping reliability, we repeated genotyping experiments 2–5 times from independent PCR reactions until we observed each allele for homozygote or heterozygote genotypes at least twice (twice for heterozygote or 3 times for homozygote genotypes, respectively). We performed genotyping on an ALFexpress II DNA Analyser (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) for wolf and on an ABI Prism 377 DNA sequencer (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Germany) for otter samples. We scored alleles in reference to internal size standards and reference samples with known genotypes using Allelelinks 1.02 software (Amersham Biosciences) for wolf samples and GENESCAN[®] 3.1.2 and GENOTYPER[®] 2.5 software (Applied Biosystems, Foster City, CA) for otter samples.

We based quantification of genotyping errors on consensus genotypes we obtained from repeated genotyping. We used equations from Broquet and Petit (2004) to calculate rates of false alleles (FA) and allelic dropout (ADO) and from Pompanon et al. (2005) to estimate rates of mismatching alleles. We determined the number of distinct genotypes based on complete multilocus genotypes (i.e., successful amplification at all applied loci for wolf and at 9–10 loci for otter) with the Program GIMLET 1.3.3 (Valière 2002) and determined matching pairs of genotypes or pairs deviating at only one allele with GeneCap 1.2.2 (Wilberg and Dreher 2004). We combined most samples deviating in only one allele because we could confirm the particular multilocus genotype in multiple samples (see Waits and Paetkau 2005).

To analyze the effect of applying threshold DNA concentrations on genotyping success and effort, we 1) determined the rate of PCRs with successful amplifications and genotyping errors for the entire sample set of both species (wolf $n = 197$ samples; otter $n = 142$ samples), 2) eliminated samples below a chosen threshold value, and 3) recalculated the rate of successful amplification and genotyping errors for samples above these thresholds. Morin et al. (2001) excluded samples with particularly low DNA concentrations (<5 pg/ μ L DNA in the extract) and recommended criteria for genotyping repetitions for different categories of initial DNA template amounts (e.g., no usage of samples with <25 pg DNA/reaction, equivalent to 12.5 pg DNA in the extract). Thus, we tested 2 thresholds

Table 1. Applied microsatellite loci for genotyping analyses of wolf and otter samples, range of allele lengths (base pairs [bp]), and calculated proportions of successful polymerase chain reaction (PCR), false alleles (FA), allelic dropout (ADO; for heterozygote loci), mean allelic error rate, and respective standard deviations. We collected wolf samples in the eastern part of Polish Carpathian Mountains and otter samples in Bavarian Forest, Germany, 2002–2008.

Locus	Range of allele lengths (bp)	Successful PCR (%)	Rate of FA ^a (%)	Rate of ADO ^a (%)	Mean allelic error rate ^b (%)
Wolf (<i>n</i> = 197)					
CPH2	94–106	80.4	9.5	4.5	8.4
CPH4	140–148	65.5	11.9	7.9	11.6
CPH8	198–214	61.1	8.9	13.3	10.1
FH2079	268–284	55.8	2.7	18.2	4.8
FH2088	92–132	60.9	8.3	7.7	8.9
FH2096	96–108	71.9	10.1	6.5	8.8
Overall		65.9	8.8	8.3	8.9
SD		8.9	3.1	5.1	2.3
Otter (<i>n</i> = 142)					
Lut435	120–146	76.6	2.0	24.7	4.2
Lut453	108–134	72.1	6.7	18.7	9.3
Lut457	180–190	67.6	4.1	17.2	5.0
Lut604	103–138	68.9	1.9	21.4	10.4
Lut615	238–256	55.6	5.9	25.4	11.0
Lut715	197–209	57.7	0.4	20.4	7.5
Lut717	175–203	62.1	0.7	17.2	4.0
Lut733	158–180	67.4	1.9	31.7	10.8
Lut832	166–198	61.2	2.1	23.0	8.6
Lut833	129–171	66.2	0.7	22.8	5.6
Overall		65.4	2.7	22.4	7.6
SD		6.5	2.2	4.4	2.8

^a Eq from Broquet and Petit (2004).

^b Eq from Pompanon et al. (2005).

referring to the template DNA concentration in the extracts: a lower threshold of 5 pg/μL and 25 pg/μL DNA (twice the content Morin et al. [2001] suggested to exclude). We used Statistica 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK) to calculate correlations between DNA concentration and amplification success or mismatching alleles, respectively, and to analyze distribution of rates of successful PCR and genotyping errors among sample sets.

RESULTS

We detected nuclear DNA of the respective species in 145 wolf (74%) and 117 otter DNA extracts (82%; Fig. 1). Of 78 wolf samples, 52 contained no measurable DNA and 26 contained <5 pg/μL DNA (\bar{x} = 1.4 pg/μL, SD = 1.2 pg/μL). Fifteen wolf samples contained 5–25 pg/μL (\bar{x} = 10.3 pg/μL, SD = 5.9 pg/μL), whereas 104 samples contained >25 pg/μL (\bar{x} = 25 ng/μL, SD = 104 ng/μL, median = 414 pg/μL). Of otter samples, 25 contained no measurable DNA and 5 contained <5 pg/μL (\bar{x} = 4.3 pg/μL, SD = 0.6 pg/μL), whereas 27 extracts contained 5–25 pg/μL (\bar{x} = 14.6 pg/μL, SD = 5.8 pg/μL) and 85 contained >25 pg/μL (\bar{x} = 456.2 pg/μL, SD = 1,397.5 pg/μL, median = 75.6 pg/μL). In total, of wolf and otter samples, 40% and 21%, respectively, fell below the 5 pg/μL threshold, 7% and 19%, respectively, contained 5–25 pg/μL, and 53% and 60%, respectively, exceeded the 25 pg/μL threshold.

We detected genotyping errors for both species by constructing consensus genotypes from repeated genotyping experiments of all wolf (*n* = 197) and otter samples (*n* = 142) at 6 and 10 microsatellite loci, respectively. Based on 2,338 successful amplifications for wolf samples and 3,032

for otter samples, we determined the extent of genotyping errors for both species and the applied loci (Table 1). Although the mean rate of successful PCR for all loci was between 56% and 80% for both species, genotyping error rates differed among loci. For wolf samples, we observed a similar rate of FA and ADO (heterozygous genotypes only), whereas ADO of otter samples exceeded the rate of FA. Because rates of ADO and FA are not directly comparable between studies, we also determined the rate of mismatching alleles (i.e., ratio of the no. of deviating alleles from repeated genotypes to the no. of replicated alleles;

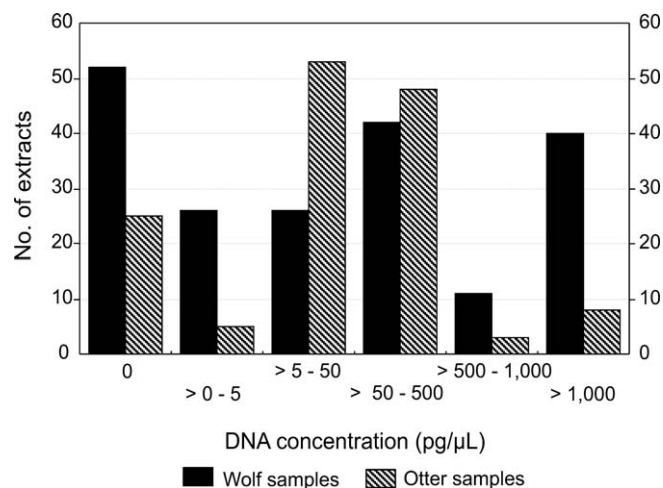


Figure 1. Distribution of DNA concentration according to their frequency per DNA class of 197 wolf and 142 otter samples collected noninvasively, in the eastern part of Polish Carpathian Mountains, and in Bavarian Forest, Germany, 2002–2008.

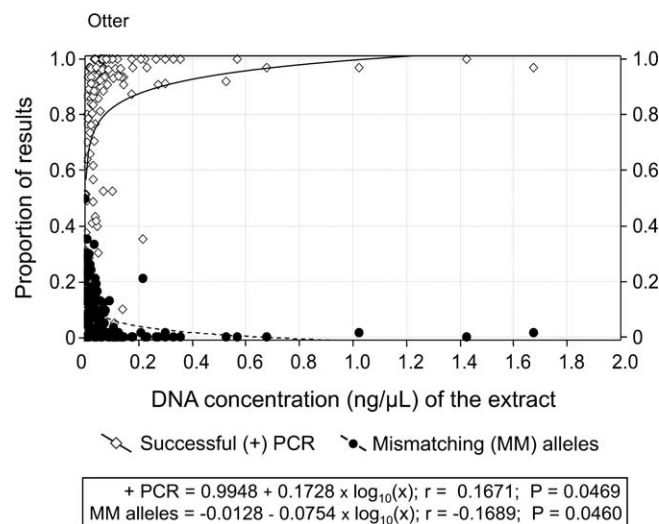
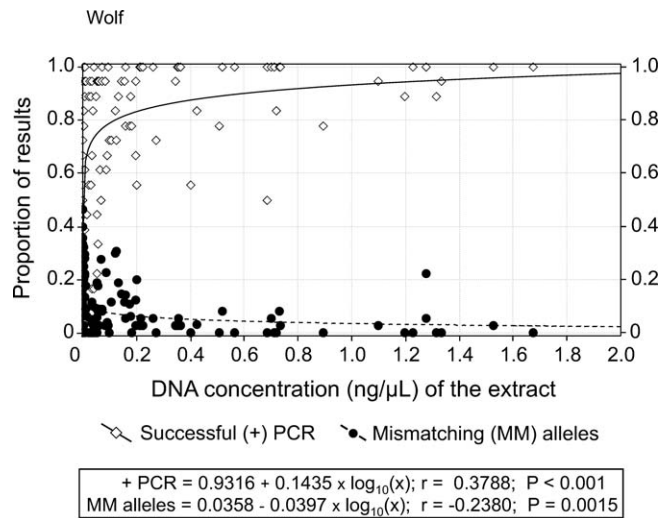


Figure 2. Dependence of amplification success (polymerase chain reaction [PCR]; hollow diamonds) and proportion of allelic mismatches (dots) on DNA concentration of the corresponding extract over all genotyped microsatellite loci, for wolf and otter samples. Each point represents one extract (<10 ng/μL DNA concentration) that we amplified and genotyped independently for 6 or 10 loci, for wolves and otters, respectively. We noninvasively collected wolf samples in the eastern part of Polish Carpathian Mountains, and otter samples in Bavarian Forest, Germany, 2002–2008.

Pompanon et al. 2005). In 4,676 replicated wolf alleles and 6,064 otter alleles, we found 414 (8.9%) and 461 (7.6%) deviating alleles, respectively, due to the loss of single alleles in heterozygous genotypes or the occurrence of FA.

We correlated initial template DNA concentration with the proportion of successful amplifications and mismatching alleles (Fig. 2). With increasing template DNA concentration, we obtained in both species increasing rates of successful PCR and decreasing rates of genotyping errors, leading to more reliable genotypes.

