

**Kopulationen außerhalb des Paarbundes
bei der Kohlmeise (*Parus major*) –
proximate Einflüsse und ultimate Faktoren**

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Thomas Gerken
aus
Köln

Bonn 2001

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. K.P. Sauer

2. Referent: PD Dr. T. Lubjuhn

Tag der Promotion:

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	5
2	MATERIAL UND METHODEN.....	9
2.1	FREILANDUNTERSUCHUNGEN	9
2.1.1	Versuchsobjekt	9
2.1.2	Untersuchungsgebiet	9
2.1.3	Untersuchungszeitraum und Datenerhebung	10
2.1.3.1	Kontrolle der Nistkästen	10
2.1.3.2	Ermittlung von Legebeginn und Vollgelege-Eizahl	10
2.1.3.3	Klassifizierung der Brutansätze	11
2.1.3.4	Untersuchung der Altvögel und Nestlinge	12
2.1.3.5	Berechnung individual- und populationspezifischer Maße	14
2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	15
2.2.1	Multilocus DNA-Fingerprinting	15
2.2.1.1	DNA-Isolation.....	16
2.2.1.2	Restriktionsabbau der genomischen DNA.....	17
2.2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	17
2.2.1.4	Trocknen der „Fingerprint“-Gele.....	19
2.2.1.5	Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Fragmente	19
2.2.1.6	Radioaktive Markierung der Oligonukleotide.....	20
2.2.1.7	Hybridisierung der „Fingerprint“-Gele.....	20
2.2.1.8	Darstellung der Bandenmuster.....	21
2.2.1.9	Auswertung der Bandenmuster.....	22
2.2.2	Mikrosatellitenanalysen.....	23
2.2.2.1	Klonierung der Kohlmeisen-DNA.....	24
2.2.2.1.1	Restriktionsabbau.....	25
2.2.2.1.2	Extraktion der DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen.....	26
2.2.2.1.3	Ligation der DNA-Fragmente	27
2.2.2.1.4	Elektrotransformation	27
2.2.2.1.5	Anzucht der Bakterien	28
2.2.2.2	Identifizierung von klonierten DNA-Mikrosatelliten.....	29
2.2.2.2.1	Übertragung der Bakterienkolonien auf Nylonmembranen	29
2.2.2.2.2	Denaturierung und Fixierung der DNA auf Nylonmembranen.....	29
2.2.2.2.3	Radioaktive Markierung der Sonden, Hybridisierung und Autoradiographie.....	30
2.2.2.3	Sequenzierung der klonierten DNA-Mikrosatelliten	30
2.2.2.3.1	Anzucht der Klone und Isolation der Plasmid-DNA.....	30
2.2.2.3.2	Quantifizierung und Sequenzierung der Plasmid-DNA.....	31
2.2.2.4	Amplifikation und Analyse der DNA-Mikrosatelliten aus chromosomaler DNA	33
2.2.2.4.1	Konstruktion der Primer	33
2.2.2.4.2	Etablierung der Mikrosatellitensysteme.....	34
2.2.2.4.3	Routinemäßige Anwendung und Auswertung.....	35
2.3	AUSWERTUNG DES DATENMATERIALS	36

3	ERGEBNISSE	37
3.1	BEPROBUNG DER BRUTPOPULATION	37
3.1.1	Stichprobenumfang	37
3.1.2	Repräsentanz der Stichproben	37
3.2	ELTERNCHAFTSNACHWEISE	41
3.2.1	Auftreten von Brutparasitismus	42
3.2.2	Auftreten von Kopulationen außerhalb des Paarbundes	43
3.2.3	Auftreten von EPY im Verlauf der Brutsaison	50
3.3	EINFLUß PROXIMATER FAKTOREN AUF DIE EPY-RATE DER GESAMTPOPULATION	52
3.4	IDENTIFIZIERUNG DER EPC-PARTNER	56
3.4.1	Etablierung geeigneter DNA-Mikrosatellitensysteme für Kohlmeisen.....	57
3.4.1.1	Isolierung von DNA-Mikrosatelliten	57
3.4.1.2	Charakterisierung von DNA-Mikrosatelliten.....	57
3.4.1.3	Amplifikation und Variabilität der DNA-Mikrosatelliten	57
3.4.2	Identifizierte genetische Väter	58
3.4.2.1	Anzahl der EPC-Partner eines Weibchens.....	62
3.4.2.2	Reproduktionserfolg der Männchen	63
3.4.2.3	Genetische Väter, die nicht identifiziert werden konnten.....	66
3.5	EINFLUß PROXIMATER FAKTOREN AUF DEM INDIVIDUALNIVEAU.....	68
3.5.1	Limitierungen durch die Entfernung zu potentiellen EPC-Partnern	68
3.5.2	Limitierungen in bezug auf die Synchronität des Brutgeschäfts	70
3.5.3	Können proximate Faktoren das Nicht-Vorhandensein von EPY erklären?	71
3.6	EINFLUß ULTIMATER FAKTOREN AUF DAS AUFTRETEN VON EPY	73
3.6.1	Einfluß vermehrter EPC-Möglichkeiten auf die EPY-Rate	74
3.6.2	Reziproker „Betrug“	75
3.6.3	Überleben der Männchen.....	76
3.6.4	Überleben und Reproduktionserfolg der Nachkommen	79
4	DISKUSSION.....	82
5	ZUSAMMENFASSUNG	93
6	DANKSAGUNG.....	94
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	95
8	ANHÄNGE.....	106
	ANHANG A VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN.....	106
	ANHANG B VERZEICHNIS DER VERWENDETEN LÖSUNGEN UND CHEMIKALIEN.....	107

1 Einleitung

Vögel eignen sich sehr gut zur Untersuchung der Struktur von Paarungssystemen, da sie alle denkbaren Ausprägungen, von Monogamie über Polyandrie und Polygynie bis hin zur Promiskuität entwickelt haben (Übersichten in Birkhead & Møller 1992). Lange Zeit wurde dabei jedoch die Monogamie als das bei Vögeln vorherrschende Paarungssystem betrachtet. So vertrat z.B. Lack (1968) die Auffassung, daß über 90% aller Vogelarten monogam seien. Als wesentliche Ursache für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Monogamie galt dabei zunächst die Notwendigkeit biparentaler Brutfürsorge (Lack 1968). Später zog man jedoch auch in Betracht, daß das monogame Paarungssystem lediglich infolge gewisser Einschränkungen Bestand haben könnte (Emlen & Oring 1977, Wittenberger & Tilson 1980, siehe auch Gowaty 1996). Demzufolge wären monogame Männchen eher als „verhinderte Polygynisten“ zu bezeichnen, die wegen ökologischer Beschränkungen, Monopolisierung von Weibchen durch andere Männchen und/oder Aggressionen zwischen Weibchen zur Monogamie „gezwungen“ wären. Diese veränderte Sichtweise führte dazu, daß man vereinzelt beobachtete Kopulationen außerhalb des Paarbundes (z.B. Huxley 1912, Marler 1956, Robinson 1956), die anfangs als ein von der Norm abweichendes Verhalten einzelner Tiere interpretiert wurden (z.B. Goodwin 1955, Robinson 1956), in einem anderen Licht zu sehen begann. So war Trivers (1972) der Ansicht, daß Männchen ihren Reproduktionserfolg steigern können, indem sie sich mit einem Weibchen verpaaren und gleichzeitig mit anderen Weibchen kopulieren, ohne für deren Nachwuchs zu sorgen. Weibchen, deren Partner von geringer Qualität sind, könnten ihrerseits ihre Gesamtfitness steigern, indem sie mit hochwertigen Männchen kopulieren und so die Qualität ihrer Nachkommen verbessern (s.u.). Um beurteilen zu können, inwieweit solche „gemischten Fortpflanzungsstrategien“ (Trivers 1972) generell eine Rolle spielen, war es jedoch zunächst notwendig, die Häufigkeit ihrer phänotypischen Ausprägung zu ermitteln.

Elternschaftsbestimmungen gestalteten sich zunächst relativ schwierig, da keine geeigneten Methoden für Elternschaftsnachweise zur Verfügung standen. Die Verwendung morphologischer Marker, z.B. Unterschiede in der Gefiederfärbung (z.B. Cheng *et al.* 1983), Isoenzymanalysen oder geschlechtsspezifische Erblichkeitsstudien morphologischer Merkmale (z.B. Alatalo *et al.* 1984) ermöglichten es lediglich, einzelne Individuen von der Elternschaft auszuschließen. Für eine positive Identifizierung des betreffenden Elters erwiesen sich die betrachteten Merkmale hingegen als nicht variabel genug. Erst als Jeffreys *et al.* (1985 a, b) die Methode des genetischen Fingerabdrucks (*DNA-Fingerprinting*) etablierten, welche die Darstellung individualspezifischer DNA-Muster ermöglicht, wurde ein Weg geebnet, der diesbezügliche Studien erlaubte und dadurch Freilanduntersuchung zum Paarungssystem verschiedener Tierarten nachhaltig revolutionierte. Das Verfahren wurde nach Weiterentwicklung und Optimierung (z.B. Ali *et al.* 1986) inzwischen auch bei vielen bis zu diesem Zeitpunkt als monogam angesehenen Vogelarten angewandt. Dabei ließ sich zeigen, daß die Putativeltern, welche die Brut mit Futter versorgten, oftmals nicht unbedingt auch die genetischen Eltern aller Nestlinge waren. Die auch früher vereinzelt schon beobachteten Kopulationen außerhalb des Paarbundes (= *extra-pair copulations*, EPCs;

s.o.) führen also tatsächlich in vielen Fällen zur Befruchtung (= *extra-pair fertilizations*, EPFs, z.B. Burke & Bruford 1987, Übersichten in Westneat *et al.* 1990, Birkhead & Møller 1992, Westneat & Webster 1994), d.h. die aus ihnen resultierenden Nestlinge (= *extra-pair young*, EPY) stammen nicht vom Putativvater ab.

Bei 86% aller bisher untersuchten Singvogelarten konnten EPY nachgewiesen werden (Westneat & Sherman 1997). Alternative Fortpflanzungsstrategien, die den Reproduktionserfolg einzelner Individuen erheblich beeinflussen können und somit eine wichtige Voraussetzung für die sexuelle Selektion bei monogamen Arten darstellen (z.B. Møller & Birkhead 1994), sind bei Vögeln also weit verbreitet (Übersichten z.B. in Westneat *et al.* 1990, Birkhead & Møller 1992, Westneat & Sherman 1997). Als Konsequenz ist der Gebrauch des Begriffes „Monogamie“ bei den meisten Vogelarten allenfalls noch in Verbindung mit dem Zusatz „sozial“ zu rechtfertigen (Gowaty 1996), d.h. es muß zwischen sozialen und genetischen Eltern unterschieden werden.

Die oben genannten Befunde führten zu einer Intensivierung der Auseinandersetzung mit dieser Thematik. Dabei wurde u.a. relativ schnell deutlich, daß die Häufigkeit des Auftretens von Fremdvaterschaften (= *extra-pair paternity*, EPP) bei Vögeln sowohl inter- als auch intraspezifischen Schwankungen unterworfen ist. Die Unterschiede zwischen verschiedenen Arten sind erheblich. So konnten z.B. beim Steinkauz (*Athene noctua*, Müller *et al.* 2001) oder bei der Buntfußsturmschwalbe (*Oceanites oceanicus*, Quillfeldt *et al.* 2001) keine EPY nachgewiesen werden, während beim australischen Pracht-Staffelschwanz (*Malurus cyaneus*) 95% der Brutten EPY enthielten (Mulder *et al.* 1994). Auch zwischen Populationen derselben Art sind oftmals deutliche Unterschiede festzustellen (z.B. beim Trauerschnäpper [*Ficedula hypoleuca*], s. Brün *et al.* 1996, Lubjuhn *et al.* 2000), und auch innerhalb derselben Population können von Jahr zu Jahr Schwankungen auftreten (für die in dieser Arbeit untersuchten Kohlmeisen s. Lubjuhn *et al.* 1999 a). Als mögliche Ursachen für diese Variabilität werden verschiedene Faktoren diskutiert. Die Rolle ökologischer Faktoren wie Brutpaardichte (z.B. Gibbs *et al.* 1990, Gowaty & Bridges 1991 a, Dunn *et al.* 1994, Übersicht in Westneat & Sherman 1997) oder Synchronität der Brutpaare (z.B. Stutchbury & Morton 1995, Kempnaers 1997, Stutchbury 1998 a, b, Weatherhead & Yezerinac 1998) ist dabei umstritten, weshalb sich ein Teil der vorliegenden Untersuchungen gerade mit diesen Aspekten auseinandersetzt (s.u.).

Genauso umstritten, wie der Einfluß von Brutpaardichte und Brutsynchronität, ist die Frage nach dem Anpassungswert von Kopulationen außerhalb des Paarbundes. Für die Männchen scheint der Nutzen von EPCs auf der Hand zu liegen, da man davon ausgeht, daß sie ihren Reproduktionserfolg, gemessen an der Anzahl eigener Nachkommen, durch EPCs direkt erhöhen können. Ein Nutzen für Weibchen ist dagegen nicht derart offensichtlich. Daher herrschte lange Zeit die Annahme vor, daß mehr oder weniger passive Weibchen EPCs von Männchen aufgezwungen bekommen (z.B. Wrege & Emlen 1987, Westneat *et al.* 1990). Neuere Studien zeigten jedoch bald eine aktive Rolle der Weibchen, auch bei Kohlmeisen (s. Strohbach *et al.* 1998). Weibchen scheinen einerseits Männchen zu EPCs aufzufordern, andererseits Kopulationsversuche fremder Männchen erfolgreich abwehren zu können (z.B. Smith 1988, Gowaty & Bridges 1991 b, Björklund *et al.* 1992, Kempe-

naers *et al.* 1992, Lifjeld & Robertson 1992, Wagner 1992, Gowaty 1994, Lifjeld *et al.* 1994, Sheldon 1994, Hoi 1997, Strohbach *et al.* 1998, Double & Cockburn 2000, siehe aber Weatherhead 1999).

Ein Nutzen von EPCs für Weibchen muß aus evolutionsbiologischer Sicht generell deshalb gefordert werden, weil dieses Verhalten für Weibchen nachweislich nicht kostenneutral ist. So reduzieren z.B. Kohlmeisenmännchen ihre Fütterleistung und die Intensität der Brutverteidigung, wenn sich in dem betreffenden Nest EPY befinden, und passen ihren Elternaufwand damit der Anzahl eigener Nachkommen an (Lubjuhn *et al.* 1993, Lubjuhn 1995). Dies gilt auch für andere Vogelarten (s. Dixon *et al.* 1994, Weatherhead *et al.* 1994, Wright & Cotton 1994, Møller & Tegelström 1997, Sheldon *et al.* 1997, Lifjeld *et al.* 1998).

Bezüglich der Möglichkeiten eines adaptiven Wertes von EPCs für Weibchen diskutiert man derzeit verschiedene Hypothesen (Übersichten z.B. in Westneat *et al.* 1990, Birkhead & Møller 1992, Kempnaers & Dhondt 1993, Jennions & Petrie 2000). In der vorliegenden Arbeit werden zwei dieser Hypothesen ausführlich analysiert. Auf weitere Hypothesen zum Nutzen von EPCs für Weibchen wird in der Diskussion eingegangen. Den beiden hier geprüften Hypothesen ist gemeinsam, daß sie von einem *indirekten* Nutzen von EPCs für Weibchen ausgehen (zu einem möglichen *direkten* Nutzen siehe z.B. Wetton & Parkin 1991, Birkhead & Møller 1992, Gray 1997 a, b, Krokene *et al.* 1998, Lombardo *et al.* 1999).

Eine der beiden Hypothesen, mit denen sich die vorliegende Untersuchung eingehender beschäftigt, ist die sogenannte „Gute Gene“-Hypothese. Sie geht davon aus, daß Weibchen, die mit qualitativ schlechten Männchen verpaart sind, durch EPCs mit Männchen höherer Qualität versuchen, die genetische Qualität ihrer Nachkommen zu maximieren. Die „guten Gene“ könnten sich dabei einerseits in einer gesteigerten Vitalität und damit in einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit (Zahavi 1975, Hamilton & Zuk 1982, Andersson 1986), andererseits in einer stärkeren „Attraktivität“ und somit einem höheren Fortpflanzungserfolg der Nachkommen niederschlagen (Fisher 1930, Kirkpatrick 1982). Eine Reihe früherer Untersuchungen an Vögeln scheint die „Gute Gene“-Hypothese zu stützen (z.B. Houtman 1992, Kempnaers *et al.* 1992, 1997, Hasselquist *et al.* 1996, Sundberg & Dixon 1996). Es werden jedoch zunehmend auch Untersuchungen publiziert, die gegen ein Zutreffen dieser Hypothese bei verschiedenen Vogelarten sprechen (z.B. Gray 1997 a, b, Krokene *et al.* 1998, Strohbach *et al.* 1998, Lubjuhn *et al.* 1999 a, 2001, Whittingham & Dunn 2001).

Bei der zweiten Hypothese, die in der vorliegenden Arbeit eingehend berücksichtigt wird, handelt es sich um die Hypothese der genetischen Kompatibilität (s.a. Kempnaers & Dhondt 1993, Zeh & Zeh 1996, 1997, Brown 1997, Jennions 1997, Kempnaers *et al.* 1999). Sie geht im Gegensatz zur „Gute Gene“-Hypothese nicht von einer absolut höheren genetischen Qualität der EPC-Partner aus, sondern nimmt statt dessen einen Interaktionseffekt zwischen männlichem und weiblichem Genotyp an, d.h. im Sinne dieser Hypothese ist die genetische Qualität eines Männchens hauptsächlich von der Kompatibilität seines

Genoms mit dem des jeweiligen Weibchens abhängig. Weibchen würden demnach nicht Kopulationen mit einem generell hochwertigen Männchen suchen, sondern mit einem Männchen, dessen Genom mit dem eigenen am kompatibelsten ist und/oder es am besten ergänzt. Eine Studie an Blaukehlchen (*Luscinia svecica*, Johnsen *et al.* 2000), die zeigen konnte, daß bei dieser Vogelart EPCs offenbar die Immunkompetenz der betreffenden Nachkommen erhöht, läßt sich als Hinweis auf ein mögliches Zutreffen der Hypothese zur genetischen Kompatibilität deuten. Weitere Ergebnisse aus Untersuchungen an Baumschwalben (*Trachycineta bicolor*, Kempnaers *et al.* 1999) können ebenfalls in diesem Sinne interpretiert werden.

Sowohl den Untersuchungen zum Einfluß proximaler Faktoren, wie Brutpaardichte und Brutsynchronität, als auch den Untersuchungen zum potentiellen Nutzen von EPCs für Weibchen ist eins gemeinsam: Die meisten diesbezüglichen Studien schließen zwar Elternschaftsnachweise mit Hilfe des DNA-Fingerprinting ein und können somit EPY zweifelsfrei identifizieren. Sie gehen aber nur in Ausnahmefällen der Identifizierung der genetischen Väter der EPY nach (z.B. Webster *et al.* 2001). Die Ursachen hierfür liegen in der Methode begründet: Das DNA-Fingerprinting erlaubt zwar die Identifizierung der EPY, ist aber zur Auffindung der genetischen Väter dieser Nestlinge (= *extra-pair males*, EPMs) nicht geeignet, da ein Vergleich der Bandenmuster verschiedener „Fingerprint“-Gele nicht möglich ist. Umgehen lassen sich diese Schwierigkeiten mit Hilfe von Mikrosatellitenanalysen, da mit dieser vergleichsweise jungen Methode diskrete Allellängen definierter DNA-Loci bestimmt werden, die auch zwischen verschiedenen Gelen verglichen werden können.

Um diesbezügliche Untersuchungen an Kohlmeisen (*Parus major*) durchführen zu können, mußten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst Mikrosatellitensysteme für diese Vogelart etabliert werden. Das bei der anschließenden Analyse zur Identifizierung der genetischen Väter der EPY gewonnene Datenmaterial erlaubte es dann, verschiedenen Fragen nachzugehen, deren Beantwortung allein durch Multilocus DNA-Fingerprint Untersuchungen nicht möglich gewesen wäre. Im Zentrum standen dabei zum einen Analysen hinsichtlich des Einflusses proximaler Faktoren (Brutpaardichte und Brutsynchronität), die das Zustandekommen bzw. Nicht-Zustandekommen von Kopulationen außerhalb des Paarbundes beeinflussen könnten. Zum anderen wurden ultimate Einflußgrößen untersucht, die dem adaptiven Wert von Kopulationen außerhalb des Paarbundes zugrunde liegen könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Freilanduntersuchungen

2.1.1 Versuchsobjekt

Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden an Kohlmeisen (*Parus major*) durchgeführt. Diese, in der Paläarktis weit verbreitete Meisenart ist in fast allen Habitaten beheimatet (ausgenommen sind u.a. Wüsten und Tundren) und kommt in Mitteleuropa in den Niederungen und Mittelgebirgen häufig als Brutvogel vor. Die Art siedelt bevorzugt in Laubwäldern, ist aber v.a. in Ost-Europa auch in Laub-Nadelmischwäldern in hohen Dichten anzutreffen (Glutz von Blotzheim & Bauer 1993).

Kohlmeisen sind territoriale Höhlenbrüter, die in sozial monogamen Saisonhehen leben. Balz und Paarung erfolgen, je nach Wetterlage, im frühen April. Die Weibchen beginnen dann meist Mitte April mit der Eiablage (vgl. 3.1) und die Brutsaison dauert bis Anfang Juni (Glutz von Blotzheim & Bauer 1993, Gosler 1993). Während das Gelege ausschließlich vom Weibchen bebrütet wird, verteidigen beide Eltern die Eier und auch die Brut gemeinsam gegen potentielle Prädatoren. Ebenso beteiligen sich beide Altvögel an der Aufzucht der Nestlinge und später dann an der Fütterung der ausgeflogenen Jungtiere (Glutz von Blotzheim & Bauer 1993, Gosler 1993).

Nach erfolgreicher Erstbrut kann es im Anschluß noch zu einer zweiten Brut im Juni oder Juli kommen (vgl. 2.1.3.3 und 3.1). Die Zweitbrutrate variiert jedoch stark in Abhängigkeit von der Habitatqualität (Berndt 1938, Winkel 1975) und auch zwischen den Jahren (Glutz von Blotzheim & Bauer 1993, Gosler 1993). Neben den Zweitbruten unterscheidet man noch sogenannte Nachgelege von Erstbruten (s. 2.1.3.3 und 3.1). Hierbei handelt es sich um Gelege, die als Ersatz für aufgegebene oder zerstörte Erstbruten begonnen werden.

2.1.2 Untersuchungsgebiet

Das Untersuchungsgebiet liegt in der Nähe von Bahrdorf (52° 23' N, 10° 59' E) im östlichen Niedersachsen an der Landesgrenze zu Sachsen-Anhalt. Es ist Teil des „Braunschweiger Höhlenbrüterprogramms“ (Winkel 1996), in dessen Rahmen dort seit fast 40 Jahren populationsökologische Studien an verschiedenen höhlenbrütenden Singvogelarten durchgeführt werden. Das 160 ha große Untersuchungsgebiet ist ein Nutzwald, der sich in unterschiedlich strukturierte Teilflächen mit unterschiedlichem Baumbestand und Alter gliedert. Neben reinen Kiefern- (*Pinus spec.*) und Buchenbeständen (*Fagus sylvatica*) findet man dort überwiegend Mischwald mit einigen Eichen (*Quercus spec.*) und unterschiedlich hohem Totholzanteil. Eine Strauchschicht ist nur an wenigen Stellen ausgebildet. Detaillierte Beschreibungen des Versuchsgebietes sind bei Bernd & Winkel (1967) und Curio *et al.* (1984) zu finden.

Die Nistkästen sammelten sich im Untersuchungsgebiet sukzessive im Laufe der Jahre durch verschiedene Untersuchungen und Fragestellungen an. Aus diesem Grund ist die Verteilung der Nistkästen in den Gebieten nicht gleichförmig und auch die Bauform der Holzbeton-Nistkästen der Firma *Schwegler* variiert. Die Abstände der Nistkästen zueinander schwanken sehr stark. Sie liegen zwischen einigen Metern und fast 100 m. Im Versuchsgebiet Bahrdorf hingen zum Zeitpunkt der Untersuchungen ca. 690 Holzbeton-Nistkästen unterschiedlichen Bautyps, die in einer Höhe von ca. 1,5 m angebracht waren. Nur einige wenige Nistkästen, an den von Spaziergängern stark frequentierten Wegen, hingen aufgrund der Diebstahlgefahr in einer Höhe von etwa 2,5-4 m.

2.1.3 Untersuchungszeitraum und Datenerhebung

Die Freilanduntersuchungen wurden in den Jahren 1993, 1994, 1995 und 1996 durchgeführt. Dabei lag der Schwerpunkt in allen vier Jahren auf den Erstbruten. Vergleichsweise seltener wurden Nachgelege und Zweitbruten untersucht (vgl. 3.1). Mit Ausnahme des Jahres 1993 (s. 3.1) wurde dabei in jedem Jahr versucht, möglichst alle Kohlmeisen-Brutpaare der Population zu erfassen.

2.1.3.1 Kontrolle der Nistkästen

Die Nistkastenkontrollen im Bahrdorfer Untersuchungsgebiet erfolgten im angegebenen Untersuchungszeitraum durch verschiedene Personen. Beteiligt waren Mitarbeiter der Außenstation für Populationsökologie Braunschweig (inklusive ihres Leiters Herr Dr. W. Winkel und seiner Frau), Mitarbeiter der Arbeitsgruppe für Verhaltensforschung (Ruhr-Universität Bochum) und Mitarbeiter des Instituts für Evolutionsbiologie und Ökologie (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn).

Vom Beginn der jeweiligen Brutsaison an wurden regelmäßig alle Nisthöhlen des Untersuchungsgebiets in etwa zehn- bis vierzehntägigem Abstand kontrolliert, bis sämtliche Kohlmeisen-Brutansätze erfaßt waren. Bei der Festlegung der Kontrollfrequenz stand im Vordergrund, daß die brütenden Weibchen so wenig wie möglich gestört wurden. Das Alter der Nestlinge wurde während einer Kontrolle, die nach dem Schlupf der Jungtiere erfolgte, anhand ihrer Körper- und Gefiederentwicklung ermittelt (s. Winkel 1970). Anschließend wurden die Bruten – soweit möglich – bis zum Fang der Altvögel und den Blutentnahmen (s. 2.1.3.4) nicht mehr kontrolliert.

2.1.3.2 Ermittlung von Legebeginn und Vollgelege-Eizahl

Durch die Nistkastenkontrollen ließen sich Daten zum Legebeginn und zur Vollgelege-Eizahl erheben, deren Ermittlung im folgenden genauer erläutert wird.

Legebeginn

Lag zum Zeitpunkt der Kontrolle noch kein komplettes Gelege vor, ließ sich der Legebeginn unter der Annahme, daß täglich ein Ei gelegt wird (Glutz von Blotzheim & Bauer 1993, Gosler 1993), retrospektiv bestimmen. Für alle übrigen Bruten mit geschlüpften Nestlingen wurde der Legebeginn unter Berücksichtigung des Jungenalters (s. 2.1.3.1), der mittleren Bebrütungsdauer von 14 Tagen (Glutz von Blotzheim & Bauer 1993, Gosler 1993) und der Vollgelege-Eizahl (s.u.) errechnet. Schwierig gestaltete sich die Bestimmung des Legebeginns lediglich in einigen wenigen Fällen, wenn die Gelege bereits bei der ersten Kontrolle vollständig erschienen aber nicht ausgebrütet wurden. In diesen seltenen Ausnahmefällen wurde der Legebeginn anhand der Aufzeichnungen unter Berücksichtigung der wahrscheinlichen bisherigen Bebrütungsdauer geschätzt (dunkle Eier sind bereits mindestens 7 Tage bebrütet; Winkel, pers. Mitteilung).

Vollgelege-Eizahl

Ein Gelege wurde dann als Vollgelege angesehen, wenn die Eizahl bei zwei aufeinanderfolgenden Kontrollen im Abstand von mindestens drei Tagen identisch war bzw. wenn die letzte Gelegekontrolle nicht mehr als 13 Tage vor dem, anhand der Gefiederentwicklung der Nestlinge errechneten Schlupfs des ersten Jungvogels (s. 2.1.3.1) erfolgt war. Wenn beide Kriterien in Ausnahmefällen nicht erfüllt waren und die Anzahl der geschlüpften Jungtiere diejenige der maximal im Nest nachgewiesenen Eier übertraf, wurde die Vollgelege-Eizahl entsprechend nach oben korrigiert.