The introduction of DNA threshold values at 5 pg/μL and 25 pg/μL DNA in the extract led to increased PCR success and to decreased error rates compared to the entire sample

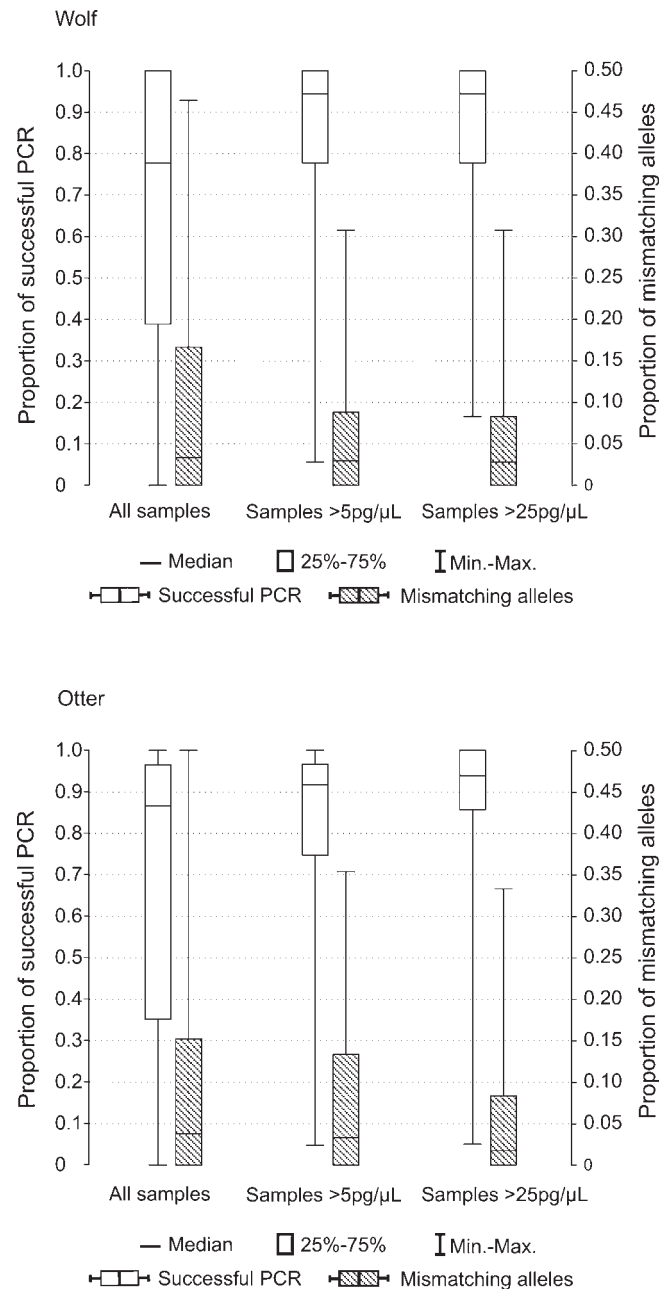


Figure 3. Proportion of successful amplifications (polymerase chain reaction [PCR]) and mismatching alleles shown with medians and corresponding quartiles for all genotyped wolf and otter samples and for those samples >5 pg/μL and >25 pg/μL DNA in the extract. We also show minimum and maximum values. We collected wolf samples in the eastern part of Polish Carpathian Mountains and otter samples in Bavarian Forest, Germany, 2002–2008.

set (Fig. 3). By excluding samples containing less extract DNA than threshold values, rates of successful amplifications increased in wolf samples from 66% to 85% at the 5-pg threshold or 87% at the 25-pg threshold, whereas it increased in otter samples from 65% to 78% or 83% at the 5- and 25-pg thresholds, respectively. Median of PCR success increased in wolf samples from 77% to 94% (Fig. 3). In otter samples, median values for successful amplification increased from 87% to 94%. The rate of genotyping errors decreased in both species with exclusion of low-quality

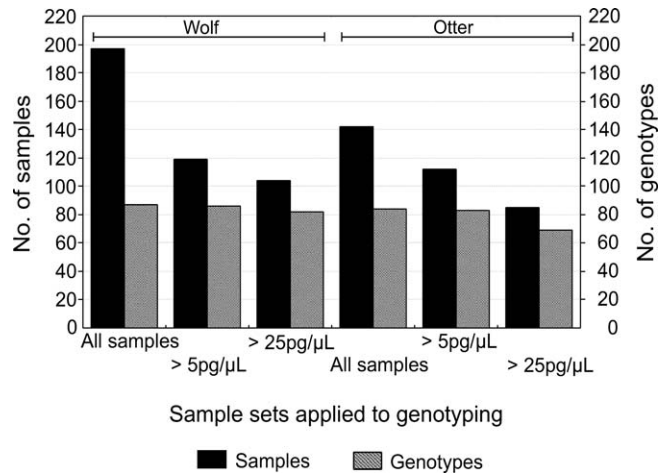


Figure 4. Number of samples and distinct genotypes we obtained from repeated genotyping for all wolf and otter samples and for those samples exceeding DNA threshold values of 5pg/μL and 25pg/μL DNA in the extract. We collected wolf samples in the eastern part of Polish Carpathian Mountains and otter samples in Bavarian Forest, Germany, 2002–2008.

samples. In wolf samples the rate of mismatching alleles decreased from 8.9% for all samples (2,338 PCR reactions) to 6.0% at the 5-pg threshold (1,812 reactions) and to 4.9% at the 25-pg threshold (1,628 reactions), as did the rates of ADO (8.3% to 7.6% and 7.5%, respectively) and FA (8.8% to 5.4% and 4.0%, respectively). In otter samples we observed a similar reduction of genotyping errors; the rate of mismatching alleles decreased from 7.6% (3,032 PCR reactions) to 7.1% (2,777 reactions) and 4.4% (2,191 reactions) at the 5- and 25-pg thresholds, respectively. Similarly, the rate of ADO declined from 22.4% in the entire set of samples to 19.9% and 13.1% above the 5- and 25-pg thresholds, respectively (FA: 2.6% to 2.5% and 1.5%, respectively). Median of mismatching alleles decreased in wolf samples from 3.3% to 2.8% and in otter samples from 3.8% to 1.7% (Fig. 3).

We observed a potential for reducing genotyping effort by preselecting samples with threshold DNA concentrations (Fig. 4). After repeated genotyping we obtained 87 complete genotypes from 197 analyzed wolf samples. Excluding samples containing <5 pg/μL in the DNA extract reduced the number of wolf samples by 40% ($n_{\text{samples}} = 119$), whereas 99% of available genotypes ($n_{\text{genotypes}} = 86$) were retained. Extending the threshold concentration to 25 pg/μL led to a further reduction of samples ($n_{\text{samples}} = 104$; 53%); however, we still detected 82 genotypes (94%). Thus, we improved the ratio between numbers of detected genotypes and analyzed samples from 0.44 to 0.72 and 0.79 for samples containing >5 pg/μL and >25 pg/μL extract DNA, respectively. For otter samples we observed similar results; application of >5 pg/μL and >25 pg/μL DNA thresholds reduced genotyping effort from 142 samples (containing 84 obtained genotypes) to only 112 (79%) and 85 (60%) samples, respectively, whereas we still recorded 99% ($n_{\text{genotypes}} = 83$) and 82% of genotypes ($n_{\text{genotypes}} = 69$), respectively. Thus, with otters, we were able to optimize genotyping effort by improving the ratio between obtained

genotypes to analyzed samples from 0.59 to 0.74 and 0.81, with the 5- and 25-pg DNA thresholds, respectively.

DISCUSSION

One major challenge in noninvasive genetic analyses is lower DNA quality and quantity of samples than in traditional collection methods (Pompanon et al. 2005). Distribution of DNA contents we observed showed that most noninvasive samples contained low to very low amounts of DNA, which concurs with previous findings of DNA quantification (Morin et al. 2001, Nsubuga et al. 2004, Hausknecht et al. 2009). Our amplification success rates were within the range or above those found in other wolf and otter studies (Lucchini et al. 2002: 53%, Arrendal 2007: 63%, Lampa et al. 2008: 27–80%; see Broquet et al. 2007 for a review).

Broquet et al. (2007) also demonstrated that the extent of genotyping errors varies between species, sample material, and applied genetic marker systems. Initial error rates we found for all wolf samples were still within the range of previous wolf studies (Scandura et al. 2006: ADO 5.6%, FA 2.4%; Lucchini et al. 2002: ADO 3–33%). Similarly, error rates we found in otter samples were comparable to those of Hájková et al. (2006; ADO 18.5%, FA <1%) and Lampa et al. (2008; ADO 27%, FA 0%).

We confirmed the correlation between lower DNA concentrations and increased genotyping errors. We obtained more reliable data with increasing DNA concentration, as was recently shown for herbivore and omnivore species as well (Arandjelovic et al. 2009, Hausknecht et al. 2009). This correlation, originally revealed by simulation (Taberlet et al. 1996) and now shown for a variety of species, evidently represents a general characteristic of noninvasive samples independent of the corresponding species or their diet. Samples with low DNA concentrations revealed low amplification success in both species and were more error-prone than samples of high DNA content. Thus, we were able to improve overall genotyping results by excluding those error-prone samples.

Exclusion of samples improved not only genotyping results, but it also reduced genotyping effort at the 5-pg threshold by 21% (otter) and 40% (wolf) and at the 25-pg threshold by 40% (otter) and 47% (wolf). Thus, qPCR could be applied as a preselection tool to separate samples with no or very low amounts of DNA from those containing enough DNA to be genotyped.

Previous recommendations for repeated genotyping (multiple-tubes approach; Taberlet et al. 1996), pre- or multiplex amplification procedures (Piggott et al. 2004, Luikart et al. 2008), or adjusted genotyping repetitions to certain categories of DNA concentration (Arandjelovic et al. 2009) remain unaffected by our suggested preselection of samples. By applying a comparatively low level of threshold DNA, we avoided losing too many potentially suitable samples (loss: 1 and 5 in wolf and 1 and 15 in otter at the 5- and 25-pg DNA thresholds, respectively). However, repeated genotyping was still required to ensure reliability of multilocus genotypes, because some samples in both species were still characterized by low PCR success or

considerable rates of mismatching alleles, although DNA contents of those samples exceeded our threshold levels (see min. values in Fig. 3).

Pretests to determine sample suitability are described in other studies to ensure that samples originate from the species of interest (e.g., Bellemain et al. 2005) or contain adequate amounts of target DNA before genotyping is started (Ball et al. 2007). We refined such a test as previously suggested (Morin et al. 2001, Hausknecht et al. 2009). First, our DNA quantification comprised a single-step protocol to determine DNA amounts of our target species. Second, by excluding samples containing no measurable DNA or DNA in very low concentrations, we avoided genotyping samples that would not yield complete genotypes.

Exclusion of samples, however, must be deliberated carefully. First of all, DNA threshold values for exclusion of samples should be defined for each species and corresponding sampling scheme anew. The type of sample material (e.g., urine, carnivore, or ungulate feces) as well as weather condition or season during which sampling is carried out (e.g., winter vs. yr-round sampling) could affect overall sample quality and corresponding DNA threshold values. Potential biases arising from differing sample quality between seasons, study sites, or populations should be detected beforehand to avoid under-representation of populations or distortion of biological inferences of population data. To ensure cost- and time-effectiveness as well as data quality, it is crucial to choose an appropriately low DNA threshold assuring that only the most error-prone samples will be rejected. Because the quantitative PCR is a single-step procedure of DNA quality evaluation, it can quickly reveal potential inconsistencies of sample quality among different study sites and allows a prompt adaptation of sampling strategy if necessary.

MANAGEMENT IMPLICATIONS

Detection and avoidance of genotyping errors make noninvasive studies more difficult and time-consuming than studies using high-quality DNA. Because most species to which noninvasive sampling is applied are endangered and deserve special attention (e.g., as conservation or management strategies), it is of great importance to produce reliable data. Because funding is usually limited in nature conservation, time-, and cost-efficiency is critical. Genotyping effort and genotyping errors can be substantially reduced through exclusion of samples with particularly low DNA content using qPCR. We recommend application of qPCR to evaluate sample quality in those population genetic studies that are based on noninvasive or other samples containing low amounts of DNA. Thus, most of the designated budget can be spent on analyzing samples that provide the most reliable data.

ACKNOWLEDGMENTS

Genetic analyses were financially supported by the Molecular Zoology Unit, Chair of Zoology, Technische Universität München and by the Bavarian State Ministry of

Agriculture and Forestry. Genetic analyses on Eurasian otters were performed within the project 'Wildlife and human dimensions in the border triangle Bavaria, Czech Republic, Austria using otters as an example (Wildtier und Mensch im Dreiländereck Bayern, Tschechien, Österreich am Beispiel des Fischotters)' organized by the Bavarian Forest Institute (Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft; LWF). We thank C. Ludt and R. Schreiber for their cooperation and T. Fesl and P. Aschenbrenner for permission within their fish farms to sample otter spraints. Collection of noninvasive wolf samples was performed within the Bieszczady Wolf Project in the Polish Carpathians and was funded by the Polish National Committee for Scientific Research (KBN 6P04F 006) and the Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences. We appreciate the technical support of M. Barreteau, B. Brzezowska, M. Diemert, S. Drevet, J. Eggermann, M. Januszczak, M. Le Peutrec, L. Lichtenberg, K. Meyer, B. Pirga, S. Rouys, N. Schmidt, J. Theuerkauf, and H. Tsunoda in Poland as well as N. Hahn and M. Friedrich in Bavaria for collection of wolf and otter samples. We further appreciate the support of H. Hiller, N. Bernhard, G. Schwabedissen and E. Siegl in the laboratory. We also thank U. Kuehn, K. McKelvey and 2 anonymous reviewers for helpful comments on an earlier version of the manuscript.

LITERATURE CITED

- Arandjelovic, M., K. Guschanski, G. Schubert, T. R. Harris, O. Thalmann, H. Siedel, and L. Vigilant. 2009. Two-step multiplex polymerase chain reaction improves the speed and accuracy of genotyping using DNA from noninvasive and museum samples. *Molecular Ecology Resources* 9:28–36.
- Arrendal, J. 2007. Conservation genetics of the Eurasian otter in Sweden. Dissertation, University of Uppsala, Uppsala, Sweden.
- Ball, M. C., R. Pither, M. Manseau, J. Clark, S. D. Petersen, S. Kingston, N. Morrill, and P. Wilson. 2007. Characterization of target nuclear DNA from faeces reduces technical issues associated with the assumption of low-quality and quantity template. *Conservation Genetics* 8:577–586.
- Beja-Pereira, A., R. Oliveira, P. C. Alves, M. K. Schwartz, and G. Luikart. 2009. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources* 9:1279–1301.
- Bellemain, E., J. E. Swenson, D. Tallmon, S. Brunberg, and P. Taberlet. 2005. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: four methods for Brown bears. *Conservation Biology* 19:150–161.
- Bonin, A., E. Bellemain, P. Bronken Eidesen, F. Pompanon, C. Brochmann, and P. Taberlet. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* 13:3261–3273.
- Broquet, T., N. Ménard, and E. Petit. 2007. Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conservation Genetics* 8:249–260.
- Broquet, T., and E. Petit. 2004. Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics. *Molecular Ecology* 13:3601–3608.
- Dallas, J. F., and S. B. Pieltney. 1998. Microsatellite primers for the Eurasian otter. *Molecular Ecology* 7:1248–1251.
- DeWoody, J., J. D. Nason, and V. D. Hipkins. 2006. Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. *Molecular Ecology Notes* 6:951–957.
- Geist, J., H. Wunderlich, and R. Kuehn. 2008. Use of mollusc shells for DNA-based molecular analyses. *Journal of Molluscan Studies* 74:337–343.
- Gula, R. 2008. Wolf depredation on domestic animals in the Polish Carpathian Mountains. *Journal of Wildlife Management* 72:283–289.

- Hájková, P., B. Zemanová, J. Bryja, B. Hájek, K. Roche, E. Tkadlec, and J. Zima. 2006. Factors affecting success of PCR amplification of microsatellite loci from otter faeces. *Molecular Ecology Notes* 6:559–562.
- Hansen, H., M. Ben-David, and D. B. McDonald. 2008. Effects of genotyping protocols on success and errors in identifying individual river otters (*Lontra canadensis*) from their faeces. *Molecular Ecology Notes* 8:282–289.
- Hausknecht, R., R. Gula, B. Pirga, and R. Kuehn. 2007. Urine—a source for noninvasive genetic monitoring in wildlife. *Molecular Ecology Notes* 7:208–212.
- Hausknecht, R., K. Salzer, F. Filli, and R. Kuehn. 2009. Techniques for noninvasive genetic monitoring of alpine ibex *Capra ibex*. *Acta Theriologica* 54:277–287.
- Lampa, S., B. Gruber, K. Henle, and M. Hoehn. 2008. An optimisation approach to increase DNA amplification success of otter faeces. *Conservation Genetics* 9:201–210.
- Lucchini, V., E. Fabbri, F. Marucco, S. Ricci, L. Boitani, and E. Randi. 2002. Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Molecular Ecology* 11:857–868.
- Luikart, G., S. Zundel, D. Rioux, C. Miquel, K. A. Kaeating, J. T. Hogg, B. Steele, K. Foresman, and P. Taberlet. 2008. Low genotyping error rates and noninvasive sampling in Bighorn sheep. *Journal of Wildlife Management* 72:299–304.
- McKelvey, K. S., and M. K. Schwartz. 2004. Genetic errors associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. *Journal of Wildlife Management* 68:439–448.
- Morin, P. A., K. E. Chambers, C. Boesch, and L. Vigilant. 2001. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology* 10:1835–1844.
- Nsubuga, A. M., M. M. Robbins, A. D. Roeder, P. A. Morin, C. Boesch, and L. Vigilant. 2004. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Molecular Ecology* 13:2089–2094.
- Piggott, M. P., E. Bellemain, P. Taberlet, and A. C. Taylor. 2004. A multiplex pre-amplification method that significantly improves microsatellite amplification and error rates for faecal DNA in limiting conditions. *Conservation Genetics* 5:417–420.
- Pompanon, F., A. Bonin, E. Bellemain, and P. Taberlet. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* 6:847–859.
- Qiagen. 2007. QIAamp® DNA stool handbook for DNA purification from stool samples. Qiagen GmbH, Hilden, Germany.
- Rozen, S., and H. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 132:365–386.
- Scandura, M., C. Capitani, L. Iacolina, and A. Marco. 2006. An empirical approach for reliable microsatellite genotyping of wolf DNA from multiple noninvasive sources. *Conservation Genetics* 7:813–823.
- Taberlet, P., S. Griffin, B. Goossens, S. Questiau, V. Manceau, N. Escaravage, L. P. Waits, and J. Bouvet. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 24:3189–3194.
- Taberlet, P., and G. Luikart. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society* 68:41–55.
- Taberlet, P., L. P. Waits, and G. Luikart. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* 14:323–327.
- Theuerkauf, J., R. Gula, B. Pirga, H. Tsunoda, J. Eggermann, B. Brzezowska, S. Rouys, and S. Radler. 2007. Human impact on wolf activity in the Bieszczady Mountains, SE Poland. *Annales Zoologici Fennici* 44:225–231.
- Valière, N. 2002. GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* 2:377–379.
- Valière, N., C. Bonenfant, C. Toïgo, G. Luikart, J.-M. Gaillard, and F. Klein. 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.
- Waits, L. P., and D. Paetkau. 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.
- Wilberg, M. J., and B. P. Dreher. 2004. GENECAP: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture–recapture population estimation. *Molecular Ecology Notes* 4:783–785.

Associate Editor: McKelvey.

Anhang 3

Gula R., **Hausknecht R.** und Kühn R. (2009). Evidence of wolf dispersal in anthropogenic habitats of the Polish Carpathian Mountains. *Biodiversity and Conservation* 18: 2173-2184.

Evidence of wolf dispersal in anthropogenic habitats of the Polish Carpathian Mountains

Roman Gula · Roland Hausknecht · Ralph Kuehn

Received: 21 May 2008 / Accepted: 20 January 2009 / Published online: 3 February 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract In the course of their maturation, most young wolves leave their natal pack and disperse in search for mating partners, improved food availability and new territories. We investigated whether this dispersal is affected by anthropogenic infrastructure in a 5,000 km² area of the eastern region of the Polish Carpathian Mountains occupied by wolves. A radio-collared male wolf covered 230 km while dispersing through forested hills and densely populated valleys. To test if such dispersal is common in the population we analysed by microsatellite genotyping 39 samples taken from live-trapped wolves or wolves found dead in the study area. Although the obtained genotypes were assigned to different clusters in Bayesian tests, we could not ascribe this structure to landscape features, but rather to shared ancestry of wolf individuals found in distant locations. Moreover, we could not detect a spatial genetic structure in the wolf population, indicating a random occurrence of genotypes within the study area. Observation of the dispersing wolf and the absence of spatial genetic structure imply that wolves are still able to roam the entire area despite high densities of roads and a dense human population. Thus, we concluded that the existing anthropogenic infrastructure does not restrict wolf dispersal in the area and the studied wolves represent a coherent part of the Polish Carpathian wolf population.

Keywords Wolf · *Canis lupus* · Anthropogenic habitats · Barriers · Dispersal · Habitat fragmentation · Microsatellites · Molecular genetics

R. Gula
Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences, Wilcza 64, 00679 Warsaw, Poland

R. Hausknecht · R. Kuehn
Molecular Zoology Unit, Chair of Zoology, Center of Life and Food Sciences Weihenstephan,
Technische Universitaet Muenchen, Am Hochanger 13, 85354 Freising, Germany

R. Gula (✉)
Gombrowicza 5/12, 38700 Ustrzyki Dolne, Poland
e-mail: rgula@miiz.waw.pl

Introduction

Habitat fragmentation caused by anthropogenic barriers is known to have harmful demographic and genetic effects on wildlife populations (Trombulak and Frissell 2000; Forman and Alexander 1998). These effects are either caused by the loss and fragmentation of habitats (ibid.) or by posing physical barriers to dispersal and gene flow. This impact on genetic variation and gene flow has been demonstrated for species with small body size or relatively low dispersal range (Gerlach and Musolf 2000; Keller and Largiader 2003; Keller et al. 2005). In recent studies, this was also shown for ungulates (Epps et al. 2005; Kuehn et al. 2007) and carnivores (Riley et al. 2006; Dixon et al. 2007).

The Carpathian Mountains represent the largest wolf (*Canis lupus*) refuge in Europe with a population estimated at 4,000 individuals (Boitani 2000). The wolf population inhabiting the Carpathian Mountains is of particular importance for the long-term survival of the species in Europe because of its size and potential to serve as a link between northern and southern Europe's wolf populations. Fifty years of communist regime protected the nature of the Carpathian Mountains from major human development. A traditional rural life-style and semi-natural landscapes—suitable habitat for wildlife—were preserved (Salvatori et al. 2002). Since the political transition in 1989, the region has been facing a rapid conversion to a market economy, an alteration of land use patterns (Webster et al. 2001), as well as an increasing human population. Hence, it is in question whether individual wolf dispersal is already being restricted by traffic, infrastructure, and settlements, as a result of which fragmentation and isolation effects of the Carpathian wolf population in Poland are likely to follow.