2.1.3.3 Klassifizierung der Brutansätze

Als Brutansatz eines Kohlmeisen-Paares wurde jedes Gelege gewertet, das während einer Kontrolle mindestens ein Kohlmeisen-Ei in einem typischen Kohlmeisen-Nest enthielt (s. Glutz von Blotzheim & Bauer 1993, Gosler 1993). Anhand des Legebeginns konnte dabei innerhalb einer Brutsaison zwischen Erstbruten, Zweitbruten und Nachgelegen unterschieden werden.

Erstbruten

Zu den Erstbruten wurden alle Brutansätze gerechnet, die sich innerhalb des Zeitraums vom Tag des ersten begonnenen Brutansatzes eines Jahres bis zum letzten Tag der daran anschließenden kontinuierlichen Abfolge von mindestens einem begonnenen Brutansatz pro Tag befanden (s.a. 3.1). Durch diese Zuordnung kann es zu einer geringfügigen Unterschätzung der Anzahl an Erstbruten eines Jahres kommen, da einige wenige Erstbrutansätze möglicherweise zu den Nachgelegen (s.u.) gerechnet werden. Andererseits ist so sichergestellt, daß sich die betreffende Gruppe ausschließlich aus Erstbruten zusammensetzt.

Zweitbruten

Eine Zweitbrut lag nachgewiesenermaßen dann vor, wenn die Erstbrut einer Kohlmeise erfolgreich abgeschlossen wurde (mindestens ein ausgeflogener Nestling) und für denselben Altvogel über die individuelle Ringnummer (s. 2.1.3.4) ein weiterer Brutansatz nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich wurden solche Brutansätze als Zweitbruten eingestuft, deren Legebeginne zeitgleich oder später als die erste nachgewiesene Zweitbrut der jeweiligen Brutsaison lagen. Auch hier kann es, wie schon bei den Erstbruten (s.o.), durch die Art der Zuordnung zu einer geringfügigen Unterschätzung der Zweitbrut-Anzahl kommen, da besonders frühe Zweitbruten unter Umständen noch zu den Nachgelegen (s.u.) gerechnet werden. Der Vorteil liegt jedoch wieder darin, daß sich die Gruppe der Zweitbruten mit hoher Wahrscheinlichkeit homogen aus tatsächlichen Zweitbrut-Ansätzen zusammensetzt.

Nachgelege

Bei Nachgelegen handelt es sich um Brutansätze, die aufgrund der Aufgabe eines Erstbrutgeleges oder des frühen Todes der betreffenden Jungtiere als Ersatzgelege initiiert werden. Da einerseits die individuelle Zuordnung aufgebener Gelege bzw. verlassener Bruten vor dem Fang der Altvögel unmöglich ist und andererseits die Perioden für Erst- und Zweitbruten vorgegeben waren (s.o.), wurde für die Nachgelege der verbleibende Zeitraum zwischen dem Ende der Erstbruten und dem Anfang der Zweitbruten definiert, um so eine lückenlose Einteilung in der jeweiligen Brutsaison zu ermöglichen. Bei dieser Vorgehensweise kann – wie bereits erwähnt – nicht ausgeschlossen werden, daß in der Gruppe der Nachgelege auch Erst- und Zweitbrutansätze enthalten sind. Dies sollte allerdings eher selten der Fall sein und spielt daher für die weiteren Betrachtungen keine Rolle.

2.1.3.4 Untersuchung der Altvögel und Nestlinge

Der Fang und die weitere Behandlung der Tiere erfolgten wieder durch eine ganze Reihe von Personen (s. 2.1.3.1). Dabei lagen alle erforderlichen Genehmigungen zum Fang und zur Beringung der Tiere sowie zum Befahren des Versuchsgebietes vor. Dies gilt auch für die zur Blutentnahme notwendigen behördlichen Genehmigungen nach § 8a TierSchG, § 9 Abs. 1 und 2 Tierversuchsgesetz sowie § 20g Abs. 6 Ziff. 3 in Verbindung mit § 20f Abs. 1 Satz 1 Ziff. 1 BNatSchG.

Fang

Der Fang der Altvögel erfolgte beim Füttern der acht bis zwölfstägigen Nestlinge in der Nisthöhle mit Hilfe spezieller Fangvorrichtungen.

Zunächst wurde eine Fallenkonstruktion aus Draht verwendet, die nach dem Falltür-Prinzip funktioniert (von Brün nach Curio modifiziert; Lubjuhn, persönliche Mitteilung). Sie wurde mit Hilfe von handelsüblichem Gewebeband so an der Innenseite der Höhlenvorderwand fixiert, daß sie von außen möglichst nicht sichtbar war. Ein unterhalb des Einfluglochs gespannter, dünner Nylonfaden hielt dabei eine aus leichtem Drahtgitter gebaute

Klappe geöffnet. Fütternde Altvögel, die beim Einflug in den Nistkasten diesen Faden berührten, entriegelten damit die Falltür, welche nun das Einflugloch von innen verschloß. Ein Magnet verhinderte, daß der im Nistkasten gefangene Vogel die Klappe öffnen und entweichen konnte. Die Kontrolle der Fallen erfolgte etwa alle 10 bis 15 min.

War in seltenen Fällen der Fang auf die oben beschriebene Weise nicht möglich, weil z.B. die Tiere vor der Falle scheuten, wurde die Höhle aus der Deckung heraus beobachtet, nach Einfliegen eines Altvogels angelaufen und das Einflugloch mit der Hand verschlossen.

Beringung, Geschlechts- und Altersbestimmung

Im Falle des Wiederfangs eines Altvogels wurde seine Ringnummer abgelesen. Unberingte Altvögel wurden am rechten Bein, Jungvögel zwischen dem achten und zwölften Tag am linken Bein mit Aluminiumringen des Instituts für Vogelforschung „Vogelwarte Helgoland“ individuell gekennzeichnet. Die Geschlechtsbestimmung erfolgte bei den Altvögeln anhand des Vorhandenseins eines Brutflecks beim weiblichen Elternteil und die Altersbestimmung bei den Nestlingen anhand der Körper- und Gefiederentwicklung (s. Winkel 1970).

Blutentnahme

Da die Erythrocyten von Vögeln Zellkerne und damit DNA enthalten, ist eine geringe Menge Blut (ca. 50 µl) ausreichend, um daraus die für die nachfolgend beschriebenen Methoden notwendige DNA-Gesamtmenge zu isolieren (s. 2.2). Zur Gewinnung der betreffenden Blutmenge wurde die Flügelvene (*Vena ulnaris*) des Vogels mit einer sterilen Mikrokantüle (z.B. Braun Sterican 100, Ø 0,4 mm) punktiert. Der austretende Blutstropfen wurde dann mit einer nicht heparinisierten Hämatokritkapillare (z.B. Brand No. 749321, Ø 1,1-1,2 mm) aufgenommen und anschließend in ein nummeriertes Eppendorf-Gefäß mit 250 µl APS-Puffer (Arctander 1988, s.a. Anhang B) überführt. Die Aufbewahrung der Proben bis zur weiteren Verarbeitung (s. 2.2.1.1) erfolgte nach Durchmischen von Blut und Puffer bei -20° C. Die Tiere wurden direkt nach der Blutentnahme unverzüglich freigelassen.

Zu erwähnen bleibt, daß die Blutung in Fällen, in denen sie nicht von alleine zum Erliegen kommt, mit Clauden-Watte (erhältlich in Apotheken) gestillt werden kann. Zudem sei an dieser Stelle auf detaillierte Untersuchungen hingewiesen, die gezeigt haben, daß bei Kohlmeisen keinerlei negative Einflüsse durch die Blutentnahme festzustellen sind (Lubjuhn *et al.* 1998).

2.1.3.5 Berechnung individual- und populationsspezifischer Maße

Die Daten zum Legebeginn und zur Vollgelege-Eizahl bildeten die Grundlage zur Festlegung der fertilen Phase jedes einzelnen Weibchens und zur Berechnung des sogenannten Brutsynchronitäts-Index (s.u.).

Fertile Phase von Weibchen

Für die Zeitdauer der fertilen Phase eines Weibchens sind mehrere Einzelvariablen ausschlaggebend (vgl. Birkhead & Møller 1992):

- (i) Überlebensdauer der im weiblichen Genitaltrakt gespeicherten Spermien (für die Kohlmeise unbekannt, vgl. 3.3)
- (ii) Zeitdauer zwischen der Befruchtung und der Ablage des betreffenden Eies (für Kohlmeisen normalerweise ein Tag; s. Glutz von Blotzheim & Bauer 1993, Gosler 1993)
- (iii) Anzahl der Eier des Vollgeleges und Länge des Intervalls zwischen der Ablage zweier Eier (letzteres bei Kohlmeisen wieder ein Tag; s. Glutz von Blotzheim & Bauer 1993, Gosler 1993)

Die für Kohlmeisen bekannten Größen (s. *ii* und *iii*) führen damit zu dem Schluß, daß die fertile Phase eines Kohlmeisen-Weibchens sich immer vom Tag vor der Ablage des ersten Eies bis zum Tag vor Ablage des letzten Eies erstreckt. Hinzu kommt dann noch die Zeitspanne für die Überlebensdauer der im weiblichen Genitaltrakt gespeicherten Spermien, welche die fertile Phase zeitlich entsprechend nach vorne ausdehnt. Da die Dauer der Überlebensfähigkeit von Kohlmeisenspermien im weiblichen Reproduktionstrakt unbekannt ist, wurden an entsprechender Stelle Berechnungen auf der Basis verschiedener, realistisch erscheinender Annahmen durchgeführt (vgl. 3.3).

Brutsynchronitäts-Index

Der Brutsynchronitäts-Index (*synchrony index*, *SI*) ist ein Maß für die Überlappung der fertilen Phasen (s.o.) einer Gruppe weiblicher Individuen. Entwickelt von Björklund & Westman (1986) und geringfügig modifiziert nach Kempnaers (1993) variiert er zwischen 0% (keine Überlappung der fertilen Phasen von Weibchen) und 100% (vollständige Synchronität der fertilen Phasen der betrachteten Weibchen). Berechnet wird der Brutsynchronitäts-Index wie folgt (s. Kempnaers 1993):

$$SI = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \left[\frac{\sum_{i=1}^{t_j} n_{i,j}}{t_j(N-1)} \right] \cdot 100$$

- mit:** N = Gesamtzahl brütender Weibchen der betrachteten Gruppe
 t_j = Dauer der fertilen Phase von Weibchen j (in Tagen, s.a. 3.3)
 $n_{i,j}$ = Anzahl weiterer fertiler Weibchen in der betrachteten Gruppe am Tag i der fertilen Phase von Weibchen j

2.2 Molekularbiologische Methoden

Vorbemerkung

Ein Verzeichnis der in diesem Kapitel verwendeten Abkürzungen und der verwendeten Lösungen und Chemikalien findet sich in Anhang A bzw. B.

2.2.1 Multilocus DNA-Fingerprinting

Ein Teil der Untersuchungen wurde mit Hilfe des genetischen Fingerabdruckverfahrens („DNA-Fingerprinting“) durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Darstellung hypervariabler DNA-Regionen, die aus repetitiven DNA-Sequenzen aufgebaut sind. Das Prinzip wurde von Jeffreys *et al.* (1985 a, b) etabliert und seitdem in Details mehrfach verändert und weiterentwickelt. In der vorliegenden Untersuchung wurde ein nach Ali *et al.* (1986) modifiziertes Verfahren angewandt, bei dem durch Verwendung von synthetisch hergestellten Oligonukleotiden spezifische hypervariable Regionen, sogenannte „simple repetitive Sequenzen“, nachgewiesen werden können. Die repetitiven Bereiche werden dabei unter Verwendung einer geeigneten Restriktionsenzym/Oligonukleotidsonden-Kombination in Form von Bandenmustern dargestellt. Diese Bandenmuster sind individualspezifisch und werden nach den Mendel'schen Regeln vererbt. Daher ist neben der individuellen Identifizierung über den genetischen Fingerabdruck auch eine eindeutige Klärung von Abstammungsfragen möglich. Das Verfahren setzt sich aus verschiedenen Arbeitsschritten zusammen, die im folgenden in einen Gesamtkontext gestellt und nachfolgend dann detailliert beschrieben werden.

In einem ersten Schritt wurde die DNA aus kernhaltigen Zellen isoliert (s. 2.2.1.1). Dazu wurden abhängig von dem gewählten Zelltyp verschiedene Methoden verwendet, im vorliegenden Fall ein von Lubjuhn (1994) nach Miller *et al.* (1988) für Vogelblut modifiziertes Protokoll (s.a. Lubjuhn & Sauer 1999). Nach der DNA-Isolation wurde die genomische DNA mit spezifischen Restriktionsenzymen in DNA-Fragmente definierter Länge geschnitten (s. 2.2.1.2). Die dabei entstandenen Fragmente waren unterschiedlich lang, da die entsprechenden Erkennungssequenzen mehr oder weniger zufällig über das gesamte Genom verteilt sind. Nach Durchtrennen des DNA-Doppelstrang durch das Restriktionsenzym konnten die einzelnen Fragmente mit Hilfe einer Gelelektrophorese abhängig von ihrer Größe aufgetrennt werden (s. 2.2.1.3). Durch die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden Fragmente, die bestimmte repetitive Sequenzen enthielten, mittels spezifischer Oligonukleotidsonden sichtbar gemacht. Dazu mußte das Agarose-Gel zunächst getrocknet werden (s. 2.2.1.4), bevor es in eine alkalische Denaturierungslösung überführt wurde (s. 2.2.1.5). Durch die Denaturierung wurden die DNA-Doppelstränge in ihre Einzelstränge zerlegt. Erst dann konnten die Oligonukleotidsonden, die zuvor radioaktiv markiert wurden, an die ihnen komplementären DNA-Abschnitte binden. Die Markierung der Oligonukleotidsonden erfolgte durch Einbau eines radioaktiven (^{32}P)-Isotops, welches enzymatisch an das 5'-Ende der Sonden angehängt wurde (s. 2.2.1.6). Bei der nachfolgenden

Hybridisierung (s. 2.2.1.7) mußte darauf geachtet werden, daß die zuvor berechnete Temperatur eingehalten wurde, um unspezifische Bindungen an nicht 100% komplementäre Sequenzen zu verhindern. Abschließend wurden dann mit einem spezifischen Nachweisverfahren die Stellen, an denen sich die Oligonukleotidsonden angelagert hatten, in Form von Bandenmustern sichtbar gemacht (s. 2.2.1.8) und ausgewertet (s. 2.2.1.9).

Will man eine in dieser Hinsicht noch nicht bearbeitete Tierart untersuchen, so muß normalerweise zuerst eine geeignete Restriktionsenzym/Oligonukleotidsonden-Kombination gefunden werden, da nicht alle Kombinationen hinreichend informative Bandenmuster liefern. Im vorliegenden Fall war dies nicht notwendig, da entsprechende Studien an Kohlmeisen bereits vorliegen (s. Lubjuhn 1994). Die Kombination aus Restriktion mit dem Enzym *Hae* III (Schnittstelle: GG[?]CC) und Hybridisierung mit dem Oligonukleotid (CA)₈ liefert hochinformativ Bandenmuster, die exakte Abstammungsbegutachtungen erlauben (vgl. Krawczak & Lubjuhn 1995, Lubjuhn 1994, 1995, Lubjuhn *et al.* 1996, 1999 a, Strohbach *et al.* 1998).

2.2.1.1 DNA-Isolation

Aus der aufgetauten Blutprobe wurde eine geringe Menge (25-30 µl) des Blut/Puffergemisches in 100 µl Proteinase K-Puffer gegeben. Anschließend wurde die Probe durch wiederholtes Ziehen über ein engmaschiges Metallgitter („Reibe“) gut durchmischt und dann 5 min zentrifugiert (13000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen als Pellet erhalten. Diese wurden in 280 µl Proteinase K-Puffer resuspendiert. Zur Freisetzung der DNA wurden 18 µl SDS und 11 µl Proteinase K-Stammlösung zugegeben. Anschließend wurde die Probe für mindestens 2 h (alternativ über Nacht) bei 55° C im Wasserbad inkubiert.

Die Extraktion der DNA erfolgte dann durch Ausfällen der Proteine bei hohen Salzkonzentrationen. Dazu wurde die Probe mit 100 µl gesättigter NaCl-Lösung gut durchmischt („Reibe“, s.o.) und anschließend 20 min zentrifugiert (13000 rpm). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml 100% Ethanol versetzt. Dieses Gemisch wurde solange invertiert, bis sich die beiden Phasen durchmischt hatten und die DNA ausgefallen war. Danach wurde die Probe für 20 min bei -80° C gelagert und dann 15 min zentrifugiert (13000 rpm). Der Überstand wurde verworfen, und anschließend wurde in einem Waschschrift 1 ml 70% Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde erneut gut durchmischt und dann 10 min zentrifugiert (13000 rpm). Der Überstand wurde wieder verworfen, die Restflüssigkeit abgetupft und die Probe bei 37° C im Wärmeschrank getrocknet. Die so erhaltene DNA wurde in 200 µl 1x TE-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4° C aufbewahrt. Nach 4-5 Tagen wurden Konzentration und Reinheit der DNA in einem Testgel überprüft (s. 2.2.1.3).

2.2.1.2 Restriktionsabbau der genomischen DNA

Zur Darstellung der hypervariablen DNA-Regionen mußte die genomische DNA mit Restriktionsenzymen zunächst in definierte Fragmente aufgespalten werden. Der jeweilige Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5-10 µg DNA (die einzusetzende Menge in µl ergab sich aus der Schätzung im Testgel, s. 2.2.1.3), 5 µl *Hae* III (entspricht 50 U bei einer Ausgangskonzentration von 10 U/µl) und $\frac{1}{10}$ Vol. des vom Enzymhersteller mitgelieferten 10x Restriktionspuffers. Der Ansatz wurde mit A. bidest. auf ein Gesamtvolumen von 100 µl eingestellt, invertiert, anzenrifugiert und über Nacht bei 37° C im Wärmeschrank inkubiert.

Zur Beendigung der enzymatischen Reaktion wurde der Restriktionsansatz mit $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M Na-Acetat und 2,5 Vol. 100% Ethanol versetzt und für 20 min bei -80° C gelagert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (15 min bei 13000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und die Probe mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, d.h. invertiert und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgegossen und die Probe im Wärmeschrank bei 37° C getrocknet. Der getrocknete Ansatz wurde in 11 µl TE-Puffer resuspendiert (entweder über Nacht oder 2 h auf einem Schüttler).

Ein Zehntel dieses Ansatzes, d.h. 1 µl, wurde später zur Überprüfung auf ein Testgel aufgetragen (s. 2.2.1.3). Falls notwendig konnte der Ansatz bis zur weiteren Bearbeitung bei -20° C eingelagert werden.

2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Das Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese besteht darin, daß DNA und DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung in einem angelegten Spannungsfeld von der Kathode zur Anode wandern. Innerhalb der Gelmatrix, die ein dreidimensionales Netzwerk darstellt, wandern verschieden lange Fragmente unterschiedlich schnell, wodurch es zu einer Auftrennung aufgrund unterschiedlicher Laufstrecken kommt.

Herstellen und Beladen der Gele

Zur Herstellung der Gele wurde Agarose in der jeweils angegebenen Konzentration (s.u.) durch Aufkochen in 1x TBE gelöst. Bei den größeren „Fingerprint“-Gelen (s.u.) wurde die Agaroselösung vor dem Gießen zusätzlich gefiltert, um eine einheitliche Struktur des Gels zu gewährleisten. Vor dem Gießen des Gels wurden, wenn vorhanden, die Stege des horizontal ausgerichteten Gelträgers mit der frisch aufgekochten Agarose abgedichtet. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60° C wurde sie auf den jeweiligen Gelträger gegossen und die Kämme für die Probenkammern wurden eingesetzt. Nach ca. 1 h war das Gel ausreichend ausgehärtet, so daß die Gelkammer mit 1x TBE so weit gefüllt werden konnte, bis das Gel 1-2 mm überschichtet war. Anschließend wurden die Stege (falls vorhanden) und der zuvor eingesteckte Kamm entfernt.

Anfärben der DNA

Um nach Beendigung der Elektrophorese (zu Laufzeiten und angelegter Spannung, s.u.) die DNA sichtbar zu machen, wurde das Gel mit einer Ethidiumbromid-Färbelösung behandelt. Ethidiumbromid eignet sich zum Färben von DNA im Gel, da es sich in den DNA-Doppelstrang einlagert. Der DNA-Ethidiumbromidkomplex absorbiert UV-Licht (302 nm) und strahlt dann sichtbares Licht ab, das fotografisch festgehalten werden kann.

Bei den Testgelen (s.u.) war das Ethidiumbromid bereits in der Agaroselösung und im Laufpuffer enthalten (Endkonzentration: 0,125 µg Ethidiumbromid/ml 1x TBE). Die „Fingerprint“-Gele (s.u.) wurden nach Abbruch der Elektrophorese für 20-30 min in eine Ethidiumbromidlösung (5 µg Ethidiumbromid/ml A. bidest.) gelegt und zur Reduktion unspezifischer Färbungen vor dem Fotografieren für 10 min in A. bidest. gewässert. In beiden Fällen erfolgte die Dokumentation über ein Videosystem (*SL-Microtest*) mit angeschlossenen Thermodrucker (*Sony*).

Testgele zur Kontrolle von genomischer DNA und Restriktionsansätzen

Zur Kontrolle und zur Mengenabschätzung der einzusetzenden Volumina wurden die isolierte genomische DNA (s. 2.2.1.1) und die restringierte DNA (s. 2.2.1.2) in einem Testgel (7 x 10 cm, 0,9% Agarose) überprüft. Dazu wurde jeweils 1 µl der zu kontrollierenden DNA mit 3 µl 3x Gelladepuffer als Probe eingesetzt. Pro Probenreihe wurde außerdem ein Längenstandard aufgetragen (1 µl λ /*Hind* III + 3 µl 3x Gelladepuffer). Anschließend wurde für ca. 10 min eine Spannung von 130 V angelegt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert (s.o.).

In bezug auf die isolierte genomische DNA sollte eine distinkte Bande bei etwa 23 kb zu erkennen sein. Fehlte eine eindeutige Bande oder war unterhalb der eigentlichen Bande eine Art „DNA-Schmier“ zu erkennen, so ließ dies auf Verunreinigungen oder DNA-Degradierung schließen. Anhand der Farbintensität der erhaltenen Bande konnte über einen Vergleich mit dem Längenstandard (die aufgetragene Menge entsprach ca. 200 ng) auch eine Konzentrationsabschätzung der eingesetzten DNA durchgeführt werden, damit bei der nachfolgenden Restriktion (s. 2.2.1.2) in etwa gleiche DNA-Mengen eingesetzt werden konnten.

Bei der Überprüfung der Restriktionsansätze sollte die genomische DNA-Bande verschwunden sein. Unterhalb der ursprünglichen Position sollte dafür ein mehr oder weniger gleichmäßiges „Schmiersignal“ sichtbar werden. Anhand der Farbintensität konnten die DNA-Mengen der einzelnen Proben erneut verglichen und somit – falls notwendig – vor dem Auftragen auf das „Fingerprint-Gel“ noch einmal angeglichen werden.

„Fingerprint“-Gele

Pro Ansatz wurden 5-10 µg restringierte DNA eingesetzt, wobei die einzusetzende Menge anhand des Testgels abgeschätzt wurde (s.o.). Es ist darauf zu achten, daß annähernd gleiche DNA-Mengen aufgetragen werden, um Schwierigkeiten bei der späteren Auswertung zu vermeiden (s.a. 2.2.1.9). Alle Proben wurden mit jeweils 2 µl 6x Gelladepuffer versetzt.

Pro Gel (Größe: 20 x 40 cm, 0,8% Agarose) wurde zusätzlich ein Längenstandard (2 μ l λ /Hind III + 8 μ l TE + 2 μ l 6x Gelladepuffer) aufgetragen, um die Länge einzelner Fragmente abschätzen zu können. Anschließend wurde für ca. 72 h eine Spannung von 80 V angelegt. Danach wurde das Gel gefärbt und zur Dokumentation unter UV-Licht fotografiert (s.o.).

2.2.1.4 Trocknen der „Fingerprint“-Gele

Die Hybridisierung (Anlagerung der DNA-Sonde an ihre Zielsequenz) kann bei der Verwendung von Oligonukleotidsonden direkt im Gel erfolgen, so daß der aufwendige und mit DNA-Verlust verbundene „Southern Blot“ (Southern 1975, Sambrook *et al.* 1989), d.h. ein Transfer auf eine immobilisierende Membran, entfallen konnte. Die Immobilisierung der DNA wurde in dem in dieser Arbeit angewendeten Verfahren vielmehr durch einen Trocknungsschritt erreicht, bei dem durch Wasserentzug das Agarose-Netzwerk verdichtet wird (Shinik *et al.* 1975, Tsao *et al.* 1983). Zu diesem Zweck wurden die Gele mit der Unterseite auf 2 Lagen Filterpapier (z.B. GB002, Schleicher & Schuell) gelegt, und die andere Seite mit Haushaltsfolie blasenfrei abgedeckt. Das Ganze wurde auf einen Geltrockner (*BioRad*) überführt, und dem Gel dort in einem ersten Schritt bei Raumtemperatur durch das Anlegen eines Vakuums (Vakuumpumpe GP 110, *Savant*) für ca. 30 min das Wasser entzogen. In einem zweiten Schritt wurden die Gele bei 60° C für ca. 2 h vollständig getrocknet (ebenfalls unter Vakuum). Eine vollständige Trocknung war erreicht, wenn die untere Lage des Filterpapiers komplett trocken war. Verbleibende Restfeuchtigkeit kann bei längerer Lagerung dazu führen, daß durch Pilzwachstum die DNA auf den Gelen zerstört wird (Nürnberg & Epplen 1992). Vollständig getrocknete Gele hingegen können bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

2.2.1.5 Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Fragmente

Vorbemerkung

Aus sicherheitstechnischen Gründen wurden alle unter den Punkten 2.2.1.5 - 2.2.1.8 aufgeführten Schritte am Institut für Molekulare Humangenetik der Ruhr-Universität Bochum (Leiter: Prof. Dr. J.T. Epplen) durch eine technische Assistentin durchgeführt. Um die Vorgehensweise vollständig zu beschreiben, werden sie im folgenden dennoch aufgeführt.

Zunächst wurden die getrockneten Gele in A. bidest. gewässert, bis sie sich vollständig von Filterpapier und Haushaltsfolie gelöst hatten. Um eine Hybridisierung der Oligonukleotidsonden mit den Komplementärsequenzen der genomischen DNA zu ermöglichen, mußte dann die noch doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge aufgespalten werden. Dazu wurden die Gele für jeweils 30 min zuerst in Denaturierungslösung und anschließend in Neutralisierungslösung gelegt. Dann wurden sie kurz in 6x SSC äquilibriert und in die Hybridisierungsröhren überführt (s. 2.2.1.7).