Wolves live in family groups consisting of parents and two to three generations of offspring. Most young wolves up to 3 years of age leave the natal pack and disperse to find a mate and settle (summarized in Mech and Boitani 2003). The ability of wolves to disperse through various types of habitats is well documented in North America, Finland and Spain (Fritts and Mech 1981; Ballard et al. 1983; Fritts 1983; Messier 1985; Merrill and Mech 2000; Kojola et al. 2006; Blanco and Cortés 2007) but very little is known about wolf dispersal in mainland Europe (Linnel et al. 2005).

Two genetic studies have been conducted on wolves dealing with gene flow and its barriers on a continent-wide scale (Carmichael et al. 2001; Geffen et al. 2004). Dispersal beyond the population range and the subsequent colonization of new areas have been shown for wolves in the Rocky Mountains (Forbes and Boyd 1996, 1997) as well as in France–Switzerland and Scandinavia (Valiere et al. 2003; Vilà et al. 2003; Fabbri et al. 2007). Several recent wolf studies have applied molecular genetic methods to investigate colonization processes of naturally expanding wolf populations (Fabbri et al. 2007), to determine population genetic structure, demographic and wolf pack history (Aspi et al. 2006; Liberg et al. 2005) or to identify ecological factors affecting the genetic structure of wolf populations (Pilot et al. 2006).

A high degree of forest fragmentation, relatively high human population and road density imply that wolf dispersal in the eastern part of the Polish Carpathians could be restricted (Theuerkauf et al. 2007). Using radio-telemetry and molecular genetics, we analyzed whether man-made infrastructure affects the basic mechanism of wolf dispersal from their natal packs into adjacent areas. Thus, we investigated whether wolves occupying the anthropogenic landscape of the eastern part of the Polish Carpathian Mountains represent a continuous part of the larger Carpathian population.

Methods

Study area

The study area was located in the eastern part of the Polish Carpathians (SE Poland). The area covers nearly 5,000 km² of wolf range in the Beskid Niski Mountains, the Bieszczady Mountains and the Przemyśl-Dynów Foothills (48°60′–49°49′ N, 21°10′–22°54′ E, Fig. 1). The average annual temperature is 5.5°C. The average annual precipitation varies from 800 to 1,200 mm. The forest covers 58% of the area and contains common beech (*Fagus sylvatica*), silver fir (*Abies alba*), Norway spruce (*Picea abies*), gray alder (*Alnus incana*), Scots pine (*Pinus sylvestris*), European larch (*Larix decidua*), European hornbeam (*Carpinus betulus*), silver birch (*Betula verucosa*), oak (*Quercus robur*), sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*), willow (*Salix* sp.) and Norway maple (*Acer platanoides*).

The Bieszczady and Beskid Niski Mountains with a maximum elevation of 1,300 m a.s.l. are characterized by a mosaic of forested hills and open valleys with frequent settlements. In the elevated parts along the national border with Slovakia and Ukraine, human density is low (10 people/km²) and forestation amounts to as much as 80%. The lower, northern parts are more densely populated (up to 50 people/km²) with <50% of forest cover. The Bieszczady area is discriminated from the Przemyśl-Dynów Foothills by settlements built up along 70% of the main communication route linking the major towns Gorlice (29,000 inhabitants), Jasło (38,000 inhabitants), Krosno (48,000 inhabitants), Sanok (42,000 inhabitants), Lesko (6,000 inhabitants), and Ustrzyki Dolne (10,000 inhabitants) (Fig. 1). Major roads are two-laned without fences. They constitute axis for urbanization and settlements extending along

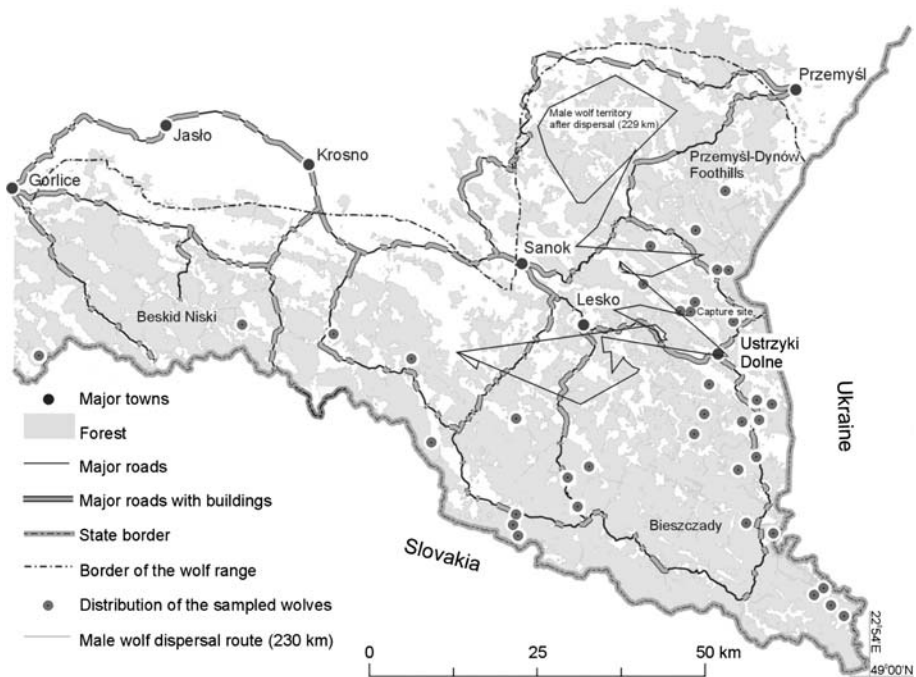


Fig. 1 Study area showing the dispersal route of the radio-monitored male wolf and the distribution of wolf samples collected for DNA analysis between 2001 and 2007

54% of major roads on average (Fig. 1). The traffic volume ranges from 5,000 to 35,000 vehicles/week. The study area is the mainstay of Polish wolves and accommodates 150–230 individuals, representing 30–40% of the entire Polish wolf population (Gula et al. 2002; Gula 2008a).

Data collection

Between 2001 and 2007 we collected 39 wolf samples from the entire study area. Collected samples originated from dead wolves recovered occasionally by forestry personnel (31 samples: 13 males and 18 females), live-trapped individuals (four samples: three females and one male), and blood we found when snow-tracking wolves (four samples: males only). We stored tissue obtained from dead individuals (~2 g) in 70% alcohol and blood samples in EDTA.

We live-trapped a 3-year-old male wolf in spring 2003 and fitted him with a VHF radio-collar. We attempted to localize the radioed male by ground-based triangulation every day thereafter. Since the wolf appeared to be a non-resident individual roaming over vast areas we managed to localize him on 29 days out of 48 days, at intervals ranging from 1 to 6 days, until he settled in summer 2003. The total area he traversed in this period was estimated on the basis of the localizations (minimum convex polygon, MCP). In addition, we calculated the entire travel route as the straight distance between consecutive daily localizations, the average daily distance traveled, and we counted how many times radioed wolf crossed major roads (traffic volume >5,000 vehicles/week).

Analysis of habitat fragmentation

We estimated the wolf range on the basis of a winter snow-tracking census performed in 2003 (Gula 2008b). The total of 291 wolf tracks were recorded on 3,236 km of transects. The tracks were mapped and the wolf range was estimated by plotting 95% kernel density distribution (Gula 2008b). We calculated the percentage of forest cover, road and human density within the estimated wolf range with ArcGIS 8.3 software (ESRI) using correspondent digital layers. The degree of forest fragmentation was evaluated within the wolf range by calculating fragmentation indexes provided by Jaeger (2000): (1) number of forest patches, (2) coherence index, (3) splitting index and (4) effective mesh size.

Genetic analysis of population structure

We extracted DNA from tissue samples according to Hogan et al. (1986). DNA from blood was purified either with a modification of the phenol–chloroform procedure (Hogan et al. 1986) or—in case of blood collected in snow—with the NucleoSpin® Blood QuickPure Kit (Macherey-Nagel). Eight canine microsatellite loci (CPH2, CPH4, CPH8, CPH12, FH2096, FH2088, FH2079, C09.250; Hausknecht et al. 2007; Lucchini et al. 2002) previously applied to genetic wolf studies, were PCR amplified containing the following components (15 µl volume): 1.5 mM (FH2096, FH2088, FH2079) or 3.0 mM MgCl₂, respectively, 0.2 mM dNTPs, 1× reaction buffer, 0.2 µM of each primer, 0.6 U FirePol Taq DNA Polymerase (Solis Biodyne) and 1.8 µl DNA. PCRs were performed in a BIOMETRA UNO II CYLER or in an EPPENDORF MASTER gradient cyler in 35 cycles under the conditions described by Hausknecht et al. 2007 (annealing: CPH12 57°C, C09.250 58°C). We determined the size of microsatellite alleles on an ALFExpress II DNA analyser (Amersham Pharmacia Biotech) using ALLELELINKS version 1.02 software (Amersham Pharmacia Biotech).

For sex identification of the four blood samples collected in snow, we carried out multiplex PCRs containing a fragment of a canine microsatellite locus (ZuBeCa 65; described in Hausknecht et al. 2007) as internal positive control and the MS41 locus indicating male sex (Olivier et al. 1999; modified by Sundqvist et al. 2001). PCR reactions (15 μ l) contained 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 \times reaction buffer, 0.14 μ M of ZuBeCa65 primer and 0.4 μ M of MS 41 primer, 0.6 U FirePol Taq DNA Polymerase (Solis Biotdyne) and 2.4 μ l DNA. PCRs were then performed on Biometra UNO II cyclor (Germany) under the following cycling conditions: the initial denaturation at 94°C for 3 min was followed by 40 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 30 s, 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 3 min.

We used the GENALEX 6.0 software (Peakall and Smouse 2006) to calculate population genetic parameters such as observed number of alleles, observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity and FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001) to calculate allelic richness. In addition, the probability of identity (PID) and the PID for siblings (PIDsibs, Waits et al. 2001) were computed with GENALEX. We performed exact tests on Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and on linkage disequilibrium with GENEPOP 3.4 (Raymond and Rousset 1995) using the Markov-chain method (10,000 dememorization steps, 500 batches and 5,000 iterations per batch). Pairwise genetic relatedness of individuals (r_{MER}) was estimated with the MER V3 software (Wang 2002). This coefficient of relatedness was then transferred to the corresponding pairwise genetic distance ($d_{MER} = 1 - r_{MER}$) for subsequent calculations in GenAlix.

Two approaches were used to characterize spatial genetic structure of the Bieszczady wolf population. First, we performed a Mantel test (Mantel 1967) to determine the correlation between pairwise genetic and geographic distances. Geographic distances between individuals were calculated based on the coordinates of sampling sites. Correlations between geographic and genetic distances were calculated with the GENALEX 6.0 software (1,000 permutations). Second, we carried out global spatial autocorrelation analyses as implemented in GENALEX testing for short distance genetic structure of the wolf population across the entire study area. The autocorrelation coefficient r was calculated for ten distance classes with a size of 10 km each and was statistically tested by 1,000 random permutations and 1,000 bootstraps. We performed the Mantel test and spatial autocorrelations for the entire set of samples ($n = 39$) and for both sexes separately.

We used STRUCTURE 2.1 (Pritchard et al. 2000) to infer potential population subdivision and assign individuals to groups of origin. All individuals were combined into a single data set without any a priori information regarding the assumed number of populations. The number of assumed populations was modified from $K = 1$ to 8 in 20 independent runs for each K . We applied the admixture model with correlated allele frequencies among populations. Utilizing a burn-in of 50,000 iterations followed by a sampling of 100,000 iterations, we calculated the posterior probability of the number of K populations. In addition, we calculated ΔK , a measure of the second order rate of change in the likelihood of K (Evanno et al. 2005).

With Geneland software package (Guillot et al. 2005a, b, 2008; Guillot 2008) we applied georeferenced multilocus genotypes to detect and locate genetic discontinuities and to correlate these with landscape features in the study area. Based on STRUCTURE output we analyzed the presence of $K = 3$ clusters with 100,000 iterations and a thinning of 100 in three independent runs, with the correlated allele frequency model and derived genetic clustering from the run with the highest likelihood. To correlate obtained genetic discontinuities with landscape features in the Polish Carpathians, we merged the maps of posterior probabilities for respective clusters with a geographical map from the study area in ArcGIS 8.3 software.

Results

The sampled area comprised a wolf area of 4,993 km². The forest consisted of 825 patches and covered 58.3% of the area. The index of forest coherence was 3.0%, splitting index 32.9, and effective mesh size 8.8 km². The average human density amounted to 48.2 people/km² and the density of paved roads was 0.48 km/km².

The radio-tracked male caught in the Przemysł-Dynów Foothills traveled through the Bieszczady and Beskid Niski Mountains for 48 days (Fig. 1). He then returned to the Przemysł-Dynów Foothills and finally settled 30 km north of the capture site, where he successfully mated in the subsequent 2 years (Tsunoda et al. 2008). During his dispersal he covered a total area of 1,435 km² (MCP) and travelled a distance of 230 km. Average daily traveled distance was 4.8 km/day. The wolf crossed major roads at least 18 times, including four crossings of the major road linking Sanok and Ustrzyki Dolne (Fig. 1).

The studied wolf population showed intermediate values of heterozygosity ($H_O = 0.56$; SD = 0.09; $H_E = 0.66$; SD = 0.11) with an average number of alleles of 5.75 (range 4–8; SD 1.7). The allelic richness ranged from 3.97 to 7.95. The PID for increasing locus combination was 3.78e-7 for unrelated individuals and 2.07e-3 for related individuals. Thus, we complied with the guidelines of PID (0.01–0.001) set up by Waits et al. (2001). Exact tests showed that the analyzed population was not in HWE. We observed a heterozygote deficit for two loci, CPH4 and FH2079 ($P < 0.01$).

The Mantel test showed no correlation between genetic distances derived from Wang's relatedness coefficient and geographic distances, neither for the entire set of samples ($r = 0.129$; $P = 0.05$) nor for male and female wolves separately (values: $r_m = 0.138$; $P_m = 0.08$; $r_f = 0.06$; $P_f = 0.26$). In addition, the spatial autocorrelation was not significant, neither for the whole sample set nor for the two sexes regarded separately (data not shown).

The analysis of the genetic substructure of the Bieszczady wolves revealed a weak clustering solution for the analyzed samples in three clusters as shown with the mean Ln(K) value over 20 independent runs per K and Evanno's ΔK value (Fig. 2). The most distinct clusters contained three (range 0.703–0.713; mean 0.708, SD 0.005) or ten wolves (range 0.807–8.880; mean 0.850, SD 0.032) as determined with Geneland, while the rest of the samples were assigned more or less clearly to a third cluster (range 0.244–0.573; mean 0.435, SD 0.093). Through the transfer of the graphical output from Geneland to the GIS, we demonstrated the location of those three clusters in relation to human infrastructure (Fig. 3). Especially the shaping of cluster 1 and 3 (Fig. 3 a, c) showed an independence from such habitat features because wolves from distant parts of the study area and opposite areas of cities were assigned into the same clusters.

Discussion

The anthropogenic pressure on the studied wolf habitat is high (average 48.2 people/km²) in relation to other wolf habitats in Europe. Human density within the wolf ranges in Croatia, Spain and Italy lies between 20 and 30 people/km² compared to only 7 people/km² in Białowieża Forest, Poland (summarized in Theuerkauf et al. 2007). The road density of 0.45 km/km² as observed in our study was recognized as a threshold value for wolf occurrence in Wisconsin (Mladenoff et al. 1995). However, other studies showed that wolves do occur in areas with a high road density (>0.45 but <1.0) when interconnected to large source populations living in areas with a low road density (Mech 1989; Mladenoff et al. 1999). Our study area is characterized by a relatively high human population and a high

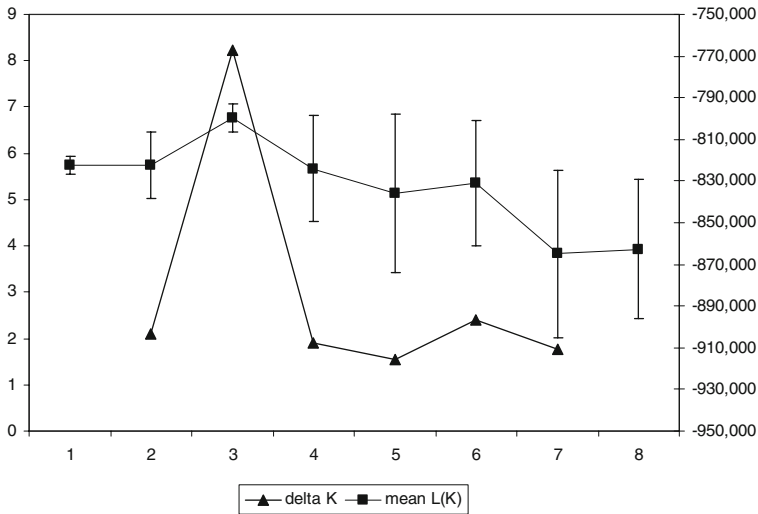


Fig. 2 Summary of the clustering results for the wolf population ($n = 39$) with mean $\ln(K)$ for 20 runs (SD bars are shown) and delta K as a function of K (mean \pm SD over 20 replications per K)

road density associated with substantial forest fragmentation. Wolf habitats in southern Poland are densely populated by humans, contain numerous anthropogenic barriers, and are therefore regarded as poorer habitats for wolves than areas in north-eastern Poland (Jędrzejewski et al. 2005). Nevertheless, wolves in the Bieszczady Mountains are habituated to human presence and obviously are able to cope with anthropogenic disturbances (Theuerkauf et al. 2007).

Although a direct comparison between studies is difficult due to the application of different numbers and types of microsatellite loci, the genetic diversity of the study population resembles the genetic diversity of the Italian wolf population (Lucchini et al. 2002: colonizing population: $H_O = 0.524$, $H_E = 0.517$; source population: $H_O = 0.650$, $H_E = 0.598$). The level of heterozygosity and the departure from the HWE can be attributed to either small sample size (Hedrick 2005) or, as in our study, to the presence of closely related individuals.

The dispersal of the radio-tracked wolf indicated that wolves are able to move throughout the entire study area despite high human and road densities, presence of roads with substantial traffic volume, settlements and a high degree of forest fragmentation. Although wolves are known for their ability to cross highways in Spain (Blanco et al. 2005), busy roads restrict the movement of wolves in other regions and are a cause of a substantial proportion of their mortality (summarized in Fritts et al. 2003). Nonetheless, based on the single radio-tracked wolf, we were not able to differentiate whether it was an exceptional dispersal or an evidence of frequent, undisturbed dispersal within the study area.

Since we did not receive signs of genetic structure as a function of geographic distance in the Mantel test or spatial genetic analyses, there was no indication of gene flow restricting barriers or isolation by distance. The absence of any spatial genetic structure, neither for increasing distances of the entire sample set nor for either sex, demonstrates the random distribution of genotypes within the analyzed sample distribution distance up to 100 km. According to Linnel et al. (2005) 60% of all recorded dispersal events are within 100 km, while 94% of dispersal distances are no further than 300 km. Median dispersal value in naturally expanding wolf populations in Finland was 98.5 km (Kojola et al. 2006) while in

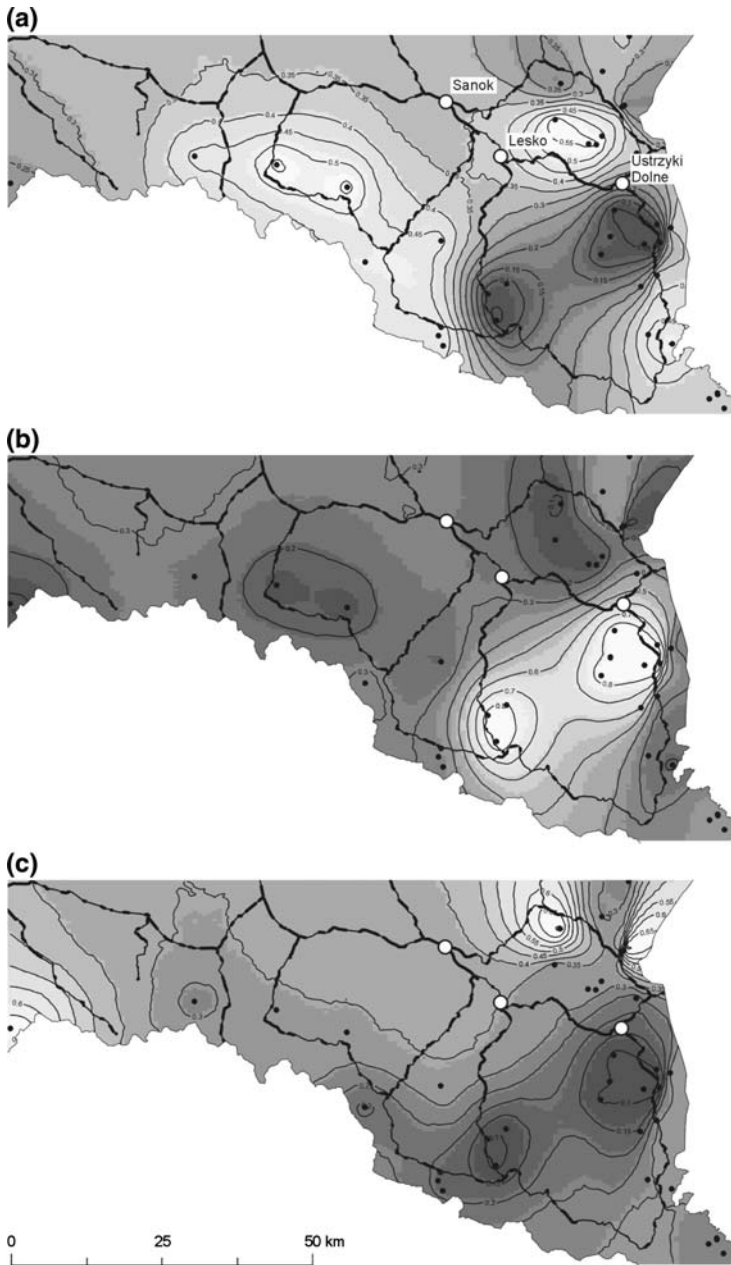


Fig. 3 Location of genetic discontinuities for three clusters within the study area detected with Geneland software. The individual posterior probability to belong to one of the clusters is shown for each cluster separately (a, b, c) together with the main landscape features (major roads, cities and settlements along the roads)

agricultural habitats of Spain mean dispersal distance was only 32 km (Blanco and Cortés 2007). Thus, we should expect no spatial genetic structure within the distance of mean wolf dispersal. Therefore, our results point at ongoing wolf dispersal throughout the area and the

absence of gene flow-restricting barriers within the region despite increasing impairment of landscape coherence.