2.2.1.6 Radioaktive Markierung der Oligonukleotide

Vor der eigentlichen Hybridisierung fand die radioaktive Markierung und Aufreinigung der Oligonukleotidsonden statt. Bei der radioaktiven Markierung wurde mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase jeweils ein (^{32}P)-Molekül von ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP auf das freie 5'-Ende der Oligonukleotide übertragen (Miyada *et al.* 1985, Thein & Wallace 1986). Der verwendete Reaktionsansatz enthielt dabei 10 pmol Oligonukleotidsonde, 3 μl A. bidest., 1 μl 10x Kinasepuffer, 5 μl ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP (entspricht ca. 50 μCi) und 1 U T4-Polynukleotidkinase. Der Ansatz wurde für 60 min auf Eis inkubiert, dann mit 1x TE auf ein Endvolumen von 100 μl verdünnt und bis zum Abtrennen des ungebundenen ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP auf Eis aufbewahrt. Beim Aufreinigen wurde das nicht eingebaute ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie von den Oligonukleotiden getrennt (Epplen 1992, Lubjuhn 1994). Ausgenutzt werden dabei die unterschiedlichen Affinitätseigenschaften von ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP und Oligonukleotiden. Nicht eingebautes ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP löst sich bereits bei geringen Salzkonzentrationen (0,2 M NaCl) vom Säulenmaterial, die Oligonukleotide erst bei höheren Salzkonzentrationen (0,5 M NaCl). Zur Durchführung der Ionenaustauschchromatographie verwendet man eine DEAE-Säule. Dazu wurde in einer Econo-Säule (*Bio-Rad*) aus Polypropylen durch Aufpipettieren einer DEAE-Suspension (in 1x TE, pH 8,0; s. Epplen 1992) eine Schichtung von 0,2-0,3 ml Festmaterialvolumen erzeugt. Dann wurde der Reaktionsansatz aufgetragen und nach einer kurzen Wartezeit, um ein Eindiffundieren des Ansatzes in die Matrix zu ermöglichen, das nicht eingebaute ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP durch sukzessive Zugabe von 4 ml Elutionspuffer I und 2 x 2 ml Elutionspuffer II ausgewaschen. Die anschließende Elution der Oligonukleotide erfolgte durch Zugabe von 2 x 500 μl Elutionspuffer III. Durch Messung mit einem Szintillationszähler konnte die Aktivität der Oligonukleotide bestimmt werden. Bis zur Hybridisierung wurden die Oligonukleotidsonden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.1.7 Hybridisierung der „Fingerprint“-Gele

Die Hybridisierung erfolgte in Anlehnung an ein von Tsao *et al.* (1983) entwickeltes Verfahren. Hierzu wurden die äquilibrierten Agarose-Gele in verschließbare Hybridisierungsröhren überführt. Dabei war darauf zu achten, daß die Gele glatt an der Wand anlagen. Dazu wurde das Gel zuerst auf eine 25 ml Glaspipette aufgewickelt, mit dieser in die Hybridisierungsröhre eingeführt, und unter Anlegen an die Glaswand wieder abgewickelt. Dann wurden 10 ml Hybridisierungslösung zugegeben, die mit den zuvor markierten Oligonukleotiden (s. 2.2.1.6) auf eine Aktivität von ca. 10^6 cpm/ml eingestellt wurden. Die nachfolgende Hybridisierung erfolgte bei einer für die Oligonukleotide spezifischen Temperatur in temperierbaren Öfen (z.B. UM 400B Hyb., *Bachofer*), in welche die Hybridisierungsröhren waagrecht eingespannt und dann permanent um die Mittelachse gedreht wurden. Dadurch wurde gewährleistet, daß das gesamte Gel gleichmäßig und fortwährend in Kontakt mit der Hybridisierungslösung blieb. Um eine ausreichende Spezifität bei der Hybridisierung zu gewährleisten, wurde die Hybridisierungstemperatur auf 5°C unterhalb der

Schmelztemperatur des betreffenden Oligonukleotids eingestellt (Sambrook *et al.* 1989). Die Schmelztemperatur (TS) berechnet sich dabei folgendermaßen:

$$TS = 2 \cdot (nA + nT) + 4 \cdot (nC + nG) \quad \text{mit: } nA, nT, nC, nG = \text{Anzahl des jeweiligen Nukleotids}$$

Für die in der vorliegenden Arbeit verwendete Oligonukleotidsonde $(CA)_8$ ergab sich daraus als Hybridisierungstemperatur 43°C . Niedrigere Temperaturen verursachen eine Zunahme unspezifischer Bindungen, höhere Temperaturen verhindern eine Anlagerung der Sonden. Die Dauer der Hybridisierung betrug mindestens 3 h (alternativ über Nacht).

Zur Entfernung der unspezifischen Aktivität wurden die Gele nach der Hybridisierung dreimal 30 min bei Raumtemperatur und einmal 60 s bei Hybridisierungstemperatur (*hot-wash*) in 6x SSC gewaschen. Anschließend wurden die Gele trocken getupft und für die Autoradiographie bzw. für die Darstellung der Bandenmuster mit Hilfe eines sogenannten Phosphor-Imagers in Haushaltsfolie eingepackt.

2.2.1.8 Darstellung der Bandenmuster

Die beiden im folgenden beschriebenen Vorgehensweisen zur Darstellung der Bandenmuster wurden alternativ angewandt. Entsprechende Geräte für die zweitgenannte Methode standen erst ab dem Jahr 2000 zur Verfügung.

Autoradiographie

Die eingepackten Gele wurden in dafür vorgesehene Röntgenfilmkassetten gelegt und mit einem Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR bzw. Fuji RX) passender Größe bedeckt. Die Belichtung des Films erfolgte durch die Emission von β -Strahlung durch die radioaktiv markierten Oligonukleotide. Dadurch wurde der Röntgenfilm an den Stellen belichtet, an denen eine Anlagerung der Sonden erfolgt war. Die jeweilige Expositionsdauer hing von der Aktivität der Sonde, der Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen und der aufgetragenen DNA-Menge ab. Sie betrug zwischen 2 und 5 Tagen. Die benötigte Zeit wurde anhand eines Kontaminationsmonitors (Multirad, *Electronique G.M.*) abgeschätzt. Alle Filme wurden dann maschinell entwickelt (M35, *Kodak*) und bildeten die Grundlage für die weiteren Auswertungen (s. 2.2.1.9).

Darstellung mit Hilfe eines Phosphor-Imagers

Der Nachweis der Bindungsstellen der radioaktiven Oligonukleotidsonden mit Hilfe eines Phosphor-Imagers (Storm 860, *Amersham*) hat Vorteile in bezug auf den Materialverbrauch, da keine teuren Röntgenfilme benötigt werden. Die in Haushaltsfolie gepackten Gele wurden in eine Expositionskassette gelegt und mit einer speziellen Folie bedeckt. Diese Folie ist mit anorganischen Verbindungen beschichtet, die auf radioaktive Strahlung mit verschie-

denen Oxidations- und Reduktionsprozessen reagieren. Die Dauer der Exposition war von den gleichen Faktoren abhängig wie bei der Autoradiographie und betrug im allgemeinen zwischen 1-2 h bei Raumtemperatur (die Abschätzung der genauen Expositionsdauer erfolgte wieder mit einem Kontaminationsmonitor). Die Stellen, an denen sich die Moleküle chemisch verändert hatten (= Anlagerungsstellen der Oligonukleotidsonden), ließen sich dann letztendlich mit Hilfe eines speziellen Scanners nachweisen. Bei Bestrahlung mit Rotlicht (635 nm) emittieren die chemisch veränderten Moleküle Licht im Bereich von 390 nm, welches dann vom Scanner detektiert wird. Nach Abschluß des Scanvorgangs (Dauer ca. 10 min) wurde das erhaltene Bild in einer Datei gespeichert. Diese Datei bildet die Grundlage für die weitere Auswertung der Bandenmuster. Die auf der Folie gespeicherte Information kann durch intensive Bestrahlung mit Licht gelöscht werden, da die veränderten Moleküle dadurch in ihren Ursprungszustand zurückversetzt werden.

2.2.1.9 Auswertung der Bandenmuster

Die Analyse der Bandenmuster erfolgte unterschiedlich, je nachdem welches Verfahren zur Darstellung der Bandenmuster gewählt wurde (s. 2.2.1.8). Die mittels Autoradiographie hergestellten Röntgenfilme wurden im Durchlicht auf einem Leuchtkasten analysiert. Mit Hilfe des Phosphor-Imagers generierte Bilddateien wurden zunächst in ein geeignetes Format (*.tif) überführt, dann mit einem geeigneten Computerprogramm geöffnet (z.B. Photoshop 6.0, *Adobe*) und schließlich am Monitor ausgewertet. In beiden Fällen wurden alle im Bereich von 30 bis 2 kb liegenden Banden in die Auswertung einbezogen. Die Auswertung wurde für jedes Gel gesondert durchgeführt, da es aufgrund unterschiedlicher Randbedingungen (Gelbeschaffenheit, Spannungs- und Konzentrationsunterschiede) zu unterschiedlichen Laufstrecken gleich langer DNA-Fragmente kommen kann und ein Vergleich der Bandenmuster verschiedener Gele deshalb nicht möglich ist.

Bei der Beurteilung der Übereinstimmung spezifischer Banden zwischen verschiedenen Individuen wurden folgende Grundregeln befolgt (vgl. Westneat 1990):

- (i) Banden wurden dann als übereinstimmend gewertet, wenn die Zentren weniger als 0,5 mm Differenz in ihrer Laufstrecke aufwiesen.
- (ii) Unterschiede in der aufgetragenen DNA-Menge wurden bei der Auswertung berücksichtigt, d.h. eine sehr schwache Signalbande wurde beim Vergleich mit einer stärkeren Bande dann in die Auswertung aufgenommen, wenn bei dem Individuum mit der schwächeren Signalbande grundsätzlich weniger DNA aufgetragen worden war.
- (iii) Grundsätzlich wurden alle Vergleiche konservativ durchgeführt, d.h. es wurde versucht, alle bei den Nachkommen auftretenden Banden aus den Bandenmustern der Putativeltern abzuleiten.

Alle Banden, die der betreffende Nestling nach dieser Form der Auswertung immer noch mit keinem der beiden Putativeltern teilte, waren folglich auf Mutationen zurückzuführen oder darauf, daß es sich bei mindestens einem der beiden Putativeltern nicht um den gene-

tischen Elter handelte. Weitere Einzelheiten zur Auswertung sind an entsprechender Stelle im Ergebnisteil zu finden (s. 3.2).

2.2.2 Mikrosatellitenanalysen

Das in den vorangegangenen Kapiteln beschriebene Verfahren des Multilocus DNA-Fingerprinting (s. 2.2.1) ermöglicht über individualspezifische Bandenmuster zwar die zweifelsfreie Identifikation von Jungtieren, die nicht von einem oder beiden sozialen Eltern abstammen. Bei der Suche nach den genetischen Eltern dieser Jungtiere ist es aber nur sehr begrenzt einsetzbar, da einzelnen Banden keine absolute Fragmentlänge zugewiesen werden kann und ein Vergleich der individualspezifischen Bandenmuster zwischen verschiedenen „Fingerprint“-Gelen somit nicht möglich ist (s.a. 2.2.1.9). Diese Schwierigkeiten lassen sich durch die im folgenden beschriebenen Mikrosatellitenanalysen umgehen. Bei diesem Verfahren werden nämlich diskrete Allellängen definierter DNA-Loci ermittelt, die einem Individuum unabhängig vom Gel zugeschrieben werden können.

Bei Mikrosatellitenanalysen wird der Längenpolymorphismus einzelner Mikrosatelliten-Loci unter Zuhilfenahme der Polymerasekettenreaktion (PCR, s. Saiki *et al.* 1985, 1988, White *et al.* 1989) dargestellt. Die Spezifität für einen definierten Mikrosatelliten-Locus wird dabei durch die Verwendung von Oligonukleotidprimern erreicht, die eine Länge von etwa 20 Nukleotiden besitzen und deren Sequenzen komplementär zu den flankierenden Bereichen der betreffenden repetitiven Region sind. Die mit Hilfe dieser locus-spezifischen Primer bei der PCR erhaltenen Amplifikate chromosomaler DNA (meist etwa 100-400 bp lang) werden dann auf einem hochauflösenden Polyacrylamidgel der Länge nach aufgetrennt, so daß man für jedes Individuum pro Mikrosatelliten-Locus eine (homozygote Individuen) bzw. zwei Banden (heterozygote Individuen) erhält, deren Längen exakt bestimmbar sind. Der zu beobachtende Längenpolymorphismus zwischen verschiedenen Allelen basiert dabei in den allermeisten Fällen auf einem Polymorphismus in der Anzahl der im amplifizierten Fragment enthaltenen repetitiven Einheiten. Die Allellängen können dabei zwar zwischen verschiedenen Tieren variieren, sind jedoch für jedes Individuum konstant und werden nach den Mendel'schen Regeln an die Nachkommen vererbt. Nachkommen erhalten also in bezug auf jeden Mikrosatelliten-Locus jeweils ein Allel von ihrer Mutter und eines von ihrem Vater. Die Individualspezifität eines einzelnen Mikrosatellitensystems ist dabei aufgrund des geringen Informationsgehaltes (maximal zwei dargestellte Banden pro Individuum) naturgemäß begrenzt. Mit zunehmender Anzahl unabhängiger Mikrosatellitensysteme erhöht sich die Spezifität der für ein Individuum erhaltenen Allelkombinationen jedoch deutlich.

Unglücklicherweise lassen sich Mikrosatellitensysteme, die locus-spezifisch für eine bestimmte Tierart etabliert wurden, nicht ohne weiteres auf andere Species übertragen. Sie müssen vielmehr in den meisten Fällen für jede zu untersuchende Tierart neu entwickelt werden. Dies war auch hinsichtlich der geplanten Analysen zum Fortpflanzungsverhalten von Kohlmeisen notwendig, da geeignete Mikrosatellitensysteme für diese Vogelart in der

Literatur nicht beschrieben waren. Die diesbezüglich notwendigen Arbeitsschritte sind im folgenden vorab in einen übergreifenden Gesamtkontext gestellt und werden in den anschließenden Unterkapiteln dann ausführlicher beschrieben. Alle zur Etablierung der Systeme durchgeführten Arbeitsschritte wurden dabei aus sicherheitstechnischen Gründen wieder am Institut für Molekulare Humangenetik der Ruhr-Universität Bochum (Leiter: Prof. Dr. J.T. Epplen) durchgeführt. Die routinemäßige Anwendung erfolgte hingegen am Institut für Evolutionsbiologie und Ökologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (Leiter: Prof. Dr. K.P. Sauer).

Zunächst wurde zur Klonierung chromosomaler Kohlmeisen DNA eine subgenomische Genbank erstellt (s. 2.2.2.1). Der erste Arbeitsschritt bestand dabei in einem Restriktionsverdau genomischer Kohlmeisen DNA. Danach wurden die resultierenden DNA-Fragmente eines bestimmten Längenbereichs, der nach gelelektrophoretischer Auftrennung präparativ aus dem Agarose-Gel extrahiert werden konnte, in einen ebenfalls restringierten und aufgereinigten Vektor ligiert. Mittels einer Elektrotransformation wurden die rekombinierten Vektoren dann in kompetente Wirtszellen eingebracht und anschließend selektiv vermehrt.

Im nächsten großen Block von Arbeitsschritten galt es, die mikrosatelliten-positiven Klone der angelegten subgenomischen Kohlmeisen-Genbank zu identifizieren (s. 2.2.2.2). Hierzu wurden die Klone mit Hilfe eines Laborroboters auf immobilisierende Membranen übertragen und nach Denaturierung und Fixierung mit verschiedenen radioaktiv markierten Oligonukleotidsonden hybridisiert. Eine anschließende Autoradiographie erlaubte dann letztendlich die Identifizierung der mikrosatelliten-positiven Klone.

Zur Ermittlung der exakten Mikrosatellitenstrukturen wurden die mikrosatelliten-positiven Klone sequenziert (s. 2.2.2.3). Zunächst mußten hierzu die Bakterienkolonien der betreffenden Klone angezogen und die Plasmid-DNA isoliert und quantifiziert werden. Anschließend erfolgte die Sequenzierung der klonierten DNA-Fragmente.

Zur endgültigen Charakterisierung der Mikrosatellitensysteme wurden dann die entsprechenden DNA-Bereiche amplifiziert (2.2.2.4). Voraussetzung hierfür war die Konstruktion locus-spezifischer Primer. Sie erfolgte auf Basis der durch die vorangegangene Sequenzierung bekannten Basenabfolge der die repetitiven DNA-Bereiche flankierenden Sequenzen. Während der Etablierungsphase wurden im allgemeinen radioaktiv markierte Amplifikate verwendet, die mittels Autoradiographie dargestellt werden konnten. Die routinemäßige Anwendung der etablierten Systeme erfolgte dann durch die Analyse fluoreszenzmarkierter Amplifikate in einem Sequenzierautomaten (ABI 377, *Applied Biosystems*).

2.2.2.1 Klonierung der Kohlmeisen-DNA

Zur Klonierung der chromosomalen Kohlmeisen DNA wurde ein Klonierungs-Kit der Firma *Invitrogen* verwendet (Zero BackgroundTM/Kan Cloning Kit, Version A), der sich durch eine Besonderheit auszeichnet. Der enthaltene Vektor (pZErOTM-2.1) besitzt näm-

lich ein lethales *ccd*-Gen, das erst nach erfolgreicher Rekombination des Vektors irreversibel zerstört wird. Werden die im Kit mitgelieferten Wirtszellen (*E. coli* TOP10F') nach Transformation des Vektors auf einem IPTG-haltigen Nährmedium angezogen, so wird durch Aktivierung des *ccd*-Gens der Zelltod aller Wirtszellen hervorgerufen, in deren Vektor kein Kohlmeisen DNA-Fragment eingefügt wurde. Somit erfolgt die Selektion positiver Rekombinanten automatisch nach erfolgreicher Transformation. Der Stamm der verwendeten *E. coli* Wirtszellen besitzt außerdem eine Kanamycin-Resistenz, so daß bei einer Anzucht der Zellen auf kanamycinhaltigem Nährmedium das exklusive Wachstum allein dieser Zellen gewährleistet werden kann.

Im verwendeten Klonierungs-Kit sind ausführliche Protokolle zur Herstellung der benötigten Nährmedien (LB, Low Salt LB usw.), der Ligations- und Transformationsansätze sowie Anleitungen zur Durchführung aller erforderlichen Abläufe enthalten. Aus diesem Grund werden im folgenden ausschließlich solche Protokolle wiedergegeben, die von denjenigen im Handbuch des Klonierungsvektors abweichen (die betreffende Quelle ist im Literaturverzeichnis unter „Invitrogen Corp.“ aufgeführt und wird nachfolgend ebenso zitiert) bzw. dort nicht aufgeführt sind.

2.2.2.1.1 Restriktionsabbau

Für die Ligation (s. 2.2.2.1.3) der Kohlmeisen DNA in den Vektor müssen beide Komponenten mit Restriktionsendonukleasen verdaut werden. Durch den Einsatz verschiedener Restriktionsenzyme wurden dabei sowohl Ansätze mit sogenannten „klebrigen“ Enden (= *sticky ends*) als auch solche mit „stumpfen“ Enden (= *blind ends*) verwendet. Die Ligation von *Sau* 3A restringierter Kohlmeisen DNA (Schnittstelle: ?GATC) erfolgte dabei in den mit *Bam* HI behandelten Vektor (Schnittstelle: G?GATC), während die mit *Hae* III erzeugten Fragmente (Schnittstelle: GG?CC) in den *Eco* RV restringierten Vektor ligiert wurden (Schnittstelle: GAT?ATC).

Restriktion der chromosomalen DNA

Die Ansätze zur Restriktion der Kohlmeisen DNA setzten sich bei einem Gesamtvolumen von 100 µl wie folgt zusammen: 10 µg chromosomale Kohlmeisen DNA (die Abschätzung der benötigten Menge in µl erfolgte durch Testgele, s. 2.2.1.3), 10 µl *Sau* 3A bzw. *Hae* III (bei einer Ausgangskonzentration beider Enzyme von 10 U/µl entspricht dies 100 U) und 10 µl des vom Enzymhersteller mitgelieferten 10x Restriktionspuffers. In den *Sau* 3A Restriktionsansatz wurde zusätzlich 1 µl BSA gegeben. Alle Ansätze wurden dann mit A. bi. dest. auf das Gesamtvolumen von 100 µl eingestellt, invertiert, anzentrifugiert und für 1 h bei 37° C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte – ohne weitere Aufreinigungsschritte – die Isolation der 200-1000 bp langen Fragmente (s. 2.2.2.1.2).

Restriktion der Vektor-DNA

Der Restriktionsansatz für den Vektor bestand bei einem Gesamtvolumen von 50 µl aus 1 µg Vektor-DNA (pZErOTM-2.1, Ausgangskonzentration 1 µg/µl), 2 µl *Eco* RV bzw. 1 µl *Bam* HI (entspricht jeweils 20 U bei einer Ausgangskonzentration von 10 U/µl für *Eco* RV bzw. 20 U/µl für *Bam* HI) und 5 µl des vom Enzymhersteller mitgelieferten 10x Restriktionspuffers. Beide Ansätze wurden wieder mit A. bidest. auf das Gesamtvolumen von 50 µl eingestellt, invertiert, anzenrifugiert und ebenfalls für 1 h bei 37° C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die vor der Ligation notwendige Aufreinigung des Vektors.

Aufreinigung der Vektor-DNA

Zunächst wurden zur restringierten und damit linearisierten Vektor-DNA je 25 µl Phenol und Chloroform gegeben und der gesamte Ansatz durch kräftiges Schütteln durchmischt. Dann wurde der Gesamtansatz auf ein spezielles Gel-Röhrchen (SST[®]-Vacutainer[®]) aufgetragen und 10 min bei 2000 rpm und 4° C zentrifugiert. Zum Überstand wurden 50 µl Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) gegeben und der gesamte Ansatz nach starkem Schütteln erneut für 10 min bei 2000 rpm und 4° C zentrifugiert. Nach Überführung des Überstands (50 µl) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. 100% Ethanol zugegeben und der Ansatz für 15 min bei -70° C inkubiert. Der Abbruch der Inkubation erfolgte durch einen Zentrifugationsschritt (15 min, 13000 rpm, 4° C). Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4° C), wieder vom Überstand getrennt und dann in einer Vakuumzentrifuge getrocknet (SpeedVac, *Savant*). Die Aufnahme des Pellets erfolgte anschließend in 10 µl A. bidest. und die Überprüfung der DNA-Konzentration in einem 0,8% Agarose-Gel (s. 2.2.1.3). Damit war der Vektor für die Ligation vorbereitet (s. 2.2.2.1.3).

2.2.2.1.2 Extraktion der DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen

Die subgenomische Genbank sollte 200 bis 1000 bp lange DNA-Fragmente enthalten, da sich längere Fragmente schlecht sequenzieren lassen (s. 2.2.2.3) und für kürzere Fragmente nur sehr schwer Primer konstruiert werden können (s. 2.2.2.4). Daher wurden die Restriktionsansätze der chromosomalen DNA (s. 2.2.2.1.1) in einem 1,5% Agarose-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (s. 2.2.1.3). Über einen auf einer separaten Spur mitgeführten Längenstandard (Kombination aus λ /*Hind* III und *puc* 19/*Msp* I) ließen sich die Fragmentlängenbereiche anhand der Markerbanden bestimmen. Agarosestücke, die Fragmente im gewünschten Längenbereich enthielten, wurden mit einem sauberen Skalpell unter UV-Licht (302 nm) herausgeschnitten, gewogen und getrennt für die jeweiligen Restriktionsansätze in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Für jeden Restriktionsansatz wurden dabei zusätzlich kleine (200-500 bp) und große (500-1000 bp) Fragmente getrennt extrahiert. Die weitere Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte dann mit Hilfe eines Extraktions-Kits der Firma *Qiagen* (QIAquick Gel Extraction Kit) nach den Angaben des Herstel-

lers und unter Verwendung der mitgelieferten Chemikalien. Als Resultat lagen die betreffenden DNA-Fragmente jeweils gelöst in 50 µl A. bidest. vor. Zur Erhöhung der Konzentration, deren Abschätzung anschließend wieder anhand von Testgelen erfolgte (s. 2.2.1.3), wurden die Volumina der Ansätze zunächst noch mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac, *Savant*) reduziert.

2.2.2.1.3 Ligation der DNA-Fragmente

Bei der Ligation werden DNA-Fragmente durch das Enzym T4-DNA-Ligase über ihre 5'-P und 3'-OH Gruppe miteinander verknüpft. Dabei verbindet das Enzym sowohl sogenannte „stumpfe“ als auch „klebrige“ Enden miteinander. Die Höhe der Rekombinationsrate hängt dabei vom molaren Verhältnis zwischen Insert- und Vektor-DNA ab.

Da das optimale molare Verhältnis von Insert- zu Vektor-DNA unbekannt war, wurden parallel zwei verschiedene Ansätze verwendet. In der einen Linie von Ligationsansätzen betrug das Verhältnis von Insert- und Vektor-DNA 1:1, in der anderen Linie 2:1. Da zudem für jede Kombination der Restriktionsenzyme (*Eco* RV und *Hae* III bzw. *Bam* HI und *Sau* 3A, s. 2.2.2.1.1) Kohlmeisen DNA-Fragmente zweier unterschiedlicher Größenklassen ligiert wurden (200-500 bp bzw. 500-1000 bp, s. 2.2.2.1.2), ergaben sich insgesamt acht verschiedene Ligationsansätze. Sie setzten sich bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl wie folgt zusammen: 25 ng aufbereitete Vektor-DNA (pZErOTM-2.1; s. 2.2.2.1.1), 25 bzw. 50 ng chromosomale Kohlmeisen DNA-Fragmente der jeweiligen Größenklasse (Menge abhängig vom Insert-Vektor Verhältnis, s.o.), 1 µl ATP, 100 bzw. 200 U T4-DNA-Ligase (für die Ligation der „klebrigen“ bzw. „stumpfen“ Enden, s. 2.2.2.1.1) und 1 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10x Ligationspuffers. Die Ansätze wurden mit A. bidest. auf das Gesamtvolumen von 10 µl eingestellt und vor der anschließenden Elektrotransformation (s. 2.2.2.1.4) 90 min bei 16° C inkubiert.

2.2.2.1.4 Elektrotransformation

Alle Ligationsansätze (s. 2.2.2.1.3) wurden zunächst dialysiert, um den Salzgehalt der Proben für die anschließende Elektrotransformation zu verringern. Hierzu wurde ein rundes Filterpapier (Porengröße 0,025 µm, *Millipore*) vorsichtig auf die Wasseroberfläche einer mit A. bidest. gefüllten Petrischale gelegt und der gesamte Ligationsansatz auf das Filterpapier pipettiert. Nach 15 min wurde der Tropfen dann in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die für die Transformation benötigten kompetenten Wirtszellen waren im Klonierungs-Kit enthalten (*E. coli* TOP10F') und wurden nach Anleitung des Herstellers vorbereitet (s. Invitrogen Corp.) und bis zur weiteren Verwendung bei -70° C gelagert.

Für die eigentliche Elektrotransformation wurden 4,5 µl des dialysierten Ligationsansatzes zusammen mit 40 µl der bei Raumtemperatur auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen in

eine vorgekühlte 0,2 cm Elektroperforationsküvette pipettiert und der Transformationsvorgang unmittelbar in Gang gesetzt (Gene Pulser, *BioRad*; Puls für 4-5 msec bei 1,7 KV/cm; weitere Geräteeinstellungen: Gene Pulser = 25 μ F, Puls Controller = 200 O, Capacity extender = 125 μ F). Anschließend wurde zu jedem Transformationsansatz unverzüglich 1 ml SOC-Medium gegeben (zur Herstellung s. Invitrogen Corp.) und die gesamte Lösung nach vorsichtigem Durchmischen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und unter Schütteln (220 rpm) für eine Stunde bei 37° C inkubiert.

2.2.2.1.5 Anzucht der Bakterien

Zur Überprüfung der Transformation (s. 2.2.2.1.4) bzw. der Ligation (s. 2.2.2.1.3) und zur späteren Identifizierung von DNA-Mikrosatelliten (s. 2.2.2.2) wurde ein Teil der bereits in SOC-Medium angewachsenen Zellen (s.o.) auf LB-Agarplatten ausplattiert und angezogen (die verbleibenden transformierten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4° C gelagert). Im nächsten Schritt wurden die Kolonien der transformierten Bakterienzellen auf Mikrotiterplatten vereinzelt, die zuvor mit Low Salt LB-Medium (s. Invitrogen Corp.) bestückt worden waren.

Anzucht der Bakterienkolonien auf Festmedien

Bei der Ausplattierung der Bakterienzellen wurde eine Dichte von maximal 500 Kolonien pro LB-Agarplatte (\varnothing 15 cm) angestrebt, da die einzelnen Kolonien ansonsten für eine eindeutige Identifizierung zu dicht beieinander gelegen hätten. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde zunächst nur ein Teil der Zellen auf kleineren LB-Agarplatten (\varnothing 9 cm) ausplattiert und angezogen.