Bayesian assignment tests were applied in several studies to analyze population structure or to obtain a genetic estimate of dispersal (Berry et al. 2004; Aspi et al. 2006; Dixon et al. 2007). With regard to fragmentation, Riley et al. (2006) demonstrated the subdivision of bobcat and coyote populations into distinct clusters separated through traffic routes and they detected migrants assigned to populations different from their capture location. In contrast to this study, we could not define putative populations of origin due to the absence of such obvious barriers and the mostly opportunistic sampling of dead wolves throughout the study area. Although the individual probability for belonging to a certain cluster was <90%, we could identify the location of those clusters in relation to human infrastructure by integrating Geneland results with landscape data in the GIS. Thus, we could not attribute the cluster assignment of individuals to certain habitat features or gene flow restricting barriers. In contrast, the obtained clustering results demonstrate that the location of clusters was independent from habitat features or potential dispersal barriers and pointed to free wolf dispersal within the study area. The fact that we did not receive clearly pronounced clusters in both Bayesian approaches supports our assumption of free gene flow throughout the area.

Conclusions

Roads and developed areas along roads were not impassable for wolves in the studied area as shown by the radio-collared wolf. Low assignment probabilities of wolves for different clusters and the discrepancy between genetic discontinuities and landscape features pointed to ongoing gene flow. The absence of pronounced spatial substructure in the population proves that gene flow is not yet interrupted by existing man-made barriers and that population subdivision caused by fragmentation cannot yet be detected in our study area.

Acknowledgments This study was performed within the scope of the Bieszczady Wolf Project in the Polish Carpathians. Field work was funded by the Polish National Committee for Scientific Research (KBN 6P04F 006), and the Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences. The genetic work was financed by the Molecular Zoology Unit, TU Muenchen. We thank J. Amarowicz, M. Bajda, B. Budzyn, S. Kaczor, R. Kapuściński, Z. Kopcza, A. Koszler, G. Łukacijewski, J. Mazur, R. Paszkiewicz, A. Pawlak, B. Pirga, J. Polityński, S. Stapor, M. Szkutnik, W. Śmietana and T. Zajac for helping to collect the samples. We thank S. Drevet, M. Januszczak and B. Pirga for assistance in radio-telemetry, B. Pirga and J. Theuerkauf for help in GIS analysis and B. Suppan for support in the lab. We also thank U. Kuehn and two anonymous reviewers for revisions of an earlier version of the manuscript.

References

- Aspi J, Roininen E, Ruokonen M et al (2006) Genetic diversity, population structure, effective population size and demographic history of the Finnish wolf population. *Mol Ecol* 15:1561–1576. doi:[10.1111/j.1365-294X.2006.02877.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02877.x)
- Ballard WB, Farnell R, Stephenson RO (1983) Long-distance movements by gray wolves (*Canis lupus*). *Can Field Nat* 97:333
- Berry O, Tocher MD, Sarre SD (2004) Can assignment tests measure dispersal? *Mol Ecol* 13:551–561. doi:[10.1046/j.1365-294X.2004.2081.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2004.2081.x)
- Blanco JC, Cortés Y (2007) Dispersal patterns, social structure and mortality of wolves living in agricultural habitats in Spain. *J Zool (Lond)* 273:114–124. doi:[10.1111/j.1469-7998.2007.00305.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2007.00305.x)
- Blanco JC, Cortés Y, Virgos E (2005) Wolf response to two kinds of barriers in an agricultural habitat in Spain. *Can J Zool* 83:312–323. doi:[10.1139/z05-016](https://doi.org/10.1139/z05-016)

- Boitani L (2000) Action plan for the conservation of wolves in Europe (*Canis lupus*). Nature and environmental series no. 113, convention on the conservation of European wildlife and natural habitats. Council of Europe, Strasbourg
- Carmichael LE, Nagy JA, Larter NC et al (2001) Prey specialization may influence patterns of gene flow in wolves of the Canadian Northwest. *Mol Ecol* 10:2787–2798
- Dixon JD, Oli MD, Wooten MC et al (2007) Genetic consequences of habitat fragmentation and loss: the case of the Florida black bear (*Ursus americanus floridanus*). *Conserv Genet* 8:455–464. doi:10.1007/s10592-006-9184-z
- Epps CW, Palsbøll PJ, Wehausen JD et al (2005) Highways block gene flow and cause a rapid decline in genetic diversity of desert bighorn sheep. *Ecol Lett* 8:1029–1038. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00804.x
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Fabrizi E, Miquel C, Lucchini V et al (2007) From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Mol Ecol* 16:1661–1671. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03262.x
- Forbes SH, Boyd DK (1996) Genetic variation of naturally colonizing wolves in the central Rocky Mountains. *Conserv Biol* 10:1082–1090. doi:10.1046/j.1523-1739.1996.10041082.x
- Forbes SH, Boyd DK (1997) Genetic structure and migration in native and reintroduced Rocky Mountain wolf populations. *Conserv Biol* 11:1226–1234. doi:10.1046/j.1523-1739.1997.96296.x
- Forman RTT, Alexander LE (1998) Roads and their major ecological effects. *Annu Rev Ecol Syst* 29:207–231. doi:10.1146/annurev.ecolsys.29.1.207
- Fritts SH (1983) Record dispersal by a wolf from Minnesota. *J Mammal* 64:166–167. doi:10.2307/1380772
- Fritts SH, Mech LD (1981) Dynamics, movements and feeding ecology of a newly protected wolf population in north-western Minnesota. *Wildl Monogr* 80:79
- Fritts SH, Stephenson RO, Hayes RD (2003) Wolves and humans. In: Mech LD, Boitani L et al (eds) *Wolves, ecology and conservation*. The University of Chicago Press, Chicago
- Geffen E, Anderson MJ, Wayne RK (2004) Climate and habitat barriers to dispersal in the highly mobile grey wolf. *Mol Ecol* 13:2481–2490. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02244.x
- Gerlach G, Musolf K (2000) Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision of bank vole populations. *Conserv Biol* 14:1–10. doi:10.1046/j.1523-1739.2000.98519.x
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Updated from Goudet J (1995) FSTAT (vers. 1.2) a computer program to calculate F-statistics. *J Hered* 86:485–486
- Guillot G (2008) Inference of structure in subdivided populations at low levels of genetic differentiation. The correlated allele frequencies model revisited. *Bioinformatics* 24:2222–2228. doi:10.1093/bioinformatics/btn419
- Guillot G, Estoup A, Mortier F et al (2005a) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170:1261–1280. doi:10.1534/genetics.104.033803
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005b) Geneland: a computer package for landscape genetics. *Mol Ecol Notes* 5:708–711. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01031.x
- Guillot G, Santos F, Estoup A (2008) Analysing georeferenced populations genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics* 24:1406–1407. doi:10.1093/bioinformatics/btn136
- Gula R (2008a) Legal protection of wolves in Poland: implications for the status of the population. *Eur J Wildl Res* 54:163–170. doi:10.1007/s10344-007-0129-8
- Gula R (2008b) Wolf depredation on domestic animals in Polish Carpathian Mountains. *J Wildl Manag* 72:283–289. doi:10.2193/2006-368
- Gula R, Krzakiewicz H, Niemczyk J et al (2002) Wolf and lynx census in Regional Directorate of State Forest of Krosno, Bieszczadzki National Park, and Magurski National Park. *Rocz Bieszczadzkie* 10:373–389
- Hausknecht R, Gula R, Pirga B et al (2007) Urine—a source for non-invasive genetic monitoring in wildlife. *Mol Ecol Notes* 2:208–212. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01622.x
- Hedrick PW (2005) *Genetics of populations*, 3rd edn. Jones and Bartlett Publishers, Inc., Sudbury, MA, USA
- Hogan B, Constantini F, Lacey E (1986) *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Jaeger JGA (2000) Landscape division, splitting index, and effective mesh size: new measures of landscape fragmentation. *Landscape Ecol* 15:115–130. doi:10.1023/A:1008129329289
- Jędrzejewski W, Niedziałkowska M, Mysłajek R et al (2005) Habitat selection by wolves *Canis lupus* in the uplands and Mountains of southern Poland. *Acta Theriol (Warsz)* 50:417–428
- Keller I, Largiadere CR (2003) Recent habitat fragmentation caused by major roads leads to reduction of gene flow and loss of genetic variability in ground beetles. *Proc R Soc Lond B* 270:417–423. doi:10.1098/rspb.2002.2247

- Keller I, Excoffier L, Largiadere CR (2005) Estimation of effective population size and detection of a recent population decline coinciding with habitat fragmentation in a ground beetle. *J Evol Biol* 18:90–100. doi:[10.1111/j.1420-9101.2004.00794.x](https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00794.x)
- Kojola I, Aspi J, Hakala A et al (2006) Dispersal in an expanding wolf population in Finland. *J Mammal* 87:281–286. doi:[10.1644/05-MAMM-A-061R2.1](https://doi.org/10.1644/05-MAMM-A-061R2.1)
- Kuehn R, Hindenlang KE, Holzgang O et al (2007) Genetic effect of transportation infrastructure on roe deer populations (*Capreolus capreolus*). *J Hered* 98:13–22. doi:[10.1093/jhered/esl056](https://doi.org/10.1093/jhered/esl056)
- Liberg O, Andren H, Pedersen H (2005) Severe inbreeding in a wild wolf (*Canis lupus*) population. *Biol Lett* 1:17–20. doi:[10.1098/rsbl.2004.0266](https://doi.org/10.1098/rsbl.2004.0266)
- Linnell JDC, Broseth H, Solbered EJ et al (2005) The origins of the southern Scandinavian wolf *Canis lupus* population: potential for natural immigration in relation to dispersal distances, geography and Baltic ice. *Wildl Biol* 11:383–391. doi:[10.2981/0909-6396\(2005\)11\[383:TOOTSS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2981/0909-6396(2005)11[383:TOOTSS]2.0.CO;2)
- Lucchini V, Fabbri E, Marucco F et al (2002) Non-invasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Mol Ecol* 11:857–868. doi:[10.1046/j.1365-294X.2002.01489.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01489.x)
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27:209–220
- Mech LD (1989) Wolf population survival in an area of high road density. *Am Midl Nat* 121:387–389. doi:[10.2307/2426043](https://doi.org/10.2307/2426043)
- Mech LD, Boitani L (2003) Wolf social ecology. In: Mech LD, Boitani L (eds) *Wolves, ecology and conservation*. The University of Chicago Press, Chicago
- Merrill SB, Mech LD (2000) Details of extensive movements by Minnesota wolves. *Am Midl Nat* 144:428–433. doi:[10.1674/0003-0031\(2000\)144\[0428:DOEMBM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1674/0003-0031(2000)144[0428:DOEMBM]2.0.CO;2)
- Messier F (1985) Solitary living and extra-territorial movements of wolves in relation to social status and prey abundance. *Can J Zool* 63:239–245
- Mladenoff D, Sickley TA, Haight RG et al (1995) A regional landscape analysis and prediction of favourable gray wolf habitat in the northern Great Lakes region. *Conserv Biol* 9:279–294. doi:[10.1046/j.1523-1739.1995.9020279.x](https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1995.9020279.x)
- Mladenoff D, Sickley TA, Wydeven AP (1999) Predicting gray wolf landscape recolonization: logistic regressions models vs. new field data. *Ecol Appl* 9:37–44. doi:[10.1890/1051-0761\(1999\)009\[0037:PGWLRL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1999)009[0037:PGWLRL]2.0.CO;2)
- Olivier M, Breen M, Binns M et al (1999) Localization and characterization of nucleotide sequences from the canine Y chromosome. *Chromosome Res* 10:223–233. doi:[10.1023/A:1009203500926](https://doi.org/10.1023/A:1009203500926)
- Peakall R, Smouse PE (2006) Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295. doi:[10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x)
- Pilot M, Jedrzejewski W, Branicki W et al (2006) Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Mol Ecol* 15:4533–4553. doi:[10.1111/j.1365-294X.2006.03110.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03110.x)
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly PJ (2000) Inference of population structure using multi-locus genotype data. *Genetics* 155:945–959
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP version 1.2: population genetic software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86:248–249
- Riley SPD, Pollinger JP, Sauvajot RM et al (2006) A southern California freeway is a physical and social barrier to gene flow in carnivores. *Mol Ecol* 15:1733–1741. doi:[10.1111/j.1365-294X.2006.02907.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02907.x)
- Salvatori V, Corsi F, Milton EJ et al. (2002) Use of satellite images for regional modelling of conservation areas for wolves in the Carpathian Mountains, Central Europe. In: *Information for sustainability and development*. Proceedings of the 29th international symposium on remote sensing of environment, Buenos Aires
- Sundqvist AK, Ellegren H, Olivier M et al (2001) Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Mol Ecol* 10:1959–1966
- Theuerkauf J, Gula R, Pirga B et al (2007) Human impact on wolf activity in the Bieszczady Mountains, SE Poland. *Ann Zool Fenn* 44:225–231
- Trombulak SC, Frissell CA (2000) Review of ecological effects of roads on terrestrial and aquatic communities. *Conserv Biol* 14:18–30. doi:[10.1046/j.1523-1739.2000.99084.x](https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2000.99084.x)
- Tsunoda H, Gula R, Theuerkauf J et al (2008) How does parental role influence the activity and movements of breeding wolves? *J Ethol* 27:185–189. doi:[10.1007/s10164-008-0106-z](https://doi.org/10.1007/s10164-008-0106-z)
- Valiere N, Fumagalli L, Gielly L et al (2003) Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. *Anim Conserv* 6:83–92. doi:[10.1017/S1367943003003111](https://doi.org/10.1017/S1367943003003111)
- Vilà C, Sundqvist AK, Flagstad O et al (2003) Rescue of severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270:91–97. doi:[10.1098/rspb.2002.2184](https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2184)

- Waits LP, Luikart G, Taberlet P (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Mol Ecol* 10:249–256. doi:[10.1046/j.1365-294X.2001.01185.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01185.x)
- Wang J (2002) An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160:1203–1215
- Webster R, Holt S, Avis C (2001) The status of the Carpathians. Report of the carpathian ecoregion initiative, WWF, Vienna, Austria

Anhang 4

Hausknecht R., Szabó A., Firmánszky G., Gula R. und Kühn R. (2010). Confirmation of wolf residence in Northern Hungary by field and genetic monitoring. *Mammalian Biology* 75: 348-352.



SHORT COMMUNICATION

Confirmation of wolf residence in Northern Hungary by field and genetic monitoring

Roland Hausknecht^a, Ádám Szabó^b, Gábor Firmánszky^b, Roman Gula^c,
Ralph Kuehn^{a,*}

^aMolecular Zoology Unit, Chair of Zoology, Technische Universität München, Am Hochanger 13, 85354 Freising, Germany

^bFoundation for Large Carnivores in Hungary, Szalamandra ház, H-3762 Szögliget, Hungary

^cMuseum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences, Wilcza 64, PL-00679 Warsaw, Poland

Received 27 May 2009; accepted 12 October 2009

Keywords: *Canis lupus*; Snow-tracking; Noninvasive genetic monitoring; mtDNA lineage

The wolf (*Canis lupus*) is a highly mobile species, occupying large home ranges and dispersing for long distances (Mech and Boitani, 2003). These biological capabilities along with improved wolf management policies led to a pan European wolf recovery within last 20 years (Salvatori and Linnell, 2005). Wolves extended their occurrence, increased in numbers and re-colonized areas, where they had become extinct (Valière et al., 2003; Salvatori and Linnell, 2005; Aspi et al., 2006; Kojola et al., 2006; Fabbri et al., 2007; Gula, 2008a). According to Farago (1993) wolves were always present in the mountain ranges of the Hungarian and Slovakian border area and, were recorded in Aggtelek Karst, Hungary in 1966 and occasionally in the 1980s and 1990s. With the intensification of a first wolf monitoring initiated by the Szent István University, Gödöllő (LIFE 00/NAT/H/7162 (2001)), the goal of our study was to verify the presence of resident wolves in the Aggtelek region by the combined application of snow-tracking survey and noninvasive molecular genetic methods.

During the winters of 2004, 2005 and 2006 we snow-tracked wolves in the cross-border area of the Aggtelek National Park in Hungary and the Slovak Karst National Park in Slovakia (48°30'N, 20°32'E). We

applied snow-tracking procedures as described in Hausknecht et al. (2007) and Gula (2008b). Track routes, wolf numbers, dens sites, urination and defecation sites were recorded with Global Positioning System (GPS) data loggers and scat and urine samples were collected for genetic analyses. We controlled the use of the den sites discovered during snow-tracking in subsequent summers. We determined the size of the area covered by successful genotyped samples with minimum convex polygon method (MCP). The number of wolves occupying the area in given winter was estimated as the maximum number of individuals recorded during snow-tracking.

Samples for genetic analyses were stored frozen (−20 °C) until further procession. Urinary DNA was extracted as described by Hausknecht et al. (2007) and faecal DNA was processed using the slightly modified protocol of the QIAamp DNA Stool MiniKit (QIAGEN, Germany). Negative controls were included in each extraction and PCR amplification to monitor for contaminations. The identification of individuals was performed by microsatellite genotyping of 39 noninvasive samples at eight loci as previously applied in wolf research in Poland (Hausknecht et al., 2007; Gula et al., 2009) in a reduced PCR reaction volume of 12.5 µL. To ensure genotype reliability, each genotyping experiment was initially repeated three times on an ALFexpress II DNA Analyser (Amersham Pharmacia). We compared

*Corresponding author. Tel.: +49 8161 714608;
fax: +49 8161 714613.

E-mail address: kuehn@wzw.tum.de (R. Kuehn).

multi-locus genotyping repetitions using GIMLET 1.3.3 (Valière, 2002) and accepted genotypes when we obtained two identical results for heterozygote or three identical results for homozygote samples, respectively. In single cases additional genotyping repetitions were performed. Rates of microsatellite genotyping errors were calculated as described in Hausknecht et al., (2009). To estimate potential parentage between individuals, we applied the PARENTE software (Cercueil et al., 2002). Sex determination was carried out in multiplex PCR as described in Gula et al. (2009) with the addition of 0.04 µg/µL BSA to the PCR reaction mix.

We determined the species of noninvasively collected samples based on a variable fragment of the mtDNA control region, which was previously used for wolf identification in the Alps (Valière et al., 2003). Specifically, we amplified this fragment with the primer pair L15995/H16498 (Valière et al., 2003) in a 12.5 µL reaction volume, containing 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 × reaction buffer, 0.2 µM of each primer, 0.5 U FirePol Taq DNA Polymerase (Solis Biodyne) and 1.8 µL DNA. Forward and reverse strands were sequenced by Eurofins MWG Operon, Germany. We aligned both sequence strands with Geneious software 3.0.4 (Drummond et al., 2007) to prove sequences' correctness. Additionally to the six Hungarian samples, we analyzed tissue samples from three wolves from Białowieża, Poland, 13 wolves from the Bieszczady Mountains, Poland (Gula et al., 2009) and one from Slovakia. All sequences were (1) compared with publicly available homologous sequences using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and (2) aligned to 21 previously published wolf haplotypes with a clearly stated origin from the East and Southeast European wolf range (Valière et al., 2003; Randi et al., 2000; Pilot et al., 2006; Jędrzejewski et al., 2005). Ten dog haplotypes served as reference as described in Valière et al. (2003). For subsequent phylogenetic inferences, we performed the alignments with CLUSTALW as implemented in MEGA software version 4 (Tamura et al., 2007). As phylogenetic networks represent appropriately intraspecific genetic variation (Posada and Crandall, 2001) and statistical support in initial maximum-likelihood estimates for our wolf haplotypes was low (data not shown), we applied the NETWORK 4.5.1.0 software to infer a median-joining (MJ-) network (Bandelt et al., 1999) with equal weights for all characters (<http://www.fluxus-engineering.com>).

In the three consecutive winters of 2004, 2005 and 2006, we followed wolf tracks for a total distance of 700 km in the Aggtelek Karst and confirmed the permanent presence of a wolf group comprising three to five individuals. One of five den sites that we controlled every summer was used as breeding den throughout the study period. In 2004, we recorded

howling of two to three pups close to that den and discovered a dead yearling in a snare. In October 2005 we found a pup died from canine distemper.

From repeated genotyping, we obtained genotypes from 20 samples (2004: seven genotypes out of 12 samples; 2005: four genotypes out of 13 samples; 2006: nine genotypes out of 14 samples), while the other samples could either not be amplified at single loci or showed inconsistent results in genotyping repetitions. From these 20 samples, we observed a rate of positive PCRs of 93%, a mean allelic error rate of 5.7% over all loci and mean genotypic error rate of 10.4% (allelic dropout rate: AD = 13.4%; false allele rate: FA = 3.7%). The successfully genotyped samples were distributed over an area 23.0 km² in total (0.4 km² in 2004, 10.1 km² in 2005 and 18.7 km² in 2006; MCP). We found 6 distinct genotypes (i.e. individual wolves, Fig. 1): genotype 1 was determined in two samples and genotype 3 was found in eight samples from all three years (Fig. 1). Although genotype 1 was not detected in 2005, it is likely that these two wolves were present in all three years. Genotypes 2 and 4 were found in two or three samples each from the year 2006, whereas genotype 5 was recovered four times in year 2004 and 2005 and genotype 6 was found only once in 2006 (Fig. 1). Sex determination of these individuals revealed four females and two males. The estimation of parentage based on genetic incompatibilities suggested that female genotype 1 together with male genotype 3 were the most probable pair of parents of the genotypes 2, 4 and 5. Regarding maternity and paternity separately, female 1 was the most probable mother of genotypes 2, 4 and 5, while male 3 revealed highest probability of being father to all genotypes but female 1. Thus female 6 could either be the daughter of male 3 with another female wolf or it was his sister.

MtDNA sequencing was successfully performed with the determined Hungarian wolf individuals (342 bp in

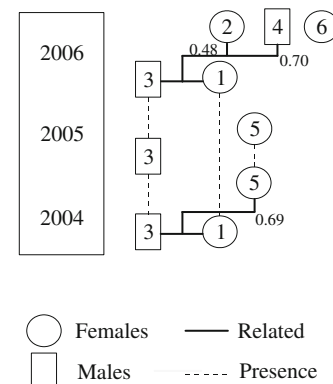


Fig. 1. Detected wolf genotypes and their sex with the year of their presence in the Aggtelek region. Female 1 was together with male 3 the most probable pair of parents of individuals 2, 4 and 5 as ascertained with PARENTE software.

length), and all samples from Poland and Slovakia. The Hungarian individuals revealed a unique haplotype identical to a wolf haplotype from Romania (AF338810; Valière et al., 2003). The Polish Carpathian sequences corresponded to a haplotype from Bulgaria (AF115701; Randi et al., 2000), and were associated with haplotypes from Slovakia, Bulgaria (AF115700; Randi et al., 2000) and adjacent regions (DQ 421804 and DQ 421805, Pilot et al., 2006) in the MJ network (Fig. 2). The sequences from Białowieża, NE Poland, revealed two different haplotypes, which were identical to those previously reported from Northern Poland or Belarus, respectively (AF344299, AF344300; Jędrzejewski et al., 2005).