Zur Herstellung von Agarplatten beider Größen wurde als erstes LB-Agar angesetzt (s. Invitrogen Corp.), die Lösung dann mit IPTG (1 mM) und Kanamycin (40 μ g/ml) versehen und unmittelbar vor dem Ausplattieren der Bakterienzellen in große (\varnothing 15 cm) und kleine (\varnothing 9 cm) Petrischalen gefüllt. Die transformierten Bakterien wurden dann unter der Sterilbank mit einer ausgeglühten Impföse unter ständigem Drehen der Agarplatte ausgebracht. Für die Probe-Anzuchten auf den kleinen Agarplatten wurden je 50 μ l der in SOC-Medium (s. Invitrogen Corp.) angezogenen transformierten Zellen verwendet (s.a. 2.2.2.1.4), für die großen Agarplatten – nach Kontrolle und Korrektur der Konzentration anhand der Probe-Anzuchten – das dreifache Volumen. Nach dem Ausplattieren trockneten die Agarplatten für mindestens 5 min. Die anschließende Inkubationszeit bei 37° C im Wärmeschrank betrug für die kleinen Agarplatten 16 h, für die großen Platten 22 h.

Anzucht isolierter Klone in Flüssigmedien

Zur späteren Isolation der Mikrosatelliten wurden die auf den Agarplatten gewachsenen Kolonien unter sterilen Arbeitsbedingungen mit Hilfe einer Pipettenspitze einzeln in Mikrotiterplatten überführt. Zuvor wurden die Mikrotiterplatten mit 170 μ l Low Salt-LB-Medium bestückt (zur Herstellung s. Invitrogen Corp.). Nach Impfung der Nährmedien mit

vereinzelt Bakterienkolonien wurden die Mikrotiterplatten unter Schütteln (120 rpm) für 15 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jedes Feld der Mikrotiterplatten mit 30 µl 99% Glycerol überschichtet und die Platten bis zur weiteren Verwendung (s. 2.2.2.2) bei -70° C gelagert.

2.2.2.2 Identifizierung von klonierten DNA-Mikrosatelliten

Die Kolonien wurden nach dem Vereinzeln (s. 2.2.2.1.5) maschinell auf Nylonmembranen transferiert (s. 2.2.2.2.1), um so die Klone identifizieren zu können, deren rekombinante Plasmide repetitive DNA-Bereiche enthielten. Die eigentliche Identifizierung erfolgte dann nach Denaturierung und Fixierung der Bakterien-DNA auf den Membranen (s. 2.2.2.2.2) durch Hybridisierung mit radioaktiven Di-, Tri- oder Tetranukleotid-Polymersonden und anschließender Autoradiographie (s. 2.2.2.2.3 und vgl. Rassmann *et al.* 1991).

2.2.2.2.1 Übertragung der Bakterienkolonien auf Nylonmembranen

Für die zum Nachweis der DNA-Mikrosatelliten notwendige Hybridisierung (s. 2.2.2.2.3) mußten die rekombinanten Bakterien aus den Mikrotiterplatten (s. 2.2.2.1.5) zunächst auf Nylonmembranen übertragen werden. Hierzu wurde erneut LB-Agar mit Kanamycin hergestellt (40 µg/µl, s. Invitrogen Corp.) und in Formen gegossen, welche den Mikrotiterplatten entsprachen. Ebenfalls passend wurde eine Nylonmembran (HybondTM-N, Nylon 0,45 Micron, Amersham Life Science) zugeschnitten und vorsichtig auf das erkaltete Nährmedium gelegt. Anschließend wurden die rekombinanten Bakterien aus den Mikrotiterplatten entsprechend ihrer ursprünglichen Position punktgenau auf die Nylonmembran übertragen. Da hierfür ein Laborroboter (Biomek 1000, Beckman) zur Verfügung stand, wurde lediglich ein sehr feiner Punkt der Bakterienkultur auf die Membran gestempelt. Dies ermöglichte – nach einer jeweils geringfügiger Neupositionierung der Membran (Verschiebung um wenige Millimeter) – die Übertragung der Bakterienkulturen von bis zu neun Mikrotiterplatten auf eine einzige Membran von etwa 8 x 14 cm. Dabei wurden vor jedem Stempeln der Kulturen auf die Membran die Edelstahlspitzen des Laborroboters nacheinander in eine Na-Hypochloridlösung (12-14%), in A. bidest. und in Ethanol (95%) getaucht, um so Kreuz-Kontaminationen der Kulturen in den Mikrotiterplatten auszuschließen und später eine eindeutige Zuordnung der gestempelten Klone zu gewährleisten (s. 2.2.2.2.3). Die angeimpften Nylonmembranen wurden dann nach dem Transferieren für 22 h bei 37° C inkubiert.

2.2.2.2.2 Denaturierung und Fixierung der DNA auf Nylonmembranen

Zur Vorbereitung der Hybridisierung (s. 2.2.2.2.3) mußte die doppelsträngige Bakterien-DNA zunächst denaturiert und anschließend in diesem Zustand auf der Nylonmembran

fixiert werden. In einer Schale mit 5x SSC-Lösung wurde hierzu bei 50° C SDS gelöst (Konzentration: 2% w/v). Nach dem Abheben des Membranfilters vom Nährmedium (s. 2.2.2.2.1) wurde selbiger mit der DNA-Seite nach oben auf ein Filterpapier (GB 002, *Schleicher & Schüll*) gelegt, welches zuvor in der SDS/SSC-Lösung getränkt worden war. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Nylonmembran zum Trocknen auf ein neues Filterpapier gelegt und anschließend – nach erneutem Wechsel des Filterpapiers – in einer handelsüblichen Mikrowelle erhitzt (AEG Mikromat; 1000 W, 15 min bei Stufe 8). Die Fixierung der denaturierten DNA auf der Nylonmembran erfolgte dann durch Bestrahlung mit UV-Licht (70000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ für 12 s; Ultraviolet Crosslinker, *Amersham Life Science*). Damit waren die Vorbereitungen für die Hybridisierung (s. 2.2.2.2.3) abgeschlossen.

2.2.2.2.3 Radioaktive Markierung der Sonden, Hybridisierung und Autoradiographie

Die Kinasierung der Oligonukleotide mit ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP zur radioaktiven Markierung erfolgte nach dem unter 2.2.1.6 beschriebenen Protokoll. Insgesamt wurden dabei 14 Oligonukleotidsonden radioaktiv markiert und in aufeinanderfolgenden Hybridisierungen eingesetzt. Es handelte sich im einzelnen um $(\text{CA})_8$, $(\text{TC})_8$, $(\text{GC})_8$, $(\text{AT})_{12}$, $(\text{TCC})_5$, $(\text{AAC})_5$, $(\text{TAA})_5\text{TA}$, $(\text{TAC})_5$, $(\text{GAA})_6$, $(\text{TCG})_5$, $(\text{CAC})_5$, $(\text{GGAT})_4$, $(\text{GATA})_4$ und $(\text{GACA})_4$.

Auch die nachfolgenden Arbeitsschritte für die Hybridisierung der Nylonmembranen wurden schon an anderer Stelle in Zusammenhang mit der Hybridisierung von Agarose-Gelen dargestellt (s. 2.2.1.7). Es mußten diesbezüglich lediglich die Hybridisierungs- und Waschetemperaturen an die jeweilige Oligonukleotidsonde angepaßt werden (s. 2.2.1.7).

Die Stellen, an denen sich die Oligonukleotidsonden bei der Hybridisierung angelagert hatten, wurden dann wieder mit Hilfe von Röntgenfilmen sichtbar gemacht (Autoradiographie, s. 2.2.1.8). Durch einen Vergleich der geschwärzten Stellen des Röntgenfilmes mit einer Folie, auf der das nach Transferieren der Klone resultierende Muster abgebildet war, konnten dann letztendlich die mikrosatelliten-positiven Klone eindeutig identifiziert werden.

2.2.2.3 Sequenzierung der klonierten DNA-Mikrosatelliten

Im nächsten Schritt wurden die mikrosatelliten-positiven Klone sequenziert. Dazu mußten zunächst die entsprechenden Bakterien aus den Glycerolstocks angezogen und die Plasmid-DNA isoliert werden (2.2.2.3.1). Im Anschluß erfolgte nach einer Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA dann die eigentliche Sequenzierung (s. 2.2.2.3.2).

2.2.2.3.1 Anzucht der Klone und Isolation der Plasmid-DNA

Zur Anzucht der mikrosatelliten-positiven Klone wurden jeweils 5 μl der in den Mikrotiterplatten vereinzelt Bakterienkulturen (s. 2.2.2.1.5) zu 10 ml kanamycinhaltigem LB-

Agar (40 µg/ml, s. Invitrogen Corp.) in ein Falcon®-Tube gegeben und unter ständigem Schütteln (200 rpm) für 17 h bei 37° C inkubiert. Danach wurde die Kultur herunterzentrifugiert (15 min, 200 rpm, 4° C), das Pellet nach Verwerfen des Überstandes in 400 µl Präparationspuffers A resuspendiert und der Ansatz nach Überführung in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur für weitere 5 min gelöst. Nach Zugabe von 400 µl Präparationspuffer B wurde die Lösung durch Invertieren vorsichtig gemischt und abermals für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 400 µl Präparationspuffer C hinzugefügt. Der Ansatz wurde wieder vorsichtig gemischt und für 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand – ohne den auf der Oberfläche der Lösung befindlichen Schaum mitzupipettieren – in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 640 µl 100% Isopropanol gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 15 min mit 15000 rpm bei 4° C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nachfolgend in 300 µl des zehnfach verdünnten Präparationspuffers C aufgenommen, der Ansatz stark geschüttelt und abermals für 30-60 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (15 min, 15000 rpm, 4° C) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 750 µl 100% Ethanol (4° C) gemischt und für 15 min bei -70° C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (15000 rpm, 15 min) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 200 µl 70% Ethanol (4° C) gewaschen und abermals für 10 min zentrifugiert (15000 rpm). Schließlich wurde der Alkohol entfernt, das Pellet getrocknet und anschließend für die weitere Verarbeitung in 20 µl A. bidest. aufgenommen.

2.2.2.3.2 Quantifizierung und Sequenzierung der Plasmid-DNA

Da für die Sequenzier-Reaktion die eingesetzte DNA-Menge von besonderer Bedeutung ist und die DNA-Quantität nach der Plasmid-DNA Isolation (s. 2.2.2.3.1) präparationsabhängig schwankt, erfolgte zunächst eine Konzentrationsbestimmung für die Plasmid-DNA. Anschließend wurde die Sequenzier-Reaktion mit Hilfe von *AmpliTaq*® DNA-Polymerase (*Perkin-Elmer*) in einem Thermocycler (*TrioBlock*, *Biometra*) nach Angaben des Herstellers und unter Verwendung der mitgelieferten Chemikalien durchgeführt. Nach einer Aufreinigung der Fragmente (ebenfalls nach Angaben von *Perkin-Elmer*) erfolgte dann die Auftrennung der mit fluoreszierenden Farbstoffen markierten DNA-Fragmente über ein denaturierendes 7% Polyacrylamid-Gel (Herstellung nach Angaben von *Applied Biosystems*) in einem Sequenzierautomaten (*ABI 373*, *Applied Biosystems*).

Quantifizierung der Plasmid-DNA

Auf Testgelen (s. 2.2.1.3) wurde die Signalintensität der Plasmid-DNA (s. 2.2.2.3.1) mit der von Standards bekannter Konzentration verglichen. Anhand der Resultate wurde die Plasmid-DNA dann auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und bis zum Ansatz der Sequenzier-Reaktion (s.u.) bei 4° C gelagert.

Ansatz der Sequenzier-Reaktion

Als Primer wurde jeweils einer der beiden Standard-Sequenzierprimer *M13* bzw. *M13(-20)* eingesetzt, deren komplementäre Sequenzen vor bzw. hinter der Klonierungsstelle des Vektors liegen. Auf diese Weise konnten alle klonierten DNA-Fragmente jeweils von beiden Seiten sequenziert werden. Durch Alinierung der ermittelten DNA-Sequenzen (s.u.) wurde anschließend die komplette Sequenz des Kohlmeisen DNA-Inserts bestimmt.

Die Sequenzier-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen: 1-1,5 µg DNA, 5 pmol Primer und 8 µl des mitgelieferten Reaktionsmixes (*Perkin-Elmer*), der auch die *AmpliTaq*[®] DNA-Polymerase enthält. Die Komponenten wurden auf Eis in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, mit A. bidest. auf ein Gesamtvolumen von 10 µl eingestellt und zur Vermeidung von Verdunstung mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Anschließend wurde der gesamte Ansatz sofort in einem Thermocycler (*TrioBlock*, *Biometra*) folgendem Temperaturregime ausgesetzt: Anfängliche Vordenaturierung von 3 min bei 95° C und nachfolgend 25 identische Zyklen, jeweils bestehend aus 30 s bei 95° C, 45 s bei 40° C und 4 min bei 60° C. Danach wurden die Proben bei 4° C gelagert.

Fällung der Sequenzier-Produkte

Zur Aufreinigung der Sequenzier-Produkte wurde der gesamte Ansatz nach Angaben des Herstellers von *AmpliTaq*[®] DNA-Polymerase (*Perkin-Elmer*) mit Ethanol gefällt. Die Reaktionsansätze wurden hierzu jeweils – ohne das Öl mitzupipettieren – in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß mit 2 µl Na-Acetat (3 M, pH 4,6) und 50 µl 95% Ethanol überführt, stark geschüttelt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (15-30 min, 13000 rpm) wurde der Überstand vollständig entfernt, das Pellet mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und kurz anzentrifugiert. Dann wurde der überstehende Alkohol vorsichtig abgesaugt und auch von Rand und Deckel des Reaktionsgefäßes sorgfältig entfernt. Nach vollständigem Trocknen wurde das Pellet bis zur weiteren Verwendung (s.u.) bei -20° C aufbewahrt.

Analyse der Sequenzier-Produkte

Da es sich um fluoreszenzmarkierte Sequenzier-Produkte handelte, konnte die Auftrennung über ein denaturierendes 7% Polyacrylamid-Gel in einem Sequenzierautomaten (*ABI 373*, *Applied Biosystems*) erfolgen.

Für den Gelmix wurden in einem Becherglas unter Rühren 30 g Harnstoff in 10,5 ml 40% Acrylamid-Lösung, 6 ml 10x TBE-Puffer und 22 ml A. bidest. gelöst. Nach Vakuumfiltration der Lösung durch einen 0,2 µm Filter (*Millipore*) und Entgasung wurde die Polymerisations-Reaktion durch Zugabe von 180 µl 10% APS und 24 µl TEMED gestartet. Der Gelmix wurde zwischen zwei waagrecht liegende Glasplatten gegossen, die durch die Verwendung zweier Abstandhalter (*spacer*) einen Hohlraum von 0,2 mm Dicke umschlossen. Die Oberflächen der Glasplatten waren zuvor gründlich mit einem Detergenz (*Alconox*, *Sigma-Aldrich*), A. bidest. und 100% Isopropanol gewaschen und anschließend getrocknet worden.

Zur Gelelektrophorese wurde das Polyacrylamid-Gel senkrecht in den Sequenzierautomaten eingebaut. Die getrockneten Pellets der Sequenzier-Produkte wurden jeweils in 2,5 µl mitgeliefertem Formamid/EDTA-Gemisch aufgenommen. Nach Denaturierung der Proben (3 min bei 80° C) erfolgte die Auftrennung von 1-2 µl denaturiertem Proben-Gemisch bei 1700 W für 14 h.

Weitere Details zu allen erforderlichen Arbeitsschritten sind ausführlich im Handbuch des Sequenzierautomaten ABI 373 (*Applied Biosystems*) wiedergegeben. Sie wurden exakt eingehalten und werden daher an dieser Stelle nicht weiter beschrieben. Zur Auswertung der Gele wurde das Computerprogramm Sequence Navigator (ebenfalls *Applied Biosystems*) benutzt, wodurch letztendlich die Sequenzen der klonierten Kohlmeisen DNA-Fragmente ermittelt werden konnten.

2.2.2.4 Amplifikation und Analyse der DNA-Mikrosatelliten aus chromosomaler DNA

Anhand der ermittelten Sequenzen wurden Primer zu den die DNA-Mikrosatelliten flankierenden Bereichen (s. 2.2.2.3.2) konstruiert (s. 2.2.2.4.1), um so die einzelnen Systeme auf das Vorhandensein von Längenpolymorphismen zu untersuchen. Während der Etablierungsphase der Systeme (s. 2.2.2.4.2) wurden hierzu radioaktive PCR-Ansätze verwendet. Entsprechend erfolgte die Auswertung nach Auftrennung der Amplifikate auf einem Polyacrylamid-Gel über Autoradiographien. Für Mikrosatellitensysteme, die über die Etablierungsphase hinaus Anwendung fanden (s. 2.2.2.4.3), wurde das 5'-Ende eines der beiden Primer durch Anhängen eines fluoreszierenden Farbstoffes modifiziert (Fluoreszenz-Amidite, *Applied Biosystems*). Die Analyse erfolgte in diesen Fällen wieder in einem Sequenzierautomaten (ABI 377, *Applied Biosystems*) unter Verwendung geeigneter Software (GeneScan, *Applied Biosystems*).

2.2.2.4.1 Konstruktion der Primer

Die Konstruktion von Primerpaaren zur Etablierung der Mikrosatellitensysteme erfolgte ohne den Einsatz spezieller Software. Die Primer wurden so gewählt, daß sie in den flankierenden Bereichen der DNA-Mikrosatelliten lagen, die keinen erkennbaren repetitiven Charakter aufwiesen. Insgesamt wurde dabei versucht, die im folgenden beschriebenen Regeln einzuhalten: Die Amplifikate sollten eine Länge von 500 bp nicht überschreiten und die Primer sollten eine Länge von etwa 18-23 bp haben. Die Primer-Anlagerungstemperatur (abgeschätzt nach der Formel in 2.2.1.7) sollte möglichst hoch liegen und für beide Primer eines Systems identisch sein. Die verwendeten Primer sollten an ihren 3'-Enden eine starke Bindung zur Vorlagen-DNA aufweisen (hoher G/C-Gehalt) und die Bildung von Primer-Dimeren (Verkettung der Primer ohne Vorlagen-DNA allein aufgrund der spezifischen Primersequenz) sollte vermieden werden.

2.2.2.4.2 Etablierung der Mikrosatellitensysteme

Während der Etablierungsphase wurde getestet, ob die einzelnen Systeme reproduzierbare und interpretierbare Amplifikationsprodukte liefern, ob die Allele nach den Mendel'schen Regeln vererbt werden und ob die Variabilität der Systeme in einem für die angestrebten Untersuchungen geeigneten Rahmen liegt. Zur Amplifikation wurden dabei unmodifizierte Primer benutzt. Die Darstellung der Allele nach Separation auf einem Polyacrylamid-Gel erfolgte durch die Verwendung radioaktiver Nukleotide, die während der Amplifikation in die Fragmente eingebaut und anschließend mittels Autoradiographie nachgewiesen wurden.

PCR-Ansätze

Die standardisierten PCR-Ansätze zur Amplifikation radioaktiver Fragmente setzten sich aus 50-100 ng Kohlmeisen DNA, 10 pmol jedes Primers (z.B. *Applied Biosystems*), 2,5 mM MgCl₂, 200 µmol dNTP-Mix, 0,1 µl radioaktives Nukleotid ([α³²P]-CTP), 0,5 U *Taq* DNA-Polymerase (*Gene Craft*) und 1 µl des mitgelieferten 10x Reaktionspuffer (ohne MgCl₂) zusammen. Sie wurden mit A. bidest. auf ein Gesamtvolumen von 10 µl eingestellt und zur Vermeidung von Verdunstung während der PCR mit 20 µl Mineralöl überschichtet. Das in den Ansätzen enthaltene MgCl₂ wurde bei Bedarf zwischen 1,5 und 5 mM variiert. Kam es bei der Amplifikation zu starken Nebenprodukten, welche sich nicht durch ein verändertes Temperaturprofil verringern ließen, so wurden dem PCR-Ansatz außerdem 2% (v/v) Formamid oder 1-5% (v/v) DMSO zugegeben.

Temperaturprofil

Im allgemeinen wurden die PCR-Ansätze folgendem Temperaturregime ausgesetzt (Thermocycler: *Biometra* oder *Perkin-Elmer*): Nach einer Vordenaturierungsphase (95° C für 5 min) folgten insgesamt 27 Zyklen. Jeder Zyklus bestand aus drei verschiedenen Temperaturschritten: Denaturierung (1 min bzw. 30 s bei 95° C), Primeranlagerung (immer 1 min bei variabler und primerabhängiger Temperatur) und Kettenverlängerung (immer 1 min bei 72° C). Abhängig von der Denaturierungsdauer und der Temperatur bei der Primeranlagerung unterschieden sich die ersten beiden Zyklen jeweils von allen weiteren. Im ersten Zyklus lag die Temperatur bei der Primeranlagerung um 1° C über der für beide Primer errechneten Schmelztemperatur (s.a. 2.2.1.7), im zweiten Zyklus um 2° C und in allen folgenden Zyklen um 5° C darunter. Der Denaturierungsschritt dauerte in den ersten beiden Zyklen 1 min und wurde in allen weiteren Zyklen auf 30 s reduziert. Dem letzten Zyklus wurde außerdem noch eine zusätzliche Kettenverlängerungsphase von 5 min bei 72° C angehängt. Nach Beendigung der PCR wurden die Amplifikate bis zur Auftrennung zunächst bei 4° C und anschließend bei -20° C gelagert.

Analyse der radioaktiven PCR-Produkte

Vor dem Gellauf wurden jeweils 5 µl PCR-Produkt zusammen mit 5 µl Stop-Puffer in die Vertiefungen einer Terasaki-Platte gegeben. Das Gemisch wurde dann für 3 min bei 92° C

denaturiert und auf Eis gelagert. 1-3 µl der denaturierten Probe wurden später auf das Gel gegeben (s.u.).

Zur Auftrennung der Amplifikate in einem denaturierenden 4% Polyacrylamid-Gel (8 M Harnstoff) wurden zwei Glasplatten durch 0,4 mm dicke Abstandhalter getrennt, mit Bulldog-Klammern fixiert und ein vorbereiteter Gelmix (s.u.) in den entstandenen Hohlraum gegossen. Zuvor wurden die Glasplatten gründlich mit einem Detergenz (Alconox, *Sigma-Aldrich*) gereinigt, mit A. bidest. abgespült und die Innenseiten mit Aceton und 70% Ethanol abgerieben (eine der beiden Innenseiten zusätzlich auch noch mit Bindesilan, *Merck*).

Vor dem Gießen des Gels wurde der bereits angesetzte und bei -20° C gelagerte Gelmix (70 ml pro Gel aus 4% Polyacrylamid und 8 M Harnstoff) aufgetaut, unter ständigem Schwänken mit 140 µl 10% APS und 140 µl TEMED versehen und sofort weiterverwendet. Nach der vollständigen Polymerisation in waagerechter Position (1-2 h) wurde das Gel senkrecht in die Gelkammer eingebaut, 1x TBE-Puffer in die Pufferkammern gefüllt, die vorbereiteten Proben aufgetragen (s.o.) und die Elektrophorese gestartet (60 W, 1500 V, 3-4 h). Nach adäquater Auftrennungsdauer wurde der Gellauf abgebrochen und das Gel, wie schon für die „Fingerprint“-Gele ausführlich beschrieben (s. 2.2.1.4), auf Filterpapier übertragen und für etwa 1,5 h getrocknet. Die Darstellung der Banden erfolgte dann mittels Autoradiographie (s. 2.2.1.8).

2.2.2.4.3 Routinemäßige Anwendung und Auswertung

Da für die Anwendung etablierter Mikrosatellitensysteme am Institut für Evolutionsbiologie und Ökologie ein geeigneter Sequenzierautomat (ABI 377, *Applied Biosystems*) zur Verfügung stand, konnte bei der routinemäßigen Anwendung der Systeme auf ein radioaktives Nachweisverfahren verzichtet werden. Stattdessen wurden zur Markierung der Amplifikate Primer verwendet, deren 5'-Ende durch Fluoreszenz-Amidite modifiziert waren. Dabei wurden die während der Etablierung optimierten PCR-Bedingungen übernommen (s. 2.2.2.4.2). Zur Auftrennung der Amplifikate wurden – analog zur Beschreibung im vorangegangenen Kapitel – denaturierende 4,5% Polyacrylamid-Gele (6 M Harnstoff) verwendet. Da die gelelektrophoretische Auftrennung ebenso wie die softwaregestützte Auswertung mit GeneScan einen Teil der Analyse mit Hilfe des ABI 377 (*Applied Biosystems*) darstellen, wurden zur Herstellung von Lösungen bzw. zur Abfolge einzelner Arbeitsschritte alle Empfehlungen der mehrbändigen Betriebsanleitung des Herstellers befolgt. Auf eine Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte wird daher an dieser Stelle verzichtet.

Die Berechnung der erwarteten Heterozygotierate (H_{exp} , s. 3.4.1.3), die Auskunft über die Variabilität und damit die Informativität eines Mikrosatellitensystems gibt, erfolgte nach Stearns & Hoekstra (2000). Die betreffende Formel lautet:

$$H_{exp} = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

mit: p_i = Frequenz des i -ten Allels eines Mikrosatellitensystems
 n = Anzahl Allele eines Mikrosatellitensystems

2.3 Auswertung des Datenmaterials

Alle Daten wurden auf einem PC-Netzwerkssystem unter *Microsoft Windows 2000 SP1* verarbeitet. Sollte dies für bestimmte Arbeitsschritte nicht der Fall gewesen sein, wurde dies an entsprechender Stelle vermerkt. Die Arbeit wurde mit *Word 2000 Vers. 9.0 SR1* der Firma *Microsoft* geschrieben und formatiert, die Grafiken mittels *Excel 2000 Vers. 9.0 SR1* der Firma *Microsoft* erstellt.

Die Auswertung der Sequenzierungen wurde mit dem *Sequence Navigator (Applied Biosystems)* durchgeführt, die Analyse der Amplifikatlängen erfolgte mittels *GeneScan* (ebenfalls *Applied Biosystems*). Beide Programme wurden unter *Apple Macintosh* angewendet. Die für die Auswertung eines Teils der Multilocus DNA-Fingerprints notwendigen Bilddateien wurden mit Hilfe des Programms *Photoshop Vers. 6.0* der Firma *Adobe* generiert.

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mittels *SPSS 10.0* der Firma *SPSS Inc.*. Vor der Analyse wurden die einzelnen Datensätze mit Hilfe eines Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft. Wichen sie signifikant von einer Normalverteilung ab, so erfolgte die Auswertung mittels verteilungsfreier, nicht parametrischer Verfahren (z.B. Spearman Rangkorrelation, Mann-Whitney U-Test), andernfalls mittels parametrischer Verfahren (z. B. Pearson Produkt-Moment-Korrelation, Students t-Test). Bei allen Tests ist die Größe der jeweiligen Stichprobe angegeben. Alle angegebenen *p*-Werte beziehen sich auf eine zweiseitige Fragestellung.

3 Ergebnisse

3.1 Beprobung der Brutpopulation

3.1.1 Stichprobenumfang

Im Untersuchungsgebiet Bahrdorf (s. 2.1.2) fanden sich in den Jahren 1993 bis 1996 insgesamt 544 Brutansätze (zur Definition s. 2.1.3.3) von Kohlmeisen. Abhängig vom Legebeginn ließen sich dabei Erstbruten, Nachgelege und Zweitbruten unterscheiden (zur Definition s. 2.1.3.3). Der Beprobungsschwerpunkt lag in allen Versuchsjahren auf den Erstbruten. Nachgelege und Zweitbruten wurden vergleichsweise seltener beprobt (s. Tab. 1 und Abb. 1).

Natürlicherweise entwickelt sich nicht aus jedem Brutansatz ein Gelege mit flüggen Nestlingen. Oft werden Gelege aufgegeben, wie etwa nach Störung durch einen Prädator (z.B. Marder), oder die bereits geschlüpften Jungtiere sterben (z.B. durch Prädation, Erfrieren in kalten Nächten oder Verhungern während einer Schlechtwetterperiode) bevor sie flügge bzw. alt genug für die Blutprobenentnahme sind (s. 2.1.3.4). Daher stehen nicht alle Brutansätze einer Saison für eine molekulargenetische Analyse zur Verfügung, selbst wenn – wie für die Erstbruten von 1994 bis 1996 geschehen – die Beprobung der gesamten Population angestrebt wird.

Trotz aller genannten Gründe und einer nur stichprobenartigen Erfassung der Kohlmeisen-Erstbruten im Jahr 1993 (s. 3.1.2) konnten für insgesamt 276 Bruten mit 1997 Nestlingen Elternschaftsnachweise durchgeführt werden (s. Tab. 1 und Abb. 1). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die detaillierten Informationen zu den einzelnen Brutjahren in tabellarischer Form zusammengefaßt (s. Tab. 1).

3.1.2 Repräsentanz der Stichproben

Da nicht alle Brutansätze einer Beprobung zugänglich waren (s. 3.1.1), stellt sich zunächst die Frage, ob die untersuchten Bruten eine repräsentative Stichprobe der Gesamtpopulation darstellen. Daher wird im folgenden geprüft, inwieweit sich die beprobten Teilpopulationen hinsichtlich des Legebeginns von den entsprechenden Gesamtpopulationen unterscheiden. Außerdem werden die mittleren Gelegegrößen der beprobten Teilpopulationen mit denen der jeweiligen Gesamtpopulation verglichen. Die Auswertung erfolgt jeweils getrennt für Erstbruten, Nachgelege und Zweitbruten, da sich die Beprobungsintensität in diesen Gruppen unterschied (s. 3.1.1). Die Daten der Legebeginne sind in Abbildung 1 dargestellt, Mittelwerte und Standardabweichungen für die jeweiligen Gelegegrößen finden sich in Tabelle 1.

Tab. 1: Anzahl der Brutansätze, Anzahl analysierter Bruten (mit Prozentangabe in Relation zur Gesamtzahl der Brutansätze), Anzahl untersuchter Nestlinge und Informationen zur mittleren Gelegegröße getrennt nach Erstbruten, Nachgelegen und Zweitbruten für die Kohlmeisen-Population des Bahrdorfer Untersuchungsgebietes in den Jahren 1993 bis 1996.

Erstbruten	1993	1994	1995	1996	alle Jahre
Zeitraum von:	12.04.93	16.04.94	14.04.95	17.04.96	
bis:	03.05.93	03.05.94	30.04.95	05.05.96	
Brutansätze:	142	97	59	135	433
Gelegegröße ($\bar{x} \pm SD$):	8,2 ± 1,5	9,0 ± 1,7	9,3 ± 2,4	8,0 ± 2,3	
Analysierte Bruten:	37 (26,1%)	76 (78,4%)	42 (71,2%)	82 (60,7%)	237 (54,7%)
Gelegegröße ($\bar{x} \pm SD$):	8,3 ± 1,4	9,1 ± 1,3	9,6 ± 1,8	8,7 ± 1,6	
Analysierte Nestlinge:	277	535	376	574	1762

Nachgelege	1993	1994	1995	1996	alle Jahre
Zeitraum von:	05.05.93	06.05.94	02.05.95	08.05.96	
bis:	21.05.93	24.05.94	23.05.95	27.05.96	
Brutansätze:	15	10	12	19	56
Gelegegröße ($\bar{x} \pm SD$):	5,0 ± 3,3	5,5 ± 2,9	8,3 ± 2,3	6,5 ± 2,3	
Analysierte Bruten:	0	3 (30,0%)	4 (33,3%)	13 (68,4%)	20 (35,7%)
Gelegegröße ($\bar{x} \pm SD$):	-	6,3 ± 1,2	8,0 ± 3,4	6,9 ± 1,4	
Analysierte Nestlinge:	-	17	28	84	129

Zweitbruten	1993	1994	1995	1996	alle Jahre
Zeitraum von:	24.05.93	25.05.94	28.05.95	28.05.96	
bis:	14.06.93	08.06.94	19.06.95	28.06.96	
Brutansätze:	8	7	10	30	55
Gelegegröße ($\bar{x} \pm SD$):	4,5 ± 1,3	6,1 ± 1,5	6,7 ± 1,1	5,9 ± 1,6	
Analysierte Bruten:	0	4 (57,1%)	7 (70,0%)	8 (26,7%)	19 (34,6%)
Gelegegröße ($\bar{x} \pm SD$):	-	6,5 ± 0,6	7,0 ± 1,0	5,9 ± 0,9	
Analysierte Nestlinge:	-	22	39	45	106

gesamt	1993	1994	1995	1996	alle Jahre
Zeitraum von:	12.04.93	16.04.94	14.04.95	17.04.96	
bis:	14.06.93	08.06.94	19.06.95	28.06.96	
Brutansätze:	165	114	81	184	544
Analysierte Bruten:	37 (22,4%)	83 (72,8%)	53 (65,4%)	103 (56,0%)	276 (50,7%)
Analysierte Nestlinge:	277	574	443	703	1997

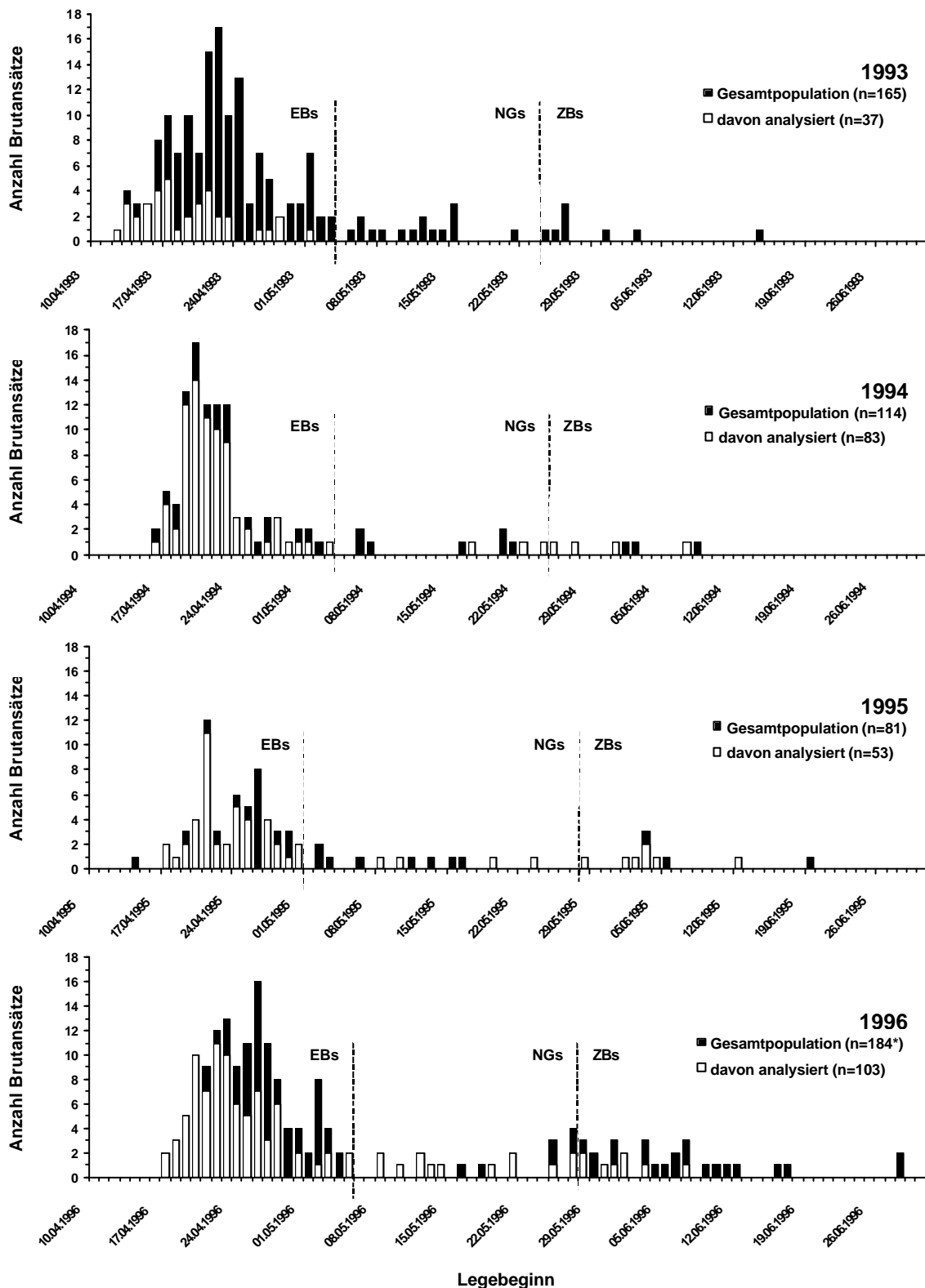


Abb. 1: Legebeginn aller Kohlmeisen-Brutansätze im Bahrdorfer Untersuchungsgebiet (schwarze Balken) und Legebeginn der davon analysierten Bruten (weiße Balken) in den Jahren 1993 bis 1996. Innerhalb jeder Brutsaison sind Erstbruten (EBs), Nachgelege (NGs) und Zweitbruten (ZBs) unterschieden (zur Definition s. 2.1.3.3).

* In der Brutsaison 1996 wurden insgesamt 184 Brutansätze registriert. Für eine der Zweitbruten konnte aufgrund fehlender Aufzeichnungen allerdings der Legebeginn nicht ermittelt werden. Daher gehen in die Abbildung für das Jahr 1996 nur 183 Brutansätze ein.

Brutsaison 1993

In der Brutsaison 1993 wurde zugunsten zusätzlicher Untersuchungen an Tannenmeisen (*Parus ater*), Blaumeisen (*P. caeruleus*), Kleibern (*Sitta europaea*) und Trauerschnäppern (*Ficedula hypoleuca*) im selben Untersuchungsgebiet (z.B. Brün 1999, Lubjuhn *et al.* 1999 b) nur ein Teil der Kohlmeisen-Erstbruten beprobt. Auf die Beprobung von Nachgelegen und Zweitbruten mußte aus diesem Grund vollständig verzichtet werden.

Die Koordination der Arbeiten an verschiedenen Vogelarten führte dazu, daß die Beprobung der Kohlmeisen-Erstbruten nicht gleichmäßig über die gesamte Brutsaison verteilt erfolgen konnte. Dies schlägt sich in einem signifikanten Unterschied hinsichtlich der Legebeginnverteilung von beprobter Teilpopulation und Gesamtpopulation nieder (KS-Test: $p = 0,019$). Bei den beprobten Kohlmeisenbruten handelte es sich vor allem um Gelege aus dem ersten Teil der Brutsaison (s. Abb. 1). Hinsichtlich der mittleren Gelegegröße ließ sich jedoch kein Unterschied zwischen der beprobten Teilpopulation und der Gesamtpopulation feststellen (U-Test: $p = 0,84$; vgl. Tab. 1).

Brutsaison 1994

In der Brutsaison 1994 wurden alle erfaßbaren Brutansätze beprobt und molekulargenetisch analysiert. Dementsprechend unterscheidet sich die Legebeginnverteilung der analysierten Teilpopulationen weder bei Erstbruten (KS-Test: $p = 1,0$) noch bei Nachgelegen (KS-Test: $p = 0,70$) bzw. Zweitbruten (KS-Test: $p = 0,96$) von der Legebeginnverteilung der betreffenden Gesamtpopulation (vgl. Abb. 1). Für die mittleren Gelegegrößen ließ sich ebenfalls kein Unterschied zwischen beprobter Teilpopulation und Gesamtpopulation feststellen (U-Tests: Erstbruten $p = 0,94$; Nachgelege $p = 0,94$; Zweitbruten $p = 1,0$; vgl. Tab. 1).

Brutsaison 1995

Auch im Jahr 1995 gab es keinen Unterschied zwischen den analysierten Teilpopulationen und der betreffenden Gesamtpopulation. Dies gilt sowohl für die Legebeginnverteilung (KS-Tests: Erstbruten $p = 0,84$; Nachgelege $p = 0,89$; Zweitbruten $p = 1,0$; vgl. Abb. 1) als auch für die mittleren Gelegegrößen (U-Tests: Erstbruten $p = 0,65$; Nachgelege $p = 0,95$; Zweitbruten $p = 0,60$; vgl. Tab. 1).

Brutsaison 1996

Für das Untersuchungsjahr 1996 weicht die Legebeginnverteilung der molekulargenetisch analysierten Stichprobe bei den Erstbruten statistisch schwach signifikant von der Grundgesamtheit ab (KS-Test: $p = 0,047$), obwohl, wie schon in den beiden vorangegangenen Brutsaisons, eine lückenlose Beprobung aller Erstbruten angestrebt wurde. Die Abweichung wird durch eine prozentual geringere Analyse von Bruten aus dem zeitlich fortgeschrittenen Teil der Brutsaison verursacht (vgl. Abb. 1). Der Grund hierfür lag in einer etwa ab dem 24.04.96 signifikant höheren Rate an Bruten mit zerwühlten Gelegen bzw. toten Jungtieren, die vorzeitig vom Brutpaar aufgegeben wurden und somit einer moleku-

largenetischen Analyse nicht zugänglich waren (vor dem 24.04.96 wurden 9 von 63, danach 44 von 72 Bruten aufgegeben; χ^2 -Test: $p < 0,001$).

Für die Nachgelege und Zweitbruten unterschieden sich die Legebeginnverteilungen zwischen den beprobten Teilpopulationen und den entsprechenden Gesamtpopulationen nicht voneinander (KS-Tests: Nachgelege $p = 0,98$; Zweitbruten $p = 0,29$; vgl. Abb. 1). Bezüglich der mittleren Gelegegröße ließen sich weder für die Erstbruten (U-Test: $p = 0,061$) noch für die Nachgelege (U-Test: $p = 0,76$) oder Zweitbruten (U-Test: $p = 0,70$) Unterschiede zwischen der beprobten Teilpopulation und der betreffenden Gesamtpopulation feststellen (vgl. Tab. 1).

Fazit

Bei allen weiteren Betrachtungen ist zu berücksichtigen, daß die beprobten Teilpopulationen der Kohlmeisen-Erstbruten in den Jahren 1993 und 1996 bezüglich der Legebeginnverteilung nicht der Grundgesamtheit entsprechen (s. aber 3.2.3). Aus den oben angeführten Gründen lag der Beprobungsschwerpunkt in diesen Jahren relativ früh in der Brutsaison. Ansonsten sind die analysierten Stichproben repräsentativ für die Gesamtpopulationen der jeweiligen Jahre. Dies gilt auch für die mittlere Gelegegröße aller beprobten Teilpopulationen.

3.2 Elternschaftsnachweise

Mit Hilfe der angewandten molekulargenetischen Methoden lassen sich zweifelsfreie Elternschaftsnachweise durchführen. Bei Vögeln wird prinzipiell zwischen folgenden Fällen unterschieden:

- (i) Reguläre Nachkommen (beide soziale Eltern = genetische Eltern)
- (ii) Jungtiere, die das Resultat von Kopulationen außerhalb des Paarbundes seitens der Weibchen sind (= *extra-pair young*, EPY; soziale Mutter = genetische Mutter; sozialer Vater \neq genetischer Vater)
- (iii) Jungtiere, die aus innerartlichem Brutparasitismus resultieren (ein Weibchen legt ein oder mehrere Eier in ein fremdes Nest; beide soziale Eltern \neq genetische Eltern)
- (iv) Jungtiere, die das Produkt von Quasi-Brutparasitismus sind (Spezialfall von innerartlichem Brutparasitismus, bei dem das fremde Weibchen vor der Eiablage mit dem sozialen Vater der übrigen Nestlinge kopuliert hat [vgl. Birkhead *et al.* 1990]; soziale Mutter \neq genetische Mutter; sozialer Vater = genetischer Vater).

Um zwischen diesen vier Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurden die Bandenmuster der Multilocus DNA-Fingerprints (s. 2.2.1) wie folgt analysiert: Zunächst wurde die Anzahl von Fragmenten im Bandenmuster jedes Nestlings ermittelt, die bei keinem der beiden sozialen Eltern vorhanden waren (im folgenden als „neue Fragmente“ bezeichnet).

Ein einzelnes neues Fragment im gesamten Bandenmuster eines Nestlings läßt sich dabei auf Mutationsereignisse zurückführen, da frühere Untersuchungen unter Verwendung der Kombination *Hae* III/(CA)₈ (s.a. 2.2.1) bereits eine zweifelsfreie Abstammung aller Kohlmeisen-Nestlinge mit maximal einem neuen Fragment von beiden Putativeltern nachweisen konnten (z.B. Lubjuhn 1994, 1995). Solche Jungtiere wurden daher auch in der vorliegenden Studie als reguläre Nachkommen eingestuft. Bei mehr als einem neuen Fragment (in der vorliegenden Arbeit waren es immer mindestens drei neue Fragmente) muß hingegen von einem Ausschluß mindestens eines der beiden sozialen Eltern als genetischer Elter des betreffenden Nestlings ausgegangen werden (s. Lubjuhn 1994, 1995). Für diese Jungtiere wurde mit Hilfe des *band-sharing* Koeffizienten (zur Berechnung s. Wetton *et al.* 1987) der Grad an Übereinstimmung mit den Bandenmustern des jeweiligen Putativelters geprüft. Prinzipiell führt dabei ein niedriger *band-sharing* Koeffizient zum Ausschluß des betreffenden Putativelters als genetischer Elter. So führt z.B. ein niedriges *band-sharing* mit dem Männchen bei gleichzeitig hohem *band-sharing* mit dem betreffenden Weibchen zu dem Schluß, daß es sich bei dem betreffenden Nestling um ein EPY handelt. Da diese Vorgehensweise bereits vielfach überprüft wurde und sichere Schlußfolgerungen erlaubt (s. Lubjuhn 1994, 1995, Lubjuhn *et al.* 1996, 1999 a, 2001, Strohbach *et al.* 1998), wird im folgenden auf die Darstellung einzelner *band-sharing* Werte verzichtet. Statt dessen werden nur die Endresultate aller durchgeführten Elternschaftsnachweise wiedergegeben (vgl. Tab. 1 und 2).

3.2.1 Auftreten von Brutparasitismus

Innerartlicher Brutparasitismus wird bei nestflüchtenden Vogelarten häufig beobachtet (Yom-Tov 1980, MacWhirter 1989, Rohwer & Freeman 1989), spielt innerhalb der Nesthocker jedoch eher eine untergeordnete Rolle (MacWhirter 1989) und konnte bei Kohlmeisen bisher nicht nachgewiesen werden (Gullberg *et al.* 1992, Glutz von Blotzheim & Bauer 1993, Gosler 1993, Lubjuhn *et al.* 1993, 1999 a, Kempnaers *et al.* 1995, Verboven & Mateman 1997*, Krokene *et al.* 1998, Strohbach *et al.* 1998). In den 276 molekulargenetisch analysierten Bruten der vorliegenden Studie ließen sich allerdings insgesamt sieben Jungtiere aus vier verschiedenen Bruten (2 Bruten im Jahr 1994, 2 Bruten im Jahr 1996) identifizieren, die weder vom sozialen Vater noch von der sozialen Mutter des Geleges abstammten. Fälle von Quasi-Brutparasitismus (zur Definition s. 3.2) konnten hingegen nicht nachgewiesen werden.

Angesichts der Tatsache, daß innerartlicher Brutparasitismus bei Kohlmeisen bisher nicht zweifelsfrei festgestellt werden konnte (Gullberg *et al.* 1992, Glutz von Blotzheim & Bauer 1993, Gosler 1993, Lubjuhn *et al.* 1993, 1999 a, Kempnaers *et al.* 1995, Verboven & Mateman 1997, Krokene *et al.* 1998, Strohbach *et al.* 1998), muß über alternative Erklä-

* In dieser Studie stammte einer von insgesamt 516 Nestlingen weder von dem sozialen Vater noch von der sozialen Mutter ab. Aufgrund fehlender Daten können die Autoren jedoch ein überbautes Gelege als Ursache für diese Beobachtung nicht ausschließen.

rungsansätze für das Auftreten der sieben Nestlinge, die von keinem der beiden sozialen Eltern abstammten, nachgedacht werden. Es könnte sich z.B. um Jungtiere aus überbauten Gelegen handeln, die zuvor von einem anderen Kohlmeisen-Brutpaar aufgegeben worden waren (vgl. Verboven & Mateman 1997). Vielleicht wurden die betreffenden Gelege sogar von Spaziergängern manipuliert (die vier Nistkästen hingen am Rand des Versuchsgebietes an öffentlichen Wegen und im Jahr 1994 betrug die Distanz zwischen den beiden betreffenden Nisthöhlen nur 29 m). Da nicht geklärt werden kann, welche der Möglichkeiten letztendlich als Erklärung für das Ergebnis der Elternschaftsnachweise bei diesen sieben Nestlingen zutrifft, werden die betreffenden Bruten von allen folgenden Analysen ausgeschlossen. Somit reduziert sich die Anzahl der analysierten Erstbruten im Jahr 1994 von 76 auf 74 Bruten und im Jahr 1996 von 82 auf 80 Bruten (vgl. Tab. 1 und 2). Entsprechend verringert sich auch die Zahl der in die weiteren Analysen eingehenden Jungtiere aus Erstbruten für 1994 von 535 auf 513 Nestlinge und für 1996 von 574 auf 556 Nestlinge (vgl. Tab. 1 und 2). Insgesamt basieren alle folgenden Analysen damit auf 272 Bruten mit insgesamt 1957 Nestlingen (vgl. Tab. 1 und 2).

3.2.2 Auftreten von Kopulationen außerhalb des Paarbundes

Die folgende Darstellung der Ergebnisse zum Auftreten von Kopulationen außerhalb des Paarbundes bezieht zunächst alle verbleibenden 272 Bruten mit ein. Anschließend werden Erstbruten, Nachgelege und Zweitbruten getrennt betrachtet. Für die Erstbruten erfolgt dabei zusätzlich ein Vergleich der verschiedenen Untersuchungsjahre miteinander. Ferner wird die Häufigkeit des Auftretens von EPY in Erst- und Zweitbruten miteinander verglichen. Der Übersichtlichkeit halber sind die Werte für die einzelnen Jahre wieder in tabellarischer Form zusammengefaßt bzw. in Form einer Abbildung dargestellt (s. Tab. 2 und Abb. 2).

Alle Bruten

Insgesamt enthielten 34,9% (95 von 272 Bruten; s. Tab. 2) der Kohlmeisenbruten aus den Jahren 1993 bis 1996 mindestens ein Jungtier, das auf Kopulationen außerhalb des Paarbundes seitens des betreffenden Weibchens zurückging (im folgenden werden solche Bruten auch als EPY-Bruten bezeichnet). In bezug auf die Gesamtzahl der untersuchten Nestlinge waren 9,6% EPY (188 von 1957 Nestlingen; s. Tab. 2) und innerhalb der EPY-Bruten lag der Anteil von Nestlingen, die das Resultat von Kopulationen außerhalb des Paarbundes waren, bei 26,7% (188 von 705 Nestlingen; s. Tab. 2).

Erstbruten

Bei den Erstbruten variierte der Anteil an Bruten mit mindestens einem EPY in den verschiedenen Jahren zwischen 29,7% (11 von 37, 1993) und 38,8% (31 von 80, 1996) und lag insgesamt bei 34,3% (s. Tab. 2 und Abb. 3). Die einzelnen Jahre unterschieden sich diesbezüglich nicht signifikant voneinander (χ^2 -Mehrfeldertest: $p = 0,70$; vgl. Tab. 2).

Tab. 2: Anteil der Bruten mit mindestens einem EPY an der Gesamtzahl analysierter Bruten, Anteil der EPY an der Gesamtzahl analysierter Nestlinge und EPY-Anteil an Nestlingen aus EPY-Bruten getrennt nach Erstbruten, Nachgelegen und Zweitbruten für die Kohlmeisen-Population des Bahrdorfer Untersuchungsgebietes in den Jahren 1993 bis 1996.

Erstbruten	1993	1994	1995	1996	alle Jahre
Analysierte Bruten:	37	74	42	80	233
davon mit EPY:	11 (29,7%)	23 (31,1%)	15 (35,7%)	31 (38,8%)	80 (34,3%)
Analysierte Nestlinge:	277	513	376	556	1722
davon EPY:	15 (5,4%)	41 (8,0%)	37 (9,8%)	61 (11,0%)	154 (8,9%)
Nestlinge in EPY-Bruten:	79	171	146	221	617
davon EPY:	15 (19,0%)	41 (24,0%)	37 (24,3%)	61 (27,6%)	154 (25,0%)

Nachgelege	1993	1994	1995	1996	alle Jahre
Analysierte Bruten:	0	3	4	13	20
davon mit EPY:	-	2 (66,7%)	0 (0%)	2 (15,4%)	4 (20,0%)
Analysierte Nestlinge:	0	17	28	84	129
davon EPY:	-	5 (29,4%)	0 (0%)	3 (3,6%)	8 (6,2%)
Nestlinge in EPY-Bruten:	-	11	0	11	22
davon EPY:	-	5 (45,5%)	-	3 (27,3%)	8 (36,4%)

Zweitbruten	1993	1994	1995	1996	alle Jahre
Analysierte Bruten:	0	4	7	8	19
davon mit EPY:	-	3 (75,0%)	3 (42,9%)	5 (62,5%)	11 (57,9%)
Analysierte Nestlinge:	0	22	39	45	106
davon EPY:	-	7 (31,8%)	9 (23,1%)	10 (22,2%)	26 (24,5%)
Nestlinge in EPY-Bruten:	-	16	20	30	66
davon EPY:	-	7 (43,8%)	9 (45,0%)	10 (33,3%)	26 (39,4%)

gesamt	1993	1994	1995	1996	alle Jahre
Analysierte Bruten:	37	81	53	101	272
davon mit EPY:	11 (29,7%)	28 (34,6%)	18 (34,0%)	38 (37,6%)	95 (34,9%)
Analysierte Nestlinge:	277	552	443	685	1957
davon EPY:	15 (5,4%)	53 (9,6%)	46 (10,4%)	74 (10,8%)	188 (9,6%)
Nestlinge in EPY-Bruten:	79	198	166	262	705
davon EPY:	15 (19,0%)	53 (26,8%)	46 (27,7%)	74 (28,2%)	188 (26,7%)

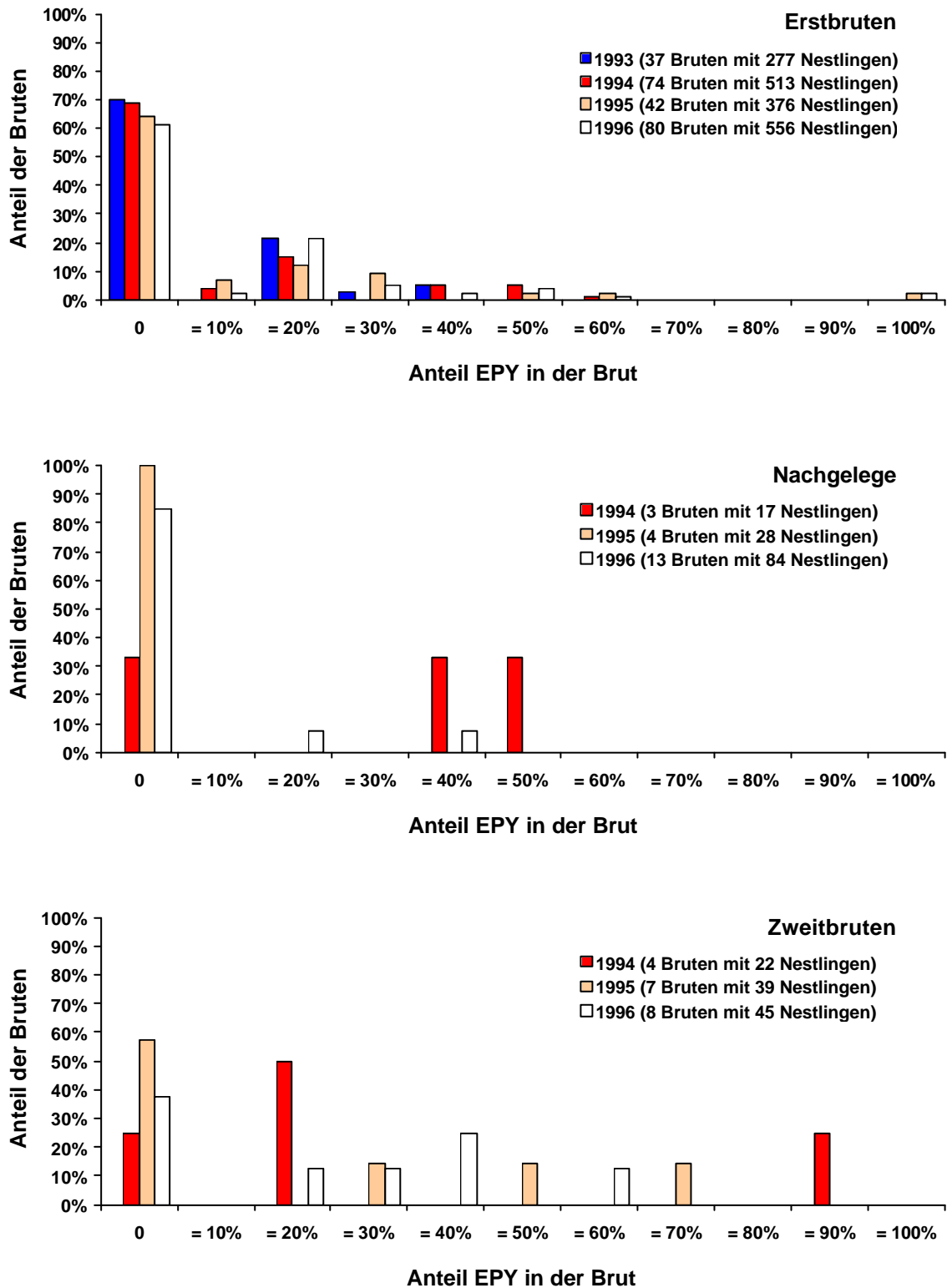


Abb. 2: Verteilung der Bruten in bezug auf den Anteil der in ihnen enthaltenen EPY (zusammengefaßt in Klassen zu 10%) getrennt nach Erstbruten, Nachgelegen und Zweitbruten.

Betrachtet man allerdings den Anteil der EPY an der Gesamtzahl der untersuchten Nestlinge (für alle Jahre zusammen: 154 von 1722 = 8,9%; s. Tab. 2), so läßt sich zwischen den Jahren ein statistisch signifikanter Unterschied feststellen (χ^2 -Mehrfeldertest: $p = 0,046$; vgl. Tab. 2). Die Werte für die einzelnen Jahre variierten zwischen 5,4% (15 von 277, 1993) und 11,0% (61 von 556, 1996; s. Tab. 2 und Abb. 3). Im paarweisen Vergleich lag der Wert für die Brutsaison 1993 statistisch signifikant niedriger als die entsprechenden Werte der Jahre 1995 (χ^2 -Test: $p = 0,039$; vgl. Tab. 2 und Abb. 3) und 1996 (χ^2 -Test: $p = 0,009$; vgl. Tab. 2 und Abb. 3), während sich für die anderen Kombinationen der einzelnen Jahre keine Unterschiede feststellen ließen (χ^2 -Tests: p jeweils = 0,098; vgl. Tab. 2 und Abb. 3).

Für den Anteil der EPY innerhalb von EPY-Bruten ergab sich für Erstbruten, bei einem Minimalwert von 19,0% (15 von 79, 1993) und einem Maximalwert von 27,6% (61 von 221, 1996), insgesamt ein Wert von 25,0% (154 von 617 Nestlingen; s. Tab. 2 und Abb. 3). Ein Vergleich der verschiedenen Jahre erbrachte keinen signifikanten Unterschied (χ^2 -Mehrfeldertest: $p = 0,49$; vgl. Tab. 2). In diesem Zusammenhang wurde auch geprüft, ob die Verteilung der Bruten bezogen auf ihren EPY-Anteil (in 10%-Klassen, s. Abb. 2) verschieden war. Bei den entsprechenden paarweisen Vergleichen der einzelnen Jahre konnte aber ebenfalls kein Unterschied festgestellt werden (KS-Tests: p jeweils = 0,66; vgl. Abb. 2).

Die Ergebnisse zum Vergleich der EPY-Raten bei Erstbruten werfen die Frage nach der oder den Ursachen für die signifikanten Unterschiede zwischen den prozentualen EPY-Anteilen an der Gesamtzahl der untersuchten Nestlinge in den verschiedenen Jahren auf. Prinzipiell wären zwei Einflußgrößen denkbar, die beide eine höhere EPY-Rate auf Populationsebene zur Folge hätten. Einerseits würde allein ein steigender Anteil an Weibchen, die Kopulationen außerhalb des Paarbundes eingehen, eine solche Zunahme bewirken. Andererseits würde, bei diesbezüglich unverändertem Weibchenanteil, auch eine Erhöhung des EPY-Anteils in den betreffenden EPY-Bruten zu einer Zunahme auf Ebene der Gesamtpopulation führen. Ersteres sollte sich dann in einem höheren Anteil an EPY-Bruten niederschlagen, letzteres in einem höheren EPY-Anteil innerhalb solcher Bruten. In bezug auf beide Parameter waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Jahren festzustellen (s.o.). Der signifikante Unterschied auf Ebene der Gesamtpopulation kommt, wie Abbildung 3 verdeutlicht, vielmehr durch den Synergismus beider Effekte zustande. Sowohl der Anteil der Bruten mit EPY als auch der EPY-Anteil innerhalb dieser EPY-Bruten korreliert signifikant positiv mit dem Anteil der EPY an der Gesamtpopulation (Spearman-Rangkorrelationen: r_s jeweils = 1,0; p jeweils = 0,01; s. Abb. 3 und Tab. 2). Es scheint also, daß bei nicht signifikanten Ergebnissen für die Einzelvariablen der Synergismus beider Parameter zu einem signifikanten Unterschied auf Ebene der Gesamtpopulation führt (auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Verlauf der Brutsaison und den EPY-Raten, der Einfluß auf die Unterschiede zwischen den einzelnen Jahren genommen haben könnte, wird weiter unten eingegangen s. 3.2.3).

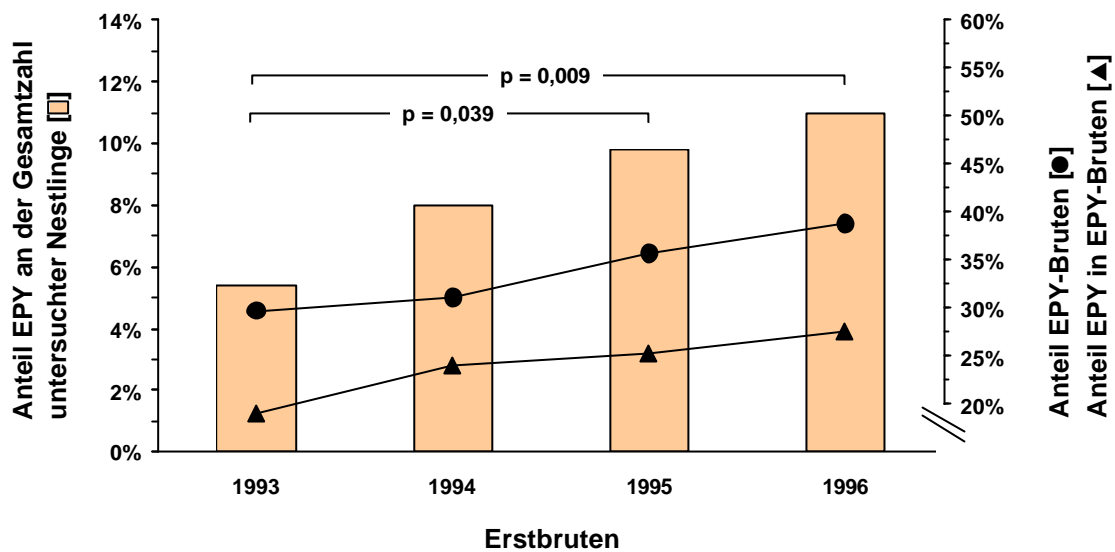


Abb. 3: Zusammenhang zwischen dem Anteil der EPY an der Gesamtzahl untersuchter Nestlinge aus Erstbruten in den Jahren 1993 bis 1996 (□) und dem Anteil an Bruten mit mindestens einem EPY (●) bzw. dem EPY-Anteil innerhalb von EPY-Bruten (▲). Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die paarweisen Vergleiche der einzelnen Jahre bezüglich des Anteils der EPY an der Gesamtzahl untersuchter Nestlinge (□, s.a. Text).

Nachgelege

Innerhalb der Nachgelege waren die EPY-Raten der einzelnen Jahre sehr uneinheitlich. Dies betraf sowohl den Anteil an Bruten mit mindestens einem EPY (0-66,7%; 0 von 4, 1995 bzw. 2 von 3, 1994; s. Tab. 2) als auch den Anteil der EPY an allen untersuchten Jungtieren (0-29,4%; 0 von 28, 1995 bzw. 5 von 17, 1994; s. Tab. 2). Der Anteil der EPY in EPY-Bruten variierte bei insgesamt 36,4% (8 von 22 Nestlingen) in den einzelnen Jahren zwischen 27,3% (3 von 11, 1996) und 45,5% (5 von 11, 1994; vgl. Tab. 2).

Die beobachtete hohe Variabilität ist sehr wahrscheinlich auf die, mit Ausnahme des Jahres 1996, äußerst kleine Stichprobe zurückzuführen. Aus diesem Grund wird hier auf weiterführende statistische Vergleiche zwischen den Jahren, wie sie für die Erstbruten durchgeführt wurden, verzichtet. Ein Vergleich der EPY-Raten bei Erstbruten und Nachgelegen erscheint aus demselben Grund wenig sinnvoll (s.a. Kap. 4).

Zweitbruten

In den untersuchten Zweitbruten der Jahre 1994 bis 1996 war die EPY-Rate im Vergleich zu den Erstbruten durchweg sehr hoch. Der Anteil an Bruten, die mindestens ein EPY enthielten, schwankte zwischen 42,9% (3 von 7, 1995) und 75,0% (3 von 4, 1994) und betrug insgesamt über alle Jahre 57,9% (s. Tab. 2). Auch der EPY-Anteil an der Gesamtzahl der untersuchten Nestlinge lag mit Werten zwischen 22,2% (10 von 45, 1996) und 31,8% (7 von 22, 1994) und einem Gesamtwert von 24,5% vergleichsweise hoch (s. Tab. 2). Dies gilt mit insgesamt 39,4% (26 von 66 Nestlingen) ebenfalls für den Anteil der EPY inner-

halb von EPY-Bruten, der in den einzelnen Jahren zwischen 33,3% (10 von 30, 1996) und 45,0% (9 von 20, 1995) schwankte (s. Tab. 2).

Für die Durchführbarkeit von Vergleichen der EPY-Raten zwischen den Jahren gilt für die Zweitbruten ähnliches wie bereits für die Nachgelege, da auch hier die Stichproben teilweise sehr klein sind (s. Tab. 2). Generell spricht dieses Stichprobendefizit auch gegen einen Vergleich der EPY-Raten bei Erst- und Zweitbruten. Jedoch eröffnen sich durch einen direkten Vergleich von Erst- und Zweitbrut ein und desselben Weibchens bzw. identischer Brutpaare in diesem Fall andere Möglichkeiten. Bei Nachgelegen ist ein solcher Vergleich nicht möglich, da diese Brutansätze bereits frühzeitig aufgegeben wurden und deshalb einer Beprobung nicht zugänglich waren (s.a. 2.1.3.3 und Kap. 4). Für einen direkten Vergleich zum Auftreten von EPY in Erst- und Zweitbruten spricht außerdem, daß die in der vorliegenden Arbeit analysierten Bruten Teil einer umfangreicheren Studie sind, in der sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der EPY-Raten in Erst- und Zweitbruten feststellen ließen (Lubjuhn *et al.* 2001).

Bei 16 der 19 in der vorliegenden Arbeit analysierten Zweitbruten waren die Paarpartner bei Erst- und Zweitbrut identisch. Die folgenden Analysen beschränken sich auf diese 16 Brutpaare, da ein Partnerwechsel möglicherweise das Auftreten von EPY aus anderen Gründen beeinflusst haben könnte (s. hierzu 3.6). Vergleicht man Erst- und Zweitbruten in bezug auf das Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein von EPY, so finden sich in den betreffenden Zweitbruten mit 56,3% (9 von 16 Bruten, vgl. Abb. 4) zwar häufiger EPY als in den Erstbruten mit 31,3% (5 von 16 Bruten, vgl. Abb. 4), doch ist dieser Unterschied im Paarvergleich nicht signifikant (Vorzeichen-Test: $p = 0,22$; vgl. Abb. 4).

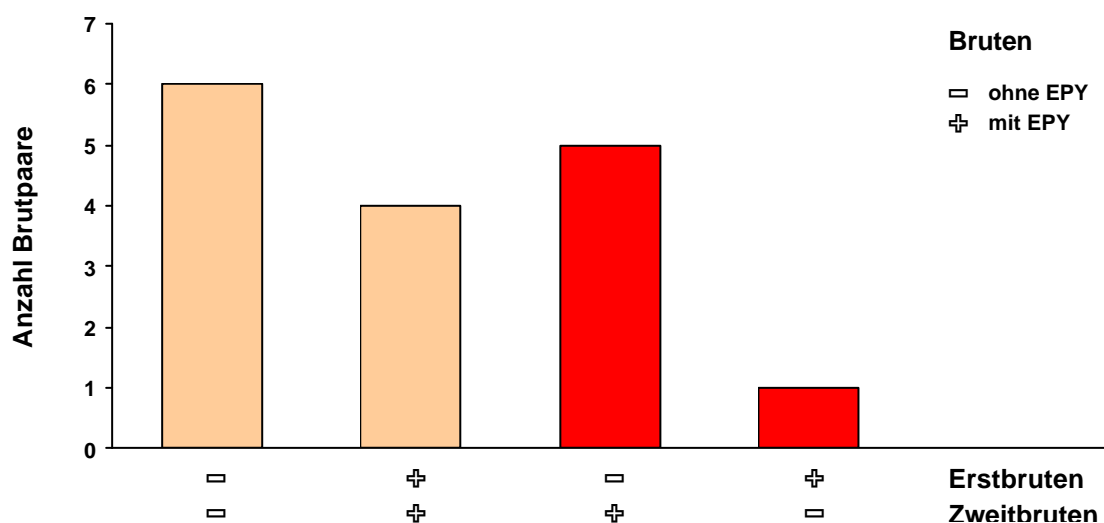


Abb. 4: Vergleich des Auftretens von EPY in Erst- und Zweitbruten identischer Brutpaare. Die hellgrauen Balken (□) repräsentieren Brutpaare bei denen entweder keine ($n = 6$) oder beide Bruten ($n = 4$) EPY enthielten, die dunkelgrauen Balken (■) repräsentieren Fälle in denen entweder nur die Erst- ($n = 1$) oder nur die Zweitbrut ($n = 5$) EPY enthielt.

Der prozentuale Anteil der EPY lag beim entsprechenden Paarvergleich innerhalb von Zweitbruten jedoch signifikant höher als innerhalb der betreffenden Erstbruten (Wilcoxon-Test: $p = 0,011$; s. Abb. 5). Prinzipiell läßt sich also auch für die in der vorliegenden Arbeit analysierte Stichprobe zeigen, daß Zweitbruten nachweislich mehr EPY enthalten als Erstbruten (vgl. Lubjuhn *et al.* 2001; zu möglichen Ursachen s. 3.2.3 und Kap. 4).

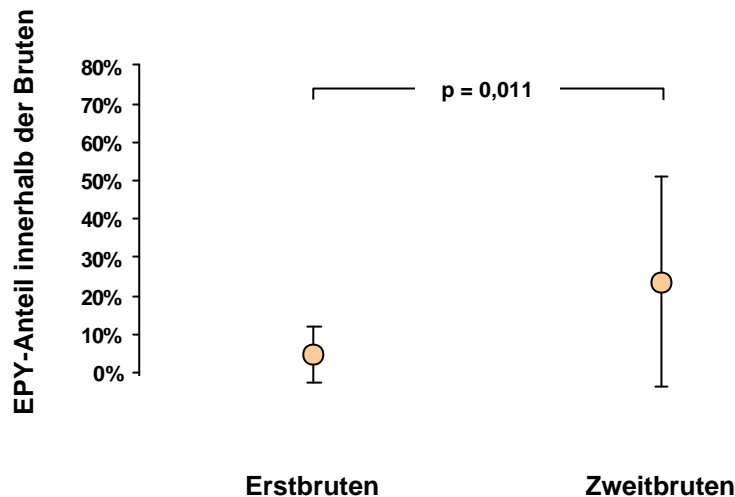


Abb. 5: EPY-Anteil innerhalb von Erst- und Zweitbruten ($\bar{x} \pm SD$). Das angegebene Signifikanzniveau bezieht sich auf den Paarvergleich des prozentualen EPY-Anteils innerhalb der Erst- und Zweitbruten identischer Brutpaare (s.a. Text).

Fazit

Die vorliegende Arbeit zeigt, wie schon eine Reihe früherer Untersuchungen, daß Jungtiere, die das Resultat von Kopulationen außerhalb des Paarbundes sind, bei Kohlmeisen keine Ausnahmeerscheinung darstellen (vgl. Gullberg *et al.* 1992, Lubjuhn *et al.* 1993, 1999 a, Verboven & Mateman 1997, Krokene *et al.* 1998, Strohbach *et al.* 1998). Die Frequenz mit der EPY zu finden sind, kann zwischen den Jahren allerdings deutlich variieren. Die Variabilität scheint dabei sowohl vom Anteil der Weibchen, die Kopulationen außerhalb des Paarbundes eingehen, als auch vom Anteil der EPY in EPY-Bruten abzuhängen. Signifikante Unterschiede bezüglich der relativen Häufigkeit von EPY finden sich auch zwischen Erst- und Zweitbruten. Letzteres ist der Grund dafür, daß sich die Analysen der folgenden Kapitel – mit einer einzigen Ausnahme (s. 3.5.1) – ausschließlich auf Erstbruten beziehen. Die Stichproben für Nachgelege und Zweitbruten sind in den meisten Fällen zu klein, um sie gesondert zu betrachten. Ein Zusammenfassen der verschiedenen Datensätze ist ebenfalls nicht möglich, da zumindest zwischen Erst- und Zweitbruten deutliche Unterschiede hinsichtlich des Auftretens von EPY bestehen.

3.2.3 Auftreten von EPY im Verlauf der Brutsaison

Im folgenden wird analysiert, ob in den einzelnen Jahren ein Zusammenhang zwischen dem Legebeginn und dem Auftreten von EPY bei Erstbruten besteht. Mehrere Gründe lassen diese Analyse notwendig erscheinen:

- (i) Als mögliche Ursache für die erhöhte EPY-Rate in Zweitbruten wird in der Literatur eine höhere Verfügbarkeit potentieller Kopulationspartner für Weibchen zu dieser Zeit diskutiert (Lubjuhn *et al.* 2001, s.a. Kap. 4). Die Verfügbarkeit potentieller Kopulationspartner könnte sich aber auch schon im Verlauf der Erstbrut verändern. So konnten Strohbach *et al.* (1998) – bei Erstbruten einer anderen Kohlmeisenpopulation – in einem von zwei Untersuchungsjahren eine Abnahme der EPY-Rate im Verlauf der Brutsaison feststellen.
- (ii) Ein weiterer Grund einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von EPY und dem Verlauf der Brutsaison zu überprüfen, ergibt sich aus den Beprobungsschwerpunkten der Jahre 1993 und 1996 auf frühen Bruten (s. 3.1.2). Ließe sich generell kein Zusammenhang zwischen dem Legebeginn und dem Auftreten von EPY feststellen, so würde dies den unter 3.1.2 geäußerten Vorbehalt zur Repräsentanz der Erstbrut-Stichproben von 1993 und 1996 relativieren. Damit bestünde nämlich kein Grund mehr, die betreffenden Stichproben hinsichtlich des Auftretens von EPY als nicht repräsentativ einzustufen. Zudem wäre gezeigt, daß die signifikant niedrigere EPY-Rate auf Ebene der Gesamtpopulation im Jahr 1993 (s. 3.2.2) nicht mit dem von der Grundgesamtheit abweichenden Beprobungsschwerpunkt in diesem Jahr zusammenhängt. Zwar spricht gegen einen solchen Zusammenhang schon die Tatsache, daß auch 1996 (dem Jahr mit der höchsten EPY-Rate) die Stichprobe zu frühen Bruten hin verschoben war (s. 3.1.2). Kann man aber einen Einfluß des Legebeginns auf das Auftreten von EPY generell unwahrscheinlich machen, so wäre dies ein weiteres Argument gegen derartige Vorbehalte.

Um einen potentiellen Einfluß des Legebeginns auf das Auftreten von EPY zu untersuchen, wurden zunächst die Legebeginne von Kohlmeisen-Erstbruten, die EPY enthielten, mit denen von Bruten ohne EPY verglichen. In keinem der Jahre ließ sich diesbezüglich ein Unterschied feststellen (U-Tests: p jeweils = 0,60; für die einzelnen Jahre s. Tab. 3). Auch bei einer anschließend durchgeführten Aufteilung der Bruten des jeweiligen Jahres in frühe Bruten (alle Bruten vor dem errechneten Median) und späte Bruten (alle Bruten nach dem errechneten Median) konnte kein Unterschied im Anteil der Bruten mit EPY festgestellt werden (χ^2 -Tests: p jeweils = 0,51; für die einzelnen Jahre s. Tab. 4).

Am aussagekräftigsten sind bei beiden Vergleichen sicherlich die Analysen der Jahre 1994 und 1995, da die untersuchten Teilpopulationen in diesen Jahren hinsichtlich des Legebeginns eine repräsentative Stichprobe der Gesamtpopulation darstellten (s. 3.1.2). Es gibt jedoch keinen zwingenden Grund anzunehmen, daß hinsichtlich des geprüften Zusammenhangs Unterschiede zwischen den Jahren bestehen. Deshalb wird im folgenden davon ausgegangen, daß auch die Stichproben der Kohlmeisen-Erstbruten aus den Jahren 1993 und 1996 in bezug auf das Auftreten von EPY repräsentativ sind.

Tab. 3: Vergleich der Legebeginne von Bruten ohne und mit EPY für die Kohlmeisen-Erstbruten des Bahrdorfer Untersuchungsgebietes in den Jahren 1993 bis 1996.

Legebeginn	1993	1994	1995	1996
Alle Bruten				
Anzahl:	37	74	42	80
Median:	18.04.93	21.04.94	22.04.95	23.04.96
1. Quartil:	15.04.93	20.04.94	21.04.95	20.04.96
3. Quartil:	21.04.93	23.04.94	25.04.95	26.04.96
Bruten ohne EPY				
Anzahl:	26	51	27	49
Median:	18.04.93	21.04.94	23.04.95	23.04.96
1. Quartil:	16.04.93	20.04.94	21.04.95	20.04.96
3. Quartil:	21.04.93	23.04.94	27.04.95	26.04.96
Bruten mit EPY				
Anzahl:	11	23	15	31
Median:	17.04.93	21.04.94	21.04.95	23.04.96
1. Quartil:	13.04.93	20.04.94	21.04.95	21.04.96
3. Quartil:	23.04.93	23.04.94	25.04.95	25.04.96
U-Test				
p-Wert:	0,65	0,81	0,60	0,78

Tab. 4: Vergleich von frühen und späten Bruten hinsichtlich des Vorhandenseins von EPY. Die Aufteilung in frühe und späte Bruten erfolgte anhand des für alle analysierten Erstbruten des jeweiligen Jahres ermittelten Legebeginn-Medians (s. Tab. 3). Brutpaare, die im jeweiligen Jahr an genau diesem Tag mit der Eiablage begannen, wurden bei der Analyse nicht berücksichtigt.

Legebeginn	1993	1994	1995	1996
Frühe Bruten (< Median)				
mit EPY:	6	9	8	14
ohne EPY:	12	22	12	23
Späte Bruten (> Median)				
mit EPY:	5	11	6	13
ohne EPY:	13	21	14	20
χ^2-Test				
p-Wert:	0,72	0,65	0,51	0,89

3.3 Einfluß proximatier Faktoren auf die EPY-Rate der Gesamtpopulation

Die im vorangegangenen Kapitel durchgeführten Analysen lassen es unwahrscheinlich erscheinen, daß die Unterschiede zwischen den EPY-Anteilen an der Gesamtzahl der untersuchten Nestlinge in den Erstbruten der einzelnen Jahre (s. 3.2.2) auf eine zeitliche Verzerrung bei der Beprobung zurückzuführen sind. Es soll daher im folgenden untersucht werden, ob sich auf Populationsebene andere proximate Faktoren identifizieren lassen, welche mit der Varianz in den EPY-Raten in Beziehung stehen. In der Literatur werden diesbezüglich im wesentlichen zwei Einflußgrößen diskutiert: Die Brutpaardichte (z.B. Gibbs *et al.* 1990, Gowaty & Bridges 1991 a, Dunn *et al.* 1994, Übersicht in Westneat & Sherman 1997) und die Brutsynchronität (z.B. Stutchbury & Morton 1995, Kempnaers 1997, Stutchbury 1998 a, b, Weatherhead & Yezerinac 1998).

Brutpaardichte

Die Brutpaardichte, als Maß für die räumliche Verfügbarkeit potentieller Kopulationspartner, könnte das Auftreten von EPY durch das Angebot von EPC-Möglichkeiten beeinflussen. Weibchen hätten demnach bei einer größerer Brutpaardichte häufiger die Möglichkeit EPCs einzugehen. Dies könnte dann wiederum in einer Erhöhung des EPY-Anteils in der Population resultieren (s. Übersicht in Westneat & Sherman 1997).

In den einzelnen Untersuchungsjahren war die Anzahl und somit auch die Dichte der Kohlmeisen-Erstbruten sehr unterschiedlich. Die Anzahl der Erstbrutansätze variierte im insgesamt 160 ha großen Untersuchungsgebiet (s. 2.1.2) zwischen 59 (1995) und 142 Brutansätzen (1993, vgl. Tab. 1), was Brutpaardichten zwischen 0,37 Brutansätzen/ha (1995) und 0,89 Brutansätzen/ha (1993) entspricht. Als weiteres dichtebeschreibendes Maß kann die mittlere Entfernung zwischen zwei benachbarten Brutansätzen herangezogen werden. Dieses Maß spiegelt die Verhältnisse innerhalb eines Jahres insofern genauer wider, als daß eventuell vorhandene räumliche Anhäufungen von Bruten berücksichtigt werden. Für die einzelnen Untersuchungsjahre lagen die mittleren Entfernungen zwischen zwei unmittelbar benachbarten Kohlmeisen-Brutansätzen zwischen $63,7 \pm 31,6$ m (1993, $\bar{x} \pm SD$, $n = 142$) und $95,7 \pm 51,1$ m (1995, $\bar{x} \pm SD$, $n = 59$). In den Jahren 1994 und 1996 ergaben sich mit $83,0 \pm 48,3$ m ($\bar{x} \pm SD$, $n = 97$) bzw. $68,8 \pm 30,6$ m ($\bar{x} \pm SD$, $n = 135$) intermediäre Werte.

Abbildung 6 stellt den Zusammenhang zwischen den beiden, die Brutpaardichte beschreibenden Parametern und dem EPY-Anteil an der Gesamtzahl der in dem jeweiligen Jahr untersuchten Erstbrutnestlinge dar. Es findet sich nicht nur kein signifikanter Zusammenhang (Spearman-Rangkorrelationen: Anzahl Brutansätze $r_s = 0,4$, Mittlere Distanz $r_s = -0,4$; p jeweils = 0,60), sondern entgegen der eingangs abgeleiteten Erwartung sinkt die Brutpaardichte in den Jahren 1993 bis 1995 bei steigender EPY-Rate kontinuierlich ab, während sich die mittlere Distanz zwischen benachbarten Kohlmeisen-Erstbruten entsprechend vergrößert (s. Abb. 6).

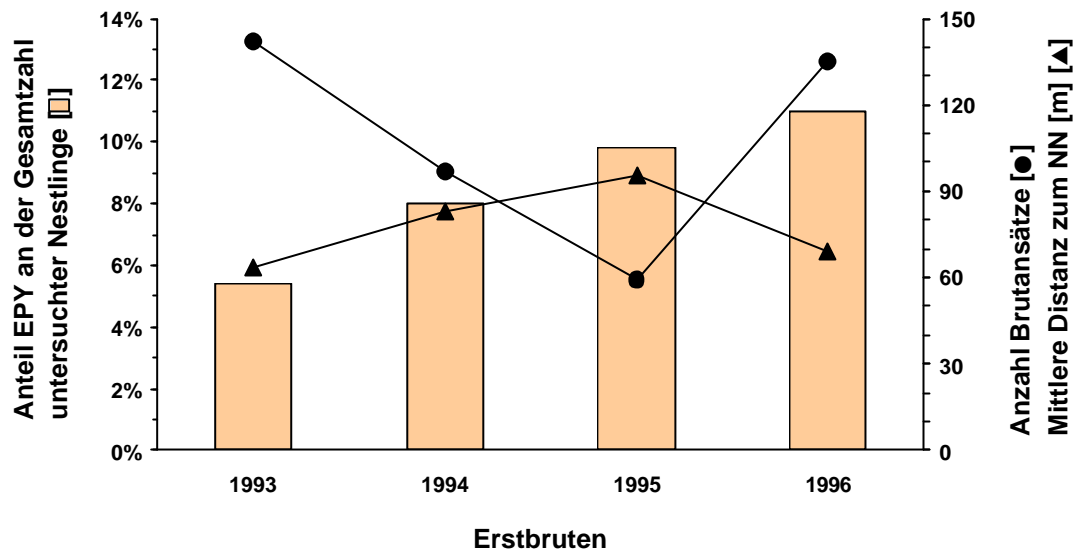


Abb. 6: Zusammenhang zwischen dem Anteil der EPY an der Gesamtzahl untersuchter Nestlinge aus Erstbruten in den Jahren 1993 bis 1996 (□) und den dichtebeschreibenden Parametern Anzahl Brutansätze (●) und mittlere Distanz zum nächstbenachbarten Kohlmeisen-Brutansatz im Bahrdorfer Untersuchungsgebiet (NN = Nächster Nachbar, ▲).

Brutsynchronität

Die Brutsynchronität ist ein Maß für die Überlappung der fertilen Phasen in einer Gruppe weiblicher Individuen (zur Definition s. 2.1.3.5). Hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf die EPY-Raten bei Vögeln werden zwei grundsätzlich verschiedene Möglichkeiten diskutiert:

- (i) Eine zunehmende Brutsynchronität könnte die Möglichkeit der Männchen limitieren, EPCs einzugehen. Männchen könnten nämlich bei hoher Brutsynchronität gezwungen sein, sich durch eine besonders intensive Bewachung des eigenen Weibchens (*mate guarding*) vor EPY im eigenen Nest zu schützen. Sie hätten so weniger Zeit, selbst EPCs einzugehen (Birkhead & Biggins 1987, Westneat *et al.* 1990, Weatherhead 1997, Weatherhead & Yezerinac 1998, Westneat & Gray 1998). Folgt man dieser Überlegung, so wäre eine Abnahme der EPY-Rate mit zunehmender Brutsynchronität zu erwarten.
- (ii) Die Häufigkeit von EPCs könnte mit zunehmender Brutsynchronität allerdings auch ansteigen, da die Konkurrenz der Männchen um einzelne Weibchen mit wachsender Anzahl zeitgleich fertiler Weibchen abnimmt. Außerdem könnte für Weibchen die Zuverlässigkeit der Abschätzung der relativen Qualität möglichst vieler Männchen (s.a. 3.6) durch die direkte Vergleichbarkeit der potentiellen Kopulationspartner in derselben Phase ihres Brutzyklus erhöht sein. Auch dies könnte einen Anstieg der EPC-Raten mit zunehmender Brutsynchronität zur Folge haben (Stutchbury & Morton 1995, Stutchbury 1998 a, b).

Beide Überlegungen lassen also eine Korrelation der EPY-Rate mit der Brutsynchronität erwarten. Diese Korrelation sollte im Fall (i) allerdings negativ (Birkhead & Biggins 1987, Westneat *et al.* 1990, Weatherhead 1997, Weatherhead & Yezerinac 1998, Westneat & Gray 1998), im Fall (ii) hingegen positiv sein (Stutchbury & Morton 1995, Stutchbury 1998 a, b).

Um zu überprüfen, ob einer der beiden postulierbaren Zusammenhänge tatsächlich vorhanden ist, wurde der Brutsynchronitäts-Index (SI) berechnet (s. 2.1.3.5). Ein zentraler Term der verwendeten Formel ist die Dauer der fertilen Phase der Weibchen (s. 2.1.3.5). Sie ist einerseits abhängig von der Gelegegröße, andererseits aber auch von der Lebensfähigkeit der im weiblichen Genitaltrakt gespeicherten Spermien (Birkhead & Møller 1992). Zur Lebensfähigkeit der Spermien liegen bei Kohlmeisen keine Untersuchungen vor. In einer Zusammenstellung von Daten diesbezüglich untersuchter Vogelarten durch Birkhead & Møller (1992) liegen die betreffenden Werte zwischen 7 und 42 Tagen. Läßt man den Extremwert von 42 Tagen bei Truthähnen (*Meleagris gallopavo*) unberücksichtigt, so ergibt sich für die Zusammenstellung von Birkhead & Møller (1992) ein Mittelwert von 10-11 Tagen. Zur Berechnung des Brutsynchronitäts-Indices bei Blaumeisen (*Parus caeruleus*), einer der Kohlmeise nächstverwandten Vogelart, wurde allerdings mehrfach eine Überlebensfähigkeit der Spermien von nur fünf Tagen zugrunde gelegt (Kempnaers 1993, 1997). Um diese verschiedenen Möglichkeiten zu berücksichtigen und weil für Kohlmeisen exakte Angaben fehlen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Brutsynchronitäts-Indices auf der Basis dreier unterschiedlicher Grundannahmen zur Überlebensfähigkeit der Spermien berechnet:

- (i) Die fertilen Phase der Weibchen dauert lediglich vom Tag vor der ersten Eiablage bis zum Tag vor Ablage des letzten Eies (= SI_1).
- (ii) Auf der Basis der für Blaumeisen angenommenen Zeitspanne (s.o.) reicht die fertile Phase von sechs Tagen vor der ersten Eiablage bis einen Tag vor Ablage des letzten Eies (= SI_6).
- (iii) Legt man die mittlere Lebensfähigkeit der Spermien in der Zusammenstellung von Birkhead & Møller (1992) zugrunde (s.o.), so ergibt sich für die fertile Phase eine Zeitspanne von elf Tagen vor Beginn der Eiablage bis einen Tag vor Ablage des letzten Eies (= SI_{11}).

Die zu den einzelnen Grundannahmen erhaltenen Werte sind in Abbildung 7 graphisch dargestellt und in Tabelle 5 noch einmal zusammengefaßt. Unabhängig davon, welchen Zeitraum man für die fertile Phase der Weibchen annimmt, läßt sich weder ein positiver noch ein negativer Zusammenhang zwischen der Brutsynchronität der Population und den EPY-Raten der einzelnen Jahre feststellen (Spearman-Rangkorrelationen: r_s jeweils = 0,2; p jeweils = 0,80). Statt dessen findet sich, bei in den aufeinanderfolgenden Jahren jeweils zunehmenden EPY-Raten, einmal ein Anstieg in der Brutsynchronität (1993 nach 1994), einmal ein Abfall (1995 nach 1996) und einmal keine wesentliche Veränderung (1994 nach 1995; s. Abb. 7 und Tab. 5).

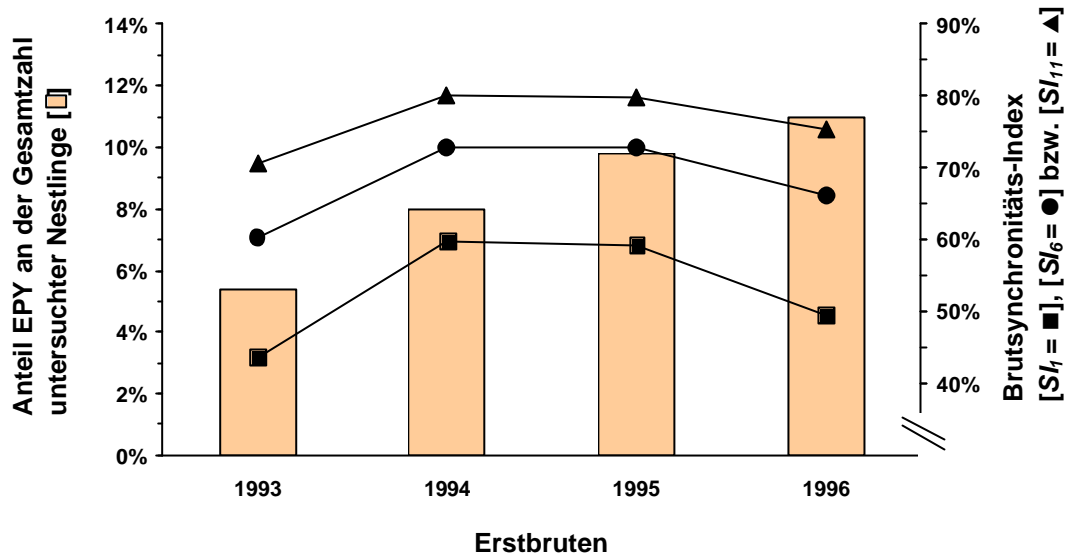


Abb. 7: Zusammenhang zwischen dem Anteil der EPY an der Gesamtzahl untersuchter Nestlinge aus Erstbruten in den Jahren 1993 bis 1996 (□) und den Brutsynchronitäts-Indices SI_1 (■), SI_6 (●) und SI_{11} (▲). Da die exakte Dauer der fertilen Phase von Kohlmeisen-Weibchen nicht bekannt ist, wurden zur Berechnung der Brutsynchronitäts-Indices verschiedene Werte für den Beginn der fertilen Phase angenommen. Die Anzahl der Tage, die vor Ablage des ersten Eies zur fertilen Phase hinzugerechnet wurden, werden dabei durch die tiefgestellte Zahl im jeweiligen Index angegeben (= 1, 6 oder 11). Für das Ende der fertilen Phase wurde in allen Fällen der Tag vor Ablage des letzten Eies angenommen (s.a. Text).

Tab. 5: Brutsynchronitäts-Indices für die Kohlmeisen-Erstbruten des Bahrdorfer Untersuchungsgebietes in den Jahren 1993 bis 1996. Einzelheiten zu den Unterschieden bei der Berechnung der Indices SI_1 , SI_6 und SI_{11} finden sich im Text.

Brutsynchronitäts-Index	1993	1994	1995	1996
SI_1	43,6%	59,8%	59,2%	49,4%
SI_6	60,2%	72,9%	72,8%	66,1%
SI_{11}	70,6%	80,0%	79,8%	75,5%

Fazit

Weder die Brutpaardichte noch die Brutsynchronität scheinen auf Ebene der Gesamtpopulation mit den signifikanten Veränderungen hinsichtlich des Anteils der EPY an der Gesamtzahl der untersuchten Erstbrutnestlinge in den unterschiedlichen Jahren zusammenzuhängen. Einschränkend müssen allerdings zwei Dinge berücksichtigt werden. Zum einen beziehen sich die diesbezüglichen Analysen auf „nur“ vier Untersuchungsjahre und müs-

sen daher mit einer gewissen Vorsicht interpretiert werden. Zum anderen bezieht sich die obige Schlußfolgerung auf einen aus der Literatur abgeleiteten linearen Zusammenhang zwischen den untersuchten proximativen Faktoren und der EPY-Rate. Es ist jedoch durchaus denkbar, daß die Muster wesentlich komplexer sind bzw. daß die beiden Parameter Brutpaardichte und Brutsynchronität in irgendeiner Form zusammenspielen. Da jede Überlegung in diese Richtung aufgrund des vorliegenden Datenmaterials hochgradig spekulativ bleiben muß, wird hier auf weitere Ausführungen verzichtet. Statt dessen werden an anderer Stelle entsprechende Analysen auf dem Individualniveau durchgeführt (s. 3.5), da hierzu, nach Identifizierung der genetischen Väter der EPY (s. 3.4), größere und damit brauchbarere Datensätze vorlagen.

3.4 Identifizierung der EPC-Partner

Mit Hilfe des Multilocus DNA-Fingerprinting konnten 154 Nestlinge aus 80 Erstbruten zweifelsfrei als EPY klassifiziert werden (s. 3.2.2). Diese Methode ist allerdings nicht geeignet, die genetischen Väter der betreffenden Nestlinge zu identifizieren, da ein Vergleich von Bandenmustern zwischen einzelnen „Fingerprint“-Gelen nicht zulässig ist. Wollte man mit Hilfe des Multilocus DNA-Fingerprinting die genetischen Väter der EPY finden, so müßte man die Bandenmuster der EPY und ihrer jeweiligen Mutter zusammen mit denen aller Männchen auf jeweils demselben Gel miteinander vergleichen, um so herauszufinden, durch welches Männchen sich alle paternalen Banden im Bandenmuster des betreffenden EPY erklären lassen. Angesichts der Größe der untersuchten Population (s. 3.1) wäre dies nicht nur mit einem kaum zu bewältigenden Arbeitsaufwand verbunden, sondern man würde auch sehr schnell durch die vorhandenen DNA-Mengen limitiert. Einen Ausweg bietet die sogenannte DNA-Mikrosatellitenanalyse (s. 2.2.2).

Da verschiedenen Fragen nur nachgegangen werden kann, wenn man die Männchen kennt, mit denen die Weibchen EPCs eingegangen sind (diese werden im folgenden auch als *extra-pair males* = EPMs bezeichnet), wurden DNA-Mikrosatellitensysteme für Kohlmeisen etabliert (s. 2.2.2 und 3.4.1). Zwar reichte die Informativität der etablierten Systeme nicht aus, um die EPMs allein durch die Mikrosatellitenanalysen ausfindig zu machen. Durch die Typisierung aller Männchen und aller EPY sowie deren Mütter war es jedoch möglich, die Zahl der potentiellen Väter einzelner EPY so stark einzugrenzen, daß die eindeutige Identifizierung der betreffenden Männchen eines Jahrganges durch weitere Multilocus DNA-Fingerprints handhabbar wurde (s.a. 3.4.2). Mit Hilfe des durch diese Vorgehensweise erhaltenen Datenmaterials konnten dann weitere Untersuchungen zu proximativen Einflußgrößen und ultimativen Faktoren hinsichtlich des Auftretens von EPY durchgeführt werden (s. 3.5 und 3.6).

3.4.1 Etablierung geeigneter DNA-Mikrosatellitensysteme für Kohlmeisen

3.4.1.1 Isolierung von DNA-Mikrosatelliten

Die gesamte subgenomische Genbank der Kohlmeise, die etwa 3000 Plasmid-Klone umfaßte (s. 2.2.2.1), wurde mit vier Di-, sieben Tri- und drei Tetranukleotid-Polymersonden auf Mikrosatelliten-Sequenzen hin durchsucht (s. 2.2.2.2 und Rassmann *et al.* 1991). Insgesamt wurden dabei 39 positive Klone isoliert. Mit der Oligonukleotidsonde (CA)₈ wurden vierzehn, mit (TC)₈ zehn, mit (TCC)₅ fünf, mit (GACA)₄ drei, mit (AAC)₅, (TAA)₅TA und (TAC)₅ jeweils zwei und mit (GAA)₆ ein positiver Klon identifiziert. Mit den Oligonukleotidsonden (GC)₈, (AT)₁₂, (TCG)₅, (CAC)₅, (GGAT)₄ und (GATA)₄ konnten hingegen keine positiven Klone gefunden werden.

Für 33 (84,6%) der positiven Klone wurde die Sequenz des klonierten Kohlmeisen DNA-Inserts bestimmt (s. 2.2.2.3). Dabei konnte für 29 (87,9%) mindestens eine Mikrosatelliten-Sequenz bestätigt werden, während der sequenzierte Bereich des DNA-Inserts der übrigen vier Klone (12,1%) entweder keine Mikrosatelliten-Sequenz enthielt (zwei Klone), oder aber die Signalintensität für eine genaue Beurteilung der Sequenz zu schwach war (ebenfalls zwei Klone).

3.4.1.2 Charakterisierung von DNA-Mikrosatelliten

Nach Weber (1990) werden klonierte Mikrosatelliten-Sequenzen in „Perfekte Mikrosatelliten“ (keine Unterbrechung in der Abfolge des Grundmotivs), „Nicht perfekte Mikrosatelliten“ (eine oder mehrere Unterbrechungen in der Abfolge des Grundmotivs) oder „Zusammengesetzte Mikrosatelliten“ (benachbart liegende perfekte oder nicht perfekte Mikrosatelliten) unterteilt. Die meisten der für Kohlmeisen gefundenen DNA-Mikrosatelliten waren diesbezüglich durch einen perfekten Mikrosatelliten-Bau gekennzeichnet, d.h. sie zeigten keine Unterbrechung in der Abfolge ihres Grundmotivs (48,3%, 14 von 29). Nicht perfekte DNA-Mikrosatelliten (34,5%, 10 von 29) oder zusammengesetzte DNA-Mikrosatelliten (17,2%, 5 von 29) wurden seltener isoliert.

Klassifiziert man die DNA-Mikrosatelliten anhand der Länge des häufigsten Grundmotivs, setzte sich die repetitive Sequenz in 16 Fällen (55,2%) aus einem Dinukleotid, in 10 Fällen (34,5%) aus einem Trinukleotid, in zwei Fällen (6,9%) aus einem Tetranukleotid und in einem Fall (3,4%) aus einem Pentanukleotid zusammen.

3.4.1.3 Amplifikation und Variabilität der DNA-Mikrosatelliten

Für die weiterführenden Analysen wurden insgesamt zehn Mikrosatelliten-Loci ausgesucht, die aufgrund ihres Grundmotivs besonders vielversprechend erschienen. Es handelte sich dabei um sechs Dinukleotid-Mikrosatelliten (davon zwei mit perfektem Bau), drei Trinukleotid-Mikrosatelliten (einer davon mit perfektem Bau) und einen perfekten Tetranu-

kleotid-Mikrosatelliten. Zwei dieser Mikrosatelliten-Loci (20%) erwiesen sich im nachhinein für eine Amplifikation aus chromosomaler Kohlmeisen DNA als unbrauchbar, da die repetitiven Regionen zu nahe an der Kolonierungsstelle des Vektors lagen, so daß für diese Klone letztendlich keine Primer geeigneter Länge angefertigt werden konnten.

Für vier Di-, drei Tri- und einen Tetranukleotid-Mikrosatelliten wurden Primerpaare entworfen (s. 2.2.2.4.1 und Tab. 6). Danach wurde die spezifische Amplifikation dieser Loci unter verschiedenen Bedingungen getestet (s. 2.2.2.4.2). Für fünf der verbleibenden acht Mikrosatelliten-Loci (62,5%) konnten Amplifikationsbedingungen gefunden werden, die reproduzier- und interpretierbare Amplifikationsmuster lieferten. Für die anderen drei Loci (37,5%) ließen sich trotz verschiedener Versuche zur Optimierung der verwendeten *Annealing*-Temperaturen und $MgCl_2$ -Konzentrationen keine Bedingungen finden, die zu einem auswertbaren Amplifikationsmuster führten. Auch der Einsatz von DMSO, Formamid und Glycerin oder die Anwendung der *Hot Start*-Technik verbesserten das Amplifikationsergebnis nicht (s. Hoelzel & Green 1992).

Drei der zuverlässig amplifizierbaren Mikrosatelliten-Loci waren monomorph, die beiden anderen (ein Di- und ein Tetranukleotid-Mikrosatellit, im folgenden als *2KM* und *4KM* bezeichnet) waren in unterschiedlichem Ausmaß variabel (s. Tab. 6). Die Länge der amplifizierten Allele unterschied sich, wie erwartet, um Vielfache von zwei bzw. vier Basen (s.a. Abb. 8), d.h. die Variabilität der Mikrosatelliten-Allele basiert vermutlich hauptsächlich auf Unterschieden in der Wiederholungsfrequenz des Grundmotivs. Die erwarteten Heterozygotieraten (zur Berechnung s. 2.2.2.4.3) lagen bei 77,5% (*2KM*) bzw. 78,5% (*4KM*) und unterschieden sich nicht von den beobachteten Heterozygotieraten (Werte in Tab. 6; χ^2 -Tests: *2KM* $p = 0,44$; *4KM* $p = 0,83$).

Die Allelfrequenzen für die beiden etablierten DNA-Mikrosatellitensysteme sind in Abbildung 8 dargestellt, die optimierten PCR-Bedingungen finden sich in Tabelle 7. In jedem der beiden Systeme sind drei Allele besonders häufig und machen zusammen eine Allelfrequenz von etwa 75% aus (s. Abb. 8).

3.4.2 Identifizierte genetische Väter

Für die Suche nach den genetischen Vätern der EPY standen in jedem Jahr insgesamt mehr Männchen zur Verfügung, als anhand der Stichprobe in bezug auf die analysierten Erstbruten anzunehmen wäre (s. Tab. 8). Der Grund hierfür liegt darin, daß auch beprobte Männchen berücksichtigt werden konnten, deren Bruten aus verschiedenen Gründen einer Analyse nicht zugänglich waren, z.B., weil das betreffende Weibchen sich nicht fangen ließ. Generell wurde bei der Identifizierung der genetischen Väter wie folgt vorgegangen: Alle Männchen eines Jahrgangs sowie die EPY und deren Mütter wurden mit Hilfe der Mikrosatelliten-Systeme *2KM* und *4KM* typisiert (s. 2.2.2.4.3 und 3.4.1). Durch einen Vergleich der Amplifikatlängen bei den EPY und ihren Müttern konnten die Allel-Kombinationen ermittelt werden, die für den jeweiligen genetischen Vater möglich waren. Dadurch ließ sich

Tab. 6: Liste der Mikrosatelliten-Loci von Kohlmeisen (*Parus major*), für welche Primerpaare entworfen wurden. Für jeden Locus sind die Primersequenzen mit etwaiger Modifikation des 5'-Endes, die Struktur des Mikrosatelliten-Motives, die Anzahl der amplifizierten Allele, die Länge der erhaltenen Amplifikate und die erwartete (H_{exp}) bzw. die beobachtete (H_{obs}) Heterozygotierate angegeben.

Locus	Primer- 5'- Markierung ^a	Primer- sequenzen (5'-3')	Mikrosatelliten- Motiv ^{b,c}	Anzahl Allele	Amplifikat- länge [bp] ^d	Heterozygotierate [%] ^e	
						H_{exp}	H_{obs}
2KM:	TET	TTT gAT gAA ggT TTT TCC AAg Tgg AAC CTA CAg gAA gCT TgA TAA ATg	(AC) ₁₅	9	110-126	77,5	80,2
1829:		ACg ggA gCA CgA TCT AAC CTT ggC CAA TTA TAT TCA CAg	(AT) ₃ (TN) ₂ (AN) ₄₆ (GC)(AN) ₁₄	0	—	—	—
1830:		CCC TgC CTg TgC CgT ggA gAC TTA CCC gTC ATC gAg CAg CCT gAg	(NT) ₂₅	1	424	—	—
4KM:	HEX	gCA CTg AAT gAg CTg AAA gAA Tg ggC CAA CAg ggC ACT gAA	(AACC) ₁₁	8	126-154	78,5	77,8
1840:		AgC AAA ACT gAg CCg TgT AAA TCC gCA gCg TgT gTC CgT gAC TgA	(CT) ₁₇	0	—	—	—
1848:		Tgg ggC Agg gAA TCA CTC ggC CTg ggA AgT CTC TTT A	(TCN) ₁₇	0	—	—	—
1852:		ggg gAA AAC gCT ATA ggT CAg AA g CAg CAg ggg CAA CAT TAA TAC ACT CT	(AAT) ₂₁	1	323	—	—
1853:		CCC CgT gCC CCC TgA CCT TCC Cgg CCC TCC TCA AgA Tg	(TCN) ₁₅	1	242	—	—

^a Fluoreszenz-Amidite zur Markierung der Primer für die Fragmentanalyse mit Hilfe des ABI 377

^b Mikrosatelliten-Anteil der Sequenz aus dem klonierten DNA-Fragment

^c N steht für ein beliebiges Nukleotid

^d Angegeben sind die Minimal- und Maximalwerte aller bislang amplifizierten Produkte (bp = Basenpaare). Allele des Dinukleotid-Mikrosatelliten unterscheiden sich um ganzzahlige Vielfache von zwei, die des Tetranukleotids um vier Basenpaare.

^e Die beobachtete Heterozygotierate (H_{obs}) und die Allelfrequenzen zur Berechnung der erwarteten Heterozygotierate (H_{exp} ; Formel s. 2.2.2.4.3; Stearns & Hoekstra 2000) wurden durch die Analyse von insgesamt 248 Individuen (119 Weibchen, 129 Männchen) ermittelt.

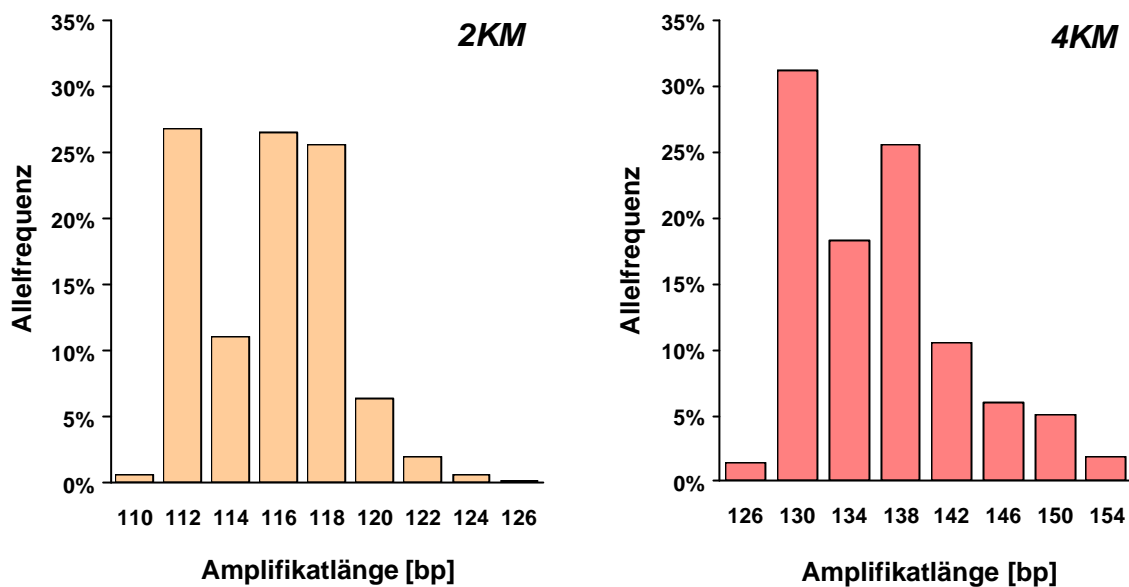


Abb. 8: Allelfrequenzen für die Mikrosatelliten-Loci 2KM und 4KM. Die Allelfrequenzen wurden anhand der Genotypen von insgesamt 248 Individuen (119 Weibchen, 129 Männchen) ermittelt.

Tab. 7: Optimierte Reaktionsbedingungen für die Mikrosatelliten-Loci 2KM und 4KM. Aufgelistet sind die Temperaturprofile (optimiert für den Thermocycler PE9600 von Perkin Elmer) und die unter dem genannten Temperaturregime optimierten Reaktionsbedingungen.

PCR - Programm	pre-denaturing	erster Zyklus	zweiter Zyklus	weitere 28 Zyklen	final extension
2KM:	94°C / 240 s	94°C / 60 s	94°C / 60 s	94°C / 30 s	72°C / 30 min
		66°C / 60 s	63°C / 60 s	60°C / 60 s	
		72°C / 60 s	72°C / 60 s	72°C / 60 s	
4KM:	94°C / 240 s	94°C / 60 s	94°C / 60 s	94°C / 30 s	72°C / 5 min
		62°C / 60 s	59°C / 60 s	56°C / 60 s	
		72°C / 60 s	72°C / 60 s	72°C / 60 s	

10 ml PCR - Ansatz	dNTPs	Primer	MgCl ₂	Formamid	Taq
2KM:	200 µM	10 pmol	2,5 mM	2%	0,25 U
4KM:	200 µM	10 pmol	3,5 mM	2%	0,25 U

die Zahl der als genetischer Vater in Frage kommenden Männchen für jeden einzelnen EPY drastisch reduzieren. Alle verbleibenden potentiellen Väter, die in einem Radius von 650 m um die Fokushöhle gebrütet hatten, wurden zusammen mit dem bzw. den betreffenden EPY und ihrer jeweiligen Mutter auf ein „Fingerprint“-Gel aufgetragen (s. 2.2.1). Wenn sich das Bandenmuster eines EPY komplett aus dem Bandenmuster seiner Mutter und dem Bandenmuster eines dieser Männchen zusammensetzen ließ, konnte zweifelsfrei davon ausgegangen werden, daß es sich bei diesem Männchen um den genetischen Vater des betreffenden Nestlings handelte (s.a. 3.2).

Faßt man die Daten aller Jahre zusammen, so konnte auf die oben beschriebene Art und Weise für 56 der 80 Erstbruten mit EPY (70,0%) mindestens eines der beteiligten EPMs ermittelt werden. Bezogen auf die Nestlinge wurde der genetische Vater für 95 der insgesamt 154 EPY (61,7%) identifiziert. Die entsprechenden Daten für die einzelnen Jahre sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Insgesamt wurden 45 Individuen als genetische Väter in anderen Bruten identifiziert. 33 dieser Männchen (73,3%) waren jeweils nur in einem Jahr und einer Brut als EPM repräsentiert. Es kam allerdings auch viermal vor, daß dasselbe Männchen in zwei aufeinanderfolgenden Jahren als genetischer Vater einzelner EPY identifiziert wurde, wobei es sich im zweiten Jahr mit einer einzigen Ausnahme immer um die Brut eines jeweils anderen Weibchens handelte. Die Repräsentanz eines Männchens als genetischer Vater in mehreren Bruten desselben Jahres wurde etwas häufiger festgestellt. Sieben Männchen waren die genetischen Väter von EPY in zwei Bruten (eines davon auch in zwei Jahren, s.o.) und jeweils ein Männchen war durch EPY in drei bzw. vier Bruten repräsentiert.

Tab. 8: *Analysierte Bruten bzw. Anzahl beprobter Männchen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Erstbrutansätze, sowie Angaben zum Anteil der EPY-Bruten, für die mindestens ein extra-pair male (EPM) identifiziert werden konnte, bzw. zum Anteil der EPY, für die im betreffenden Jahr der genetische Vater ermittelt wurde.*

Erstbruten	1993	1994	1995	1996	alle Jahre
Brutansätze:	142	97	59	135	433
analysierte Bruten:	37 (26,1%)	74 (76,3%)	42 (71,2%)	80 (59,3%)	233 (53,8%)
Anzahl beprobter Männchen:	54 (38,0%)	87 (89,7%)	53 (89,8%)	98 (72,6%)	292 (67,4%)
Bruten mit EPY:	11	23	15	31	80
mindestens 1 EPM identifiziert:	7 (63,6%)	17 (73,9%)	11 (73,3%)	21 (67,7%)	56 (70,0%)
EPY:	15	41	37	61	154
genetischer Vater identifiziert:	9 (60,0%)	28 (68,3%)	24 (64,9%)	34 (55,7%)	95 (61,7%)

Auf der Basis dieses Datenmaterials konnte zunächst einigen allgemeineren Fragen zur Fortpflanzungsbiologie von Kohlmeisen nachgegangen werden: Mit wievielen Männchen gehen einzelne Kohlmeisen-Weibchen Kopulationen außerhalb des Paarbundes ein? Wieviele Nachkommen haben EPMS in der Brut eines Weibchens und wie wirken sich EPY insgesamt auf die Varianz im Fortpflanzungserfolg der Männchen aus? Außerdem konnten aufgrund der Daten Überlegungen zur Identität der für einige EPY nicht auffindbaren genetischen Väter angestellt werden.

3.4.2.1 Anzahl der EPC-Partner eines Weibchens

In 47 der 56 Bruten (83,9%), für die mindestens ein EPM identifiziert wurde (s. Tab. 8), konnten alle EPY ihrem genetischen Vater zugeordnet werden. In den verbleibenden neun Bruten blieb in fünf Fällen der genetische Vater nur eines einzigen EPY unbekannt, d.h. für diese Bruten konnte ebenfalls die exakte Anzahl der in ihnen genetisch repräsentierten EPMS angegeben werden. Für die übrigen vier Bruten war dies nicht möglich, da die Identität des genetischen Vaters von jeweils mindestens zwei EPY nicht geklärt werden konnte. Abbildung 9 zeigt die Anzahl der nachgewiesenen EPC-Partner der Weibchen für die 52 Bruten, in denen sich die exakte Anzahl der EPMS ermitteln ließ, in Relation zur Anzahl der EPY, die insgesamt in den betreffenden Bruten vorhanden waren. In der Mehrzahl der Fälle (30 Bruten, s. Abb. 9) war nur ein EPY vorhanden und damit auch nur ein EPM in der betreffenden Brut repräsentiert. Aber auch in 14 der 22 Bruten mit mehr als einem EPY war ein einzelnes Männchen Vater der betreffenden Nestlinge (s. Abb. 9). In den verbleibenden 8 Bruten mit mehr als einem EPY waren siebenmal 2 EPMS und einmal 3 EPMS an der Vaterschaft beteiligt (s. Abb. 9).

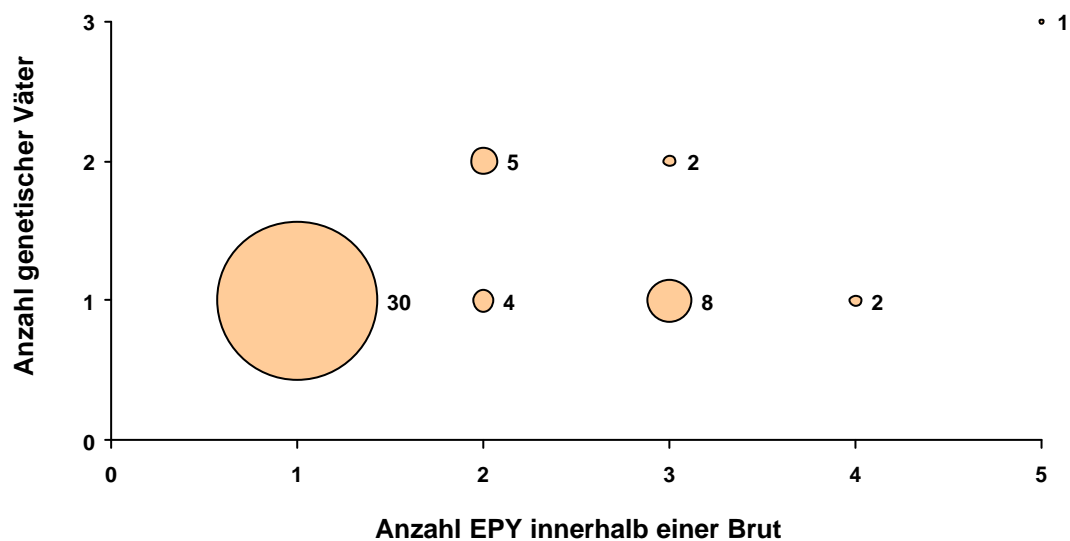


Abb. 9: Anzahl der genetischen Väter der EPY für Bruten mit unterschiedlicher Gesamtzahl an EPY (Daten der Jahre 1993 bis 1996 zusammengefasst). In die Abbildung gehen nur die 52 Bruten ein, für die eine exakte Angabe zur Zahl der extra-pair males (EPMS) möglich war (s.a. Text).

3.4.2.2 Reproduktionserfolg der Männchen

In bezug auf den Reproduktionserfolg der Männchen ist es unter anderem von Interesse festzustellen, wieviele EPY ein Männchen normalerweise in einer einzelnen Brut hinterläßt. Abbildung 10 faßt die diesbezüglichen Daten zusammen. Dabei wurden ausschließlich solche EPY berücksichtigt, deren genetischer Vater identifiziert werden konnte ($n = 95$). Männchen, die in aufeinanderfolgenden Jahren oder im selben Jahr als EPM an mehreren Brutten beteiligt waren, gingen mehrfach in den betreffenden Teil der Auswertung ein.

In 42 von 61 Fällen (68,9%) waren die EPMs nur durch ein einzelnes EPY innerhalb der betreffenden Brut repräsentiert (s. Abb. 10). In 30 dieser Brutten handelte es sich dabei um das jeweils einzige EPY der Brut (vgl. Abb. 9), in den anderen 12 Fällen waren noch weitere Jungtiere vorhanden, die das Produkt von Kopulationen außerhalb des Paarbundes mit anderen Männchen waren. Der Maximalwert für die Nachkommen eines EPM in einer einzelnen EPY-Brut lag bei 4 Nestlingen (s. Abb. 10). Betrachtet man die EPMs, die innerhalb desselben Jahres EPY in mehreren Brutten hatten, so liegen die aufsummierten Werte mit insgesamt 2-6 EPY entsprechend höher (s. Abb. 10).

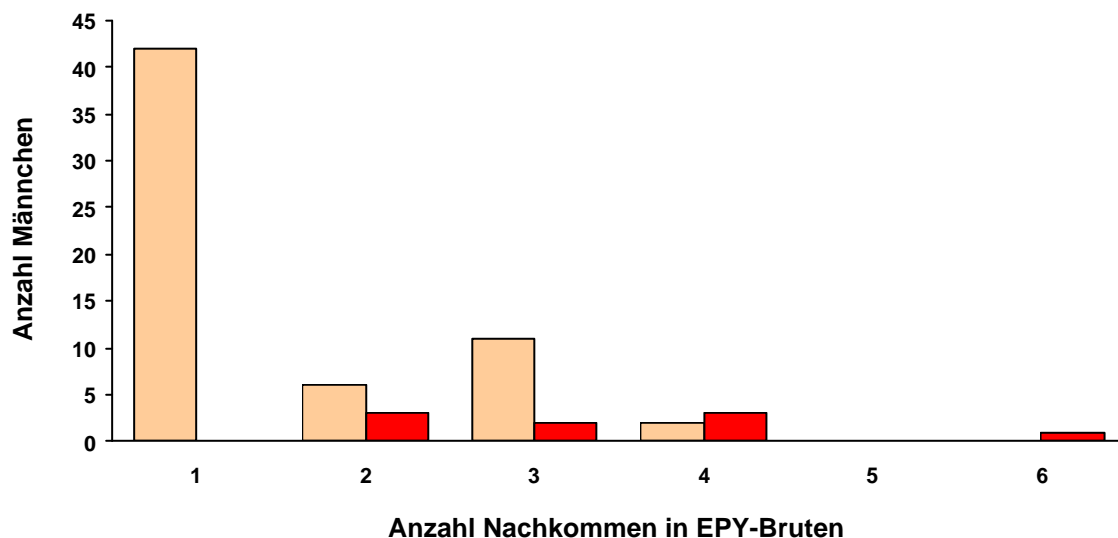


Abb. 10: Verteilung in bezug auf die Anzahl der Nachkommen, durch die einzelne extra-pairmales (EPMs) innerhalb einzelner EPY-Bruten repräsentiert waren (■), sowie in bezug auf die Summe der Nachkommen in EPY-Bruten von Männchen, die innerhalb eines Jahres genetischer Vater in mehreren EPY-Bruten waren (■, s.a. Text). Die Daten der Jahre 1993 bis 1996 wurden jeweils zusammengefaßt.

Bei Berechnungen zur Varianz im Fortpflanzungserfolg der Männchen (vgl. Tab. 9) muß man natürlich berücksichtigen, daß die EPMs unter Umständen auch Verluste durch EPY im eigenen Nest hinnehmen mußten. Die diesbezüglichen Analysen zeigten, daß es sehr häufig vorkam, daß ein Männchen, welches durch EPY in anderen Nestern repräsentiert war, selbst „betrogen“ wurde. Bei 42 der 45 Männchen, die als genetische Väter identifiziert werden konnten, lagen Elternschaftsnachweise für die eigenen Erstbruten vor. Von diesen 42 EPMs hatten 23 EPY im eigenen Nest (um die Verwendung abhängiger Daten zu vermeiden, ging für die vier Männchen, die in zwei aufeinanderfolgenden Jahren als EPMs identifiziert wurden, jeweils nur das erste Jahr in die Betrachtung ein), d.h. 54,8% dieser Männchen waren selbst von ihren Weibchen „betrogen“ worden (s. Abb. 11). Dieser Wert ist von daher erstaunlich, als daß diese Rate signifikant höher liegt, als die auf Basis der Gesamtpopulation für Erstbruten ermittelte Rate von 34,3% (s. Tab. 2 und Abb. 11, Binomialtest: $p = 0,004$). Eine mögliche Ursache hierfür könnte darin liegen, daß die EPMs durch ihre EPC-Aktivitäten das eigene Weibchen nur eingeschränkt bewachen können (s. Kap. 4). Trotz des anscheinend gegenüber der Gesamtpopulation erhöhten Risikos vom eigenen Weibchen „betrogen“ zu werden, gewannen EPMs im Mittel allerdings signifikant mehr Nachkommen durch EPY hinzu, als sie im eigenen Nest hinnehmen mußten (Wilcoxon-Test: $n = 42$, $p = 0,003$, s. Abb. 12), d.h. die EPMs konnten ihren Gesamtproduktionserfolg innerhalb der betreffenden Brutsaison durch Kopulationen außerhalb des Paarbundes erhöhen.

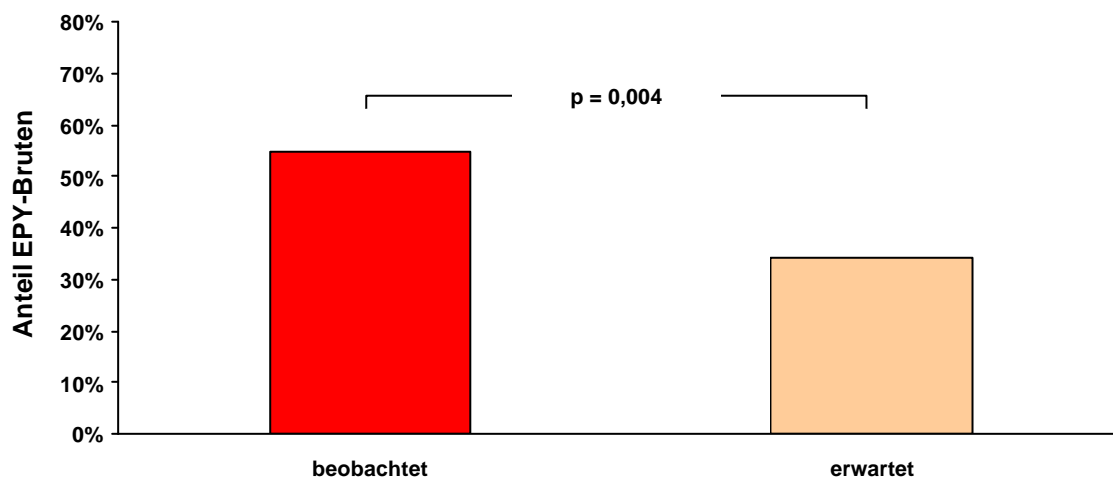


Abb. 11: Vergleich zwischen dem Anteil der EPY-Bruten an der Gesamtzahl der Bruten für Männchen, die als genetischer Vater in einer anderen Brut identifiziert wurden (beobachtet), und dem Erwartungswert, der sich durch den Anteil von EPY-Bruten in der Gesamtpopulation ergab (erwartet). Das angegebene Signifikanzniveau bezieht sich auf den entsprechenden Binomialtest.

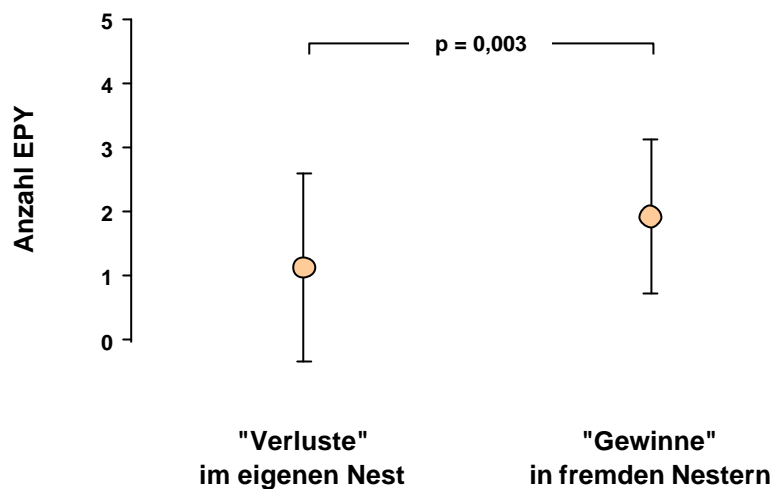


Abb. 12: Vergleich der Gewinne und Verluste durch EPY in bezug auf den Fortpflanzungserfolg der 42 Männchen, die als genetische Väter in anderen Brutten identifiziert wurden und für die gleichzeitig Befunde zum Auftreten von EPY in den eigenen Erstbruten vorlagen. Das angegebene Signifikanzniveau bezieht sich auf den entsprechenden Paarvergleich nach Wilcoxon.

Tab. 9: Veränderung in der Varianz des Reproduktionserfolges der Männchen durch das Auftreten von EPY (s.a. Text).

Reproduktions- erfolg (RE)	1993	1994	1995	1996	alle Jahre
Augenscheinlicher RE^a					
$\bar{x} \pm SD$:	7,5±1,9	6,9±2,3	9,0±2,1	7,0±1,7	7,4±2,1
min. - max.:	2-11	2-12	5-13	3-11	2-13
Varianz:	3,42	5,38	4,49	2,88	4,58
standardisierte Varianz^b:	0,06	0,11	0,06	0,06	0,08
Tatsächlicher RE^c					
$\bar{x} \pm SD$:	7,3±2,0	6,8±2,5	8,6±2,6	6,6±2,3	7,1±2,5
min. - max.:	2-11	2-12	0-13	0-15	0-15
Varianz:	4,15	6,19	6,97	5,14	6,14
standardisierte Varianz^b:	0,08	0,14	0,09	0,12	0,12
? Varianz^d	21,1%	15,0%	55,3%	78,1%	34,3%

^a Anzahl Nestlinge zum Zeitpunkt der Blutentnahme (ca. 10 d; vgl 2.1.3.4)

^b Varianz geteilt durch den quadrierten Mittelwert (s. Wade & Arnold 1980; vgl. Yezerinac et al. 1995, Möller 1998, Webster et al. 2001)

^c Augenscheinlicher Reproduktionserfolg, korrigiert um die bekannten Verluste (EPY im eigenen Nest) und Gewinne (EPY als EPM in anderen Nestern)

^d Prozentuale Erhöhung der Varianz im Reproduktionserfolg von Männchen durch das Auftreten von EPY

Die unter Berücksichtigung aller bekannten Gewinne und Verluste durch EPY erhaltenen Daten zur Gesamtvarianz im Fortpflanzungserfolg der Männchen sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Die Varianz im Fortpflanzungserfolg der Männchen erhöht sich in allen Untersuchungsjahren, wenn man die Werte für den augenscheinlichen Reproduktionserfolg (= Anzahl der Nestlinge zum Zeitpunkt der Blutentnahme, s.a. 2.1.3.4) mit den Werten für den tatsächlichen Fortpflanzungserfolg vergleicht (= augenscheinlicher Reproduktionserfolg, bereinigt um die bekannten Verluste und Gewinne an Nachkommen durch EPY). Faßt man die Daten aller Jahre zusammen, so erhöht sich durch das Auftreten von EPY die Varianz im Fortpflanzungserfolg der Männchen um 34,3% (zu den Werten für die Einzeljahre s. Tab. 9). Dieser Wert ist insofern von Interesse, als daß sich durch ihn abschätzen läßt, ob Kopulationen außerhalb des Paarbundes eine wichtige Komponente der sexuellen Selektion darstellen (s. Kap. 4).

3.4.2.3 Genetische Väter, die nicht identifiziert werden konnten

Wie weiter oben ausgeführt, konnte nicht für alle EPY der genetische Vater identifiziert werden. Wenn man darüber nachdenkt, um welche Männchen es sich bei den betreffenden Tieren gehandelt haben könnte, müssen zwei prinzipiell verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. Es könnte sich zum einen um Männchen gehandelt haben, die sich zwar in der Population aufhielten, aber ohne eigenes Revier und eigene Brut waren (sogenannte *Floater*, z.B. Kempnaers *et al.* 2001). Auf der anderen Seite ist es aber natürlich auch denkbar, daß es sich einfach um Männchen aus unbeprobten Brutansätzen handelte. Dabei kommen sowohl Männchen, die ihre Brut frühzeitig aufgegeben bzw. verloren haben oder nicht gefangen werden konnten, als auch Männchen von Brutpaaren, die in Naturhöhlen nisteten, in Betracht.

Die in Abbildung 13 dargestellten Daten zum Anteil der analysierten Männchen an der Gesamtpopulation und zum Anteil der EPY, für die der genetische Vater identifiziert werden konnte (s.a. Tab. 8), lassen die letztgenannte Erklärung wahrscheinlicher erscheinen. Wenn *Floater* bei der Reproduktion keine Rolle spielen, so sollten sich die Werte der beiden in Abbildung 13 dargestellten Variablen in etwa entsprechen, da mit zunehmendem Anteil beprobter Männchen auch der Anteil an EPY steigen sollte, für die der jeweilige genetische Vater ermittelt werden kann.

Zwar liegt der Anteil der beprobten Männchen, mit Ausnahme des Jahres 1993 (näheres hierzu s.u.), über dem jeweiligen Wert für den Anteil der EPY, deren Vater identifiziert wurde (s. Abb. 13). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die tatsächliche Populationsgröße durch nicht erfaßte Kohlmeisenbrutpaare in Naturhöhlen unterschätzt wird. Im Zentrum der Versuchsflächen ist die Zahl solcher Brutpaare wahrscheinlich eher gering, da Kohlmeisen künstliche Nistgelegenheiten gegenüber Naturhöhlen bevorzugen (s. Gibb 1950, 1954, Perrins 1979). Anders verhält es sich aber in den Randbereichen, da die angrenzenden Waldflächen nicht mit Nistkästen behängt waren, und deshalb dort mit einer Reihe weiterer Brutpaare in Naturhöhlen zu rechnen ist. Der Anteil der beprobten Männ-

chen an der tatsächlichen Gesamtpopulation liegt folglich insgesamt niedriger als in Tabelle 8 und Abbildung 13 für die in Nistkästen angesiedelten Kohlmeisenbrutpaare angegeben. Hinsichtlich der Darstellung in Abbildung 13 würden die realen Werte dazu führen, daß die jeweiligen Wertepaare für die Jahre 1994 bis 1996 weiter zusammenrücken und sich damit noch ähnlicher werden (zum Jahr 1993, s.u.). Die verbleibende Differenz wäre dann unter Umständen auf Vaterschaften von *Floatern* zurückzuführen. Da diese Differenz aus den genannten Gründen allerdings sehr klein ausfällt, kann eine massive Beteiligung von *Floatern* an der Reproduktion aller Wahrscheinlichkeit nach ausgeschlossen werden. Dies ist für die nachfolgenden Untersuchungen insofern von Bedeutung, als daß eine massive Reproduktionsbeteiligung von *Floatern* die Interpretation der in den folgenden Kapiteln dargestellten Ergebnisse (s. 3.5 und 3.6) erschweren würde.

Zu der dem Gesamtbild nicht entsprechenden Lage des Wertepaares für das Jahr 1993 (s. Abb. 13) ist anzumerken, daß die in der betreffenden Brutsaison gewonnenen Proben nicht zufällig über das gesamte Versuchsgebiet verteilt waren (s.a. 3.1.2). Vielmehr wurden bestimmte Teilareale besonders intensiv beprobt, d.h. in lokal begrenzten Arealen des Untersuchungsgebietes wurden teilweise deutlich mehr Männchen analysiert, als dies auf der Basis der Daten zur Gesamtpopulation den Anschein hat. Der sich durch die räumlich geklumpfte Beprobung im Vergleich zu den anderen Jahren ergebende Unterschied hinsichtlich der Lage des betreffenden Wertepaares könnte damit auch darauf hindeuten, daß Weibchen EPCs vornehmlich mit Männchen aus der näheren Umgebung eingehen (s.a. 3.5.1).

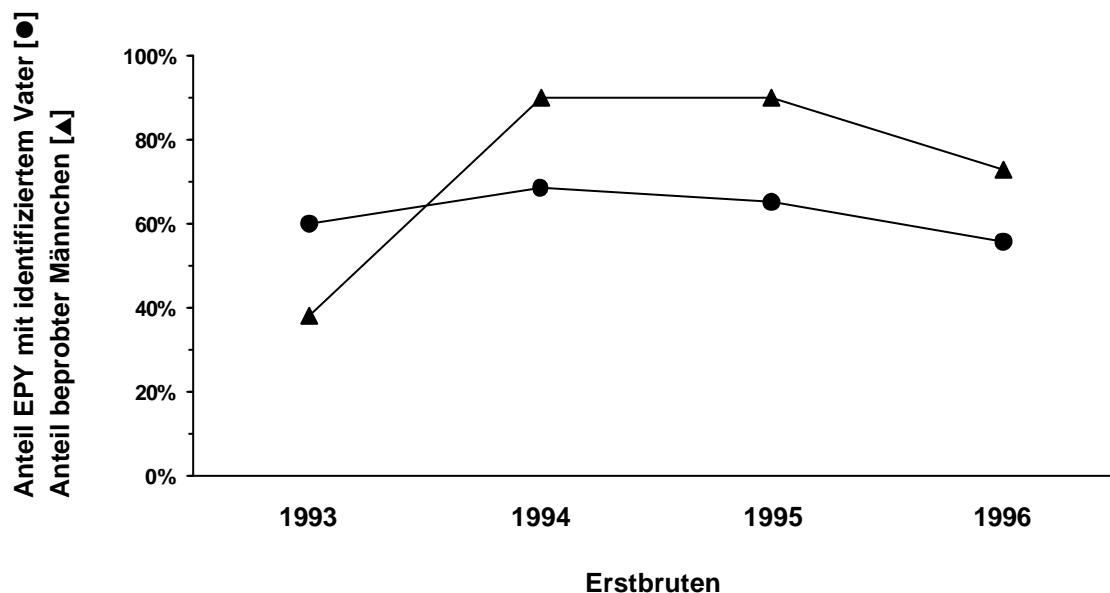


Abb. 13: Anteil der EPY, für die in den Jahren 1993 bis 1996 der genetische Vater identifiziert werden konnte (●), und Anteil der Männchen, die in bezug auf die Gesamtzahl der Brutansätze in der jeweiligen Brutsaison beprobt wurden und damit für die Suche nach den genetischen Vätern zur Verfügung standen (▲).

3.5 Einfluß proximatier Faktoren auf dem Individualniveau

Die in Kapitel 3.3 auf dem Populationsniveau durchgeführten Analysen zum möglichen Einfluß proximatier Faktoren auf die EPY-Raten ließen keinen derartigen Zusammenhang erkennen. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die betreffenden Analysen sich „nur“ auf vier Jahre stützten. Das Vorhandensein eines Einflusses der räumlichen und/oder zeitlichen Verfügbarkeit von Kopulationspartnern auf die EPY-Raten kann daher keinesfalls sicher ausgeschlossen werden. Zudem legen theoretische Erwägungen und frühere Untersuchungen nahe, daß limitierende Faktoren insbesondere lokal wirksam werden (vgl. Lubjuhn *et al.* 1999 a, 2001). Daher soll im folgenden auf dem Individualniveau untersucht werden, ob die räumliche und zeitliche Verfügbarkeit potentieller Kopulationspartner das Zustandekommen von EPCs beeinflusst. Die Basis für derartige Analysen lieferte die erfolgreiche Identifizierung der EPMs (s. 3.4.2).

3.5.1 Limitierungen durch die Entfernung zu potentiellen EPC-Partnern

Mit Hilfe der Daten zu den genetischen Vätern der EPY läßt sich eine Art „Aktionsradius“ für EPCs bestimmen. Geht man davon aus, daß die Weibchen EPCs initiieren und hierzu das eigene Revier verlassen (zur Richtigkeit dieser