Challenges in noninvasive genetic monitoring and their corrective are well appreciated (for reviews see Pompanon et al., 2005; Beja-Pereira et al., 2009). Our genotyping success was comparable to the results of other wolf studies (Scandura et al., 2006: AD=5.6%; FA=2.4%; Lucchini et al., 2002: AD=18%; positive

PCR 53%) and differences could be attributed to (1) the varying age of samples at the time of their analysis (Santini et al., 2007) or (2) different properties of applied loci (Broquet et al., 2007). The distribution of samples over an area much smaller than the size of an average wolf pack (88–224 km² in the northern slopes of the Carpathians, (Gula, 2008b)), the record of a stable number of individuals over three years based on detected genotypes and snow-tracking data provided evidence for the permanent presence of wolves in the study area. The presence of a breeding pair with its offspring as determined genetically was in agreement with the evidence of the use of the den site, in the study period, the discovery of dead young individuals and the howling of pups near by the den site.

The left domain of the mtDNA control region was previously applied to identify wolf's presence in France and Switzerland (Valière et al., 2003). In concordance with earlier findings of phylogenetic relationships

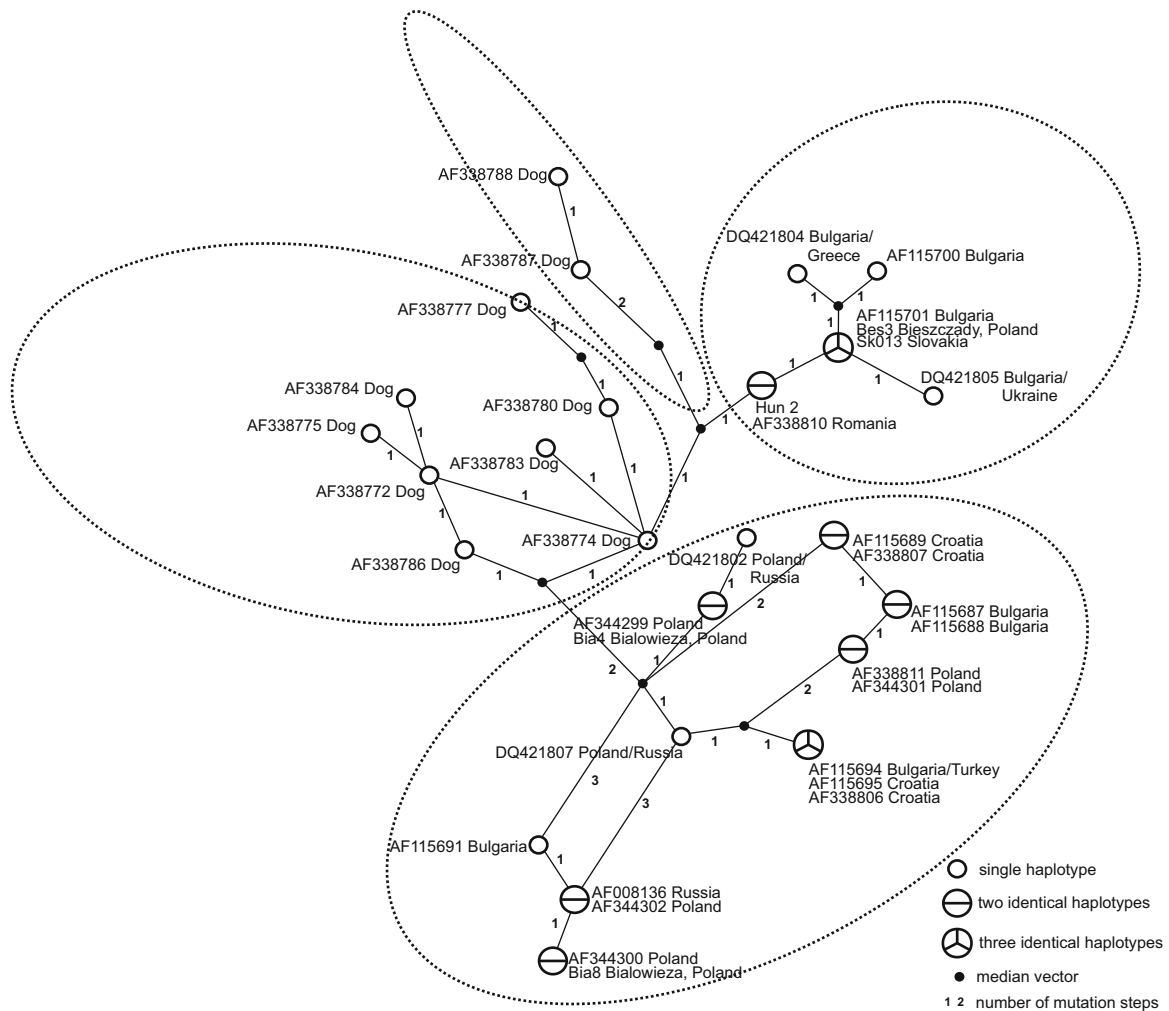


Fig. 2. Median-joining network of East European wolf and reference dog haplotypes based on mtDNA control region sequences. GenBank accession numbers, sequences' origin and detected haplotypes from Hungary (Hun2), Poland (Bes3, Bia4 and 8) and Slovakia (Sk013) are given. Dotted lines pool haplotype clusters according to corresponding median vectors and mutation steps.

among wolf mtDNA haplotypes (Randi et al., 2000; Pilot et al., 2006), our genealogic network of East European wolf populations did not exhibit an explicit geographical pattern in the distribution of mtDNA haplotypes. However, a disconnection of the Carpathian-Balkan wolves from those of north and south-east Europe could be observed and deserves further research. General infrequent wolf–dog hybridisation (Vilà and Wayne, 1999; Wayne and Vilà, 2003), the correspondence of our Hungarian sequences with a Romanian wolf mtDNA haplotype as well as the lack of observational evidence for wolf–dog hybrids in Aggtelek lead us to the conclusion that we observed a breeding wolf pack in the Aggtelek region in northern Hungary.

Acknowledgements

Field work and genetic analyses were financially supported by the Hungarian Ministry of Environment and Water, and by the Molecular Zoology Unit, Technische Universität München. We greatly appreciate the constant help in translations by Gy. Gadó, the technical support in the laboratory by N. Bernhard as well as the helpful comments on an earlier version of the manuscript by U. Kuehn and two anonymous reviewers.

References

- Aspi, J., Roininen, E., Ruokonen, M., Kojola, I., Vilà, C., 2006. Genetic diversity, population structure, effective population size and demographic history of the Finnish wolf population. *Mol. Ecol.* 15, 1561–1576.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Roehl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37–48.
- Beja-Pereira, A., Oliveira, R., Alves, P.C., Schwartz, M.K., Luikart, G., 2009. Advancing ecological understanding through technological transformations in noninvasive genetics. *Mol. Ecol.* 9, 1279–1301.
- Broquet, T., Ménard, N., Petit, E., 2007. Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conserv. Genet.* 8, 249–260.
- Cercueil, A., Bellemain, E., Manel, S., 2002. PARENTE: a computer program for parentage analysis. *J. Hered.* 93, 458–459.
- Drummond, A.J., Ashton, B., Cheung, M., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S., Thierer, T., Wilson, A., 2007. Geneious v3.0. (available from <http://www.geneious.com/>).
- Fabbri, E., Miquel, C., Lucchini, V., Santini, A., Caniglia, R., Duchamp, C., Weber, J.M., Lequette, B., Marucco, F., Boitani, L., Fumagalli, L., Taberlet, P., Randi, E., 2007. From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Mol. Ecol.* 16, 1661–1671.
- Farago, S., 1993. Current status of the wolf (*Canis lupus* L.) in Hungary. In: Promberger, C., Schroder, W. (Eds.), *Wolves in Europe – Status and Prospects*. Munich Wildlife Society, Munich, pp. 45–49.
- Gula, R., 2008a. Wolves return to Poland's Holy Cross Primeval Forest. *International Wolf Magazine*, Spring 2008, 17–21.
- Gula, R., 2008b. Wolf depredation on domestic animals in the Polish Carpathian Mountains. *J. Wildl. Manage.* 72, 283–289.
- Gula, R., Hausknecht, R., Kuehn, R., 2009. Evidence of wolf dispersal in anthropogenic habitats of the Polish Carpathian Mountains. *Biodivers. Conserv.* 18, 2173–2184.
- Hausknecht, R., Gula, R., Pirga, B., Kuehn, R., 2007. Urine – a source for noninvasive genetic monitoring in wildlife. *Mol. Ecol. Notes* 7, 208–2212.
- Hausknecht, R., Salzer, K., Filli, F., Kuehn, R., 2009. Techniques for noninvasive genetic monitoring of Alpine Ibex *Capra ibex*. *Acta Theriol.* 54, 277–287.
- Jędrzejewski, W., Branicki, W., Veit, C., Medugorac, I., Pilot, M., Bunevich, A.N., Jędrzejewska, B., Schmidt, K., Theuerkauf, J., Okarma, H., Gula, R., Szymura, L., Förster, M., 2005. Genetic diversity and relatedness within packs in an intensely hunted population of wolves *Canis lupus*. *Acta Theriol.* 50, 3–22.
- Kojola, I., Aspi, J., Hakala, A., Hiekkinen, S., Ilmoni, C., Ronkainen, S., 2006. Dispersal in an expanding wolf population in Finland. *J. Mammal.* 87, 281–286.
- LIFE 00/NAT/H/7162, 2001. 'Founding the base of long term large carnivore conservation in Hungary'; Department of Wildlife Biology and Game Management, Szent István University, Gödöllő, May.
- Lucchini, V., Fabbri, E., Marucco, F., Ricci, S., Boitani, L., Randi, E., 2002. Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western. *Italian Alps Mol. Ecol.* 11, 857–868.
- Mech, L.D., Boitani, L., 2003. Wolf social ecology. In: Mech, L.D., Boitani, L. (Eds.), *Wolves, Ecology and Conservation*. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Pilot, M., Jędrzejewski, W., Branicki, W., Sidorovich, V.E., Jędrzejewska, B., Stachura, K., Funk, S.M., 2006. Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Mol. Ecol.* 15, 4533–4553.
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E., Taberlet, P., 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat. Rev. Genet.* 6, 847–856.
- Posada, D., Crandall, K.A., 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol. Evol.* 16, 37–45.
- Randi, E., Lucchini, V., Christensen, M.F., Mucci, N., Funk, S., Dolf, G., Loeschcke, V., 2000. Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conserv. Biol.* 14, 464–473.
- Salvatori, V., Linnell, J., 2005. Report on the conservation status and threats for wolf (*Canis lupus*) in Europe. Council of Europe T-PVS/Inf 2005, 16.
- Santini, A., Lucchini, V., Fabbri, E., Randi, E., 2007. Ageing and environmental factors affect PCR success in wolf (*Canis lupus*) excremental DNA samples. *Mol. Ecol. Notes* 7, 955–961.
- Scandura, M., Capitani, C., Iacolina, L., Apollonio, M., 2006. An empirical approach for reliable microsatellite genotyping of wolf DNA from multiple noninvasive sources. *Conserv. Genet.* 7, 813–823.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, online 10.1093/molbev/msm092.
- Valière, N., 2002. GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Mol. Ecol. Notes* 2, 377–379.
- Valière, N., Fumagalli, L., Gielly, L., 2003. Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from noninvasive genetic sampling over a period of 10 years. *Anim. Conserv.* 6, 83–92.
- Vilà, C., Wayne, R.K., 1999. Hybridization between wolves and dogs. *Conserv. Biol.* 13, 195–198.
- Wayne, R.K., Vilà, C., 2003. Molecular genetic studies of wolves. In: Mech, L.D., Boitani, L. (Eds.), *Wolves, Ecology and Conservation*. The University of Chicago Press, Chicago, USA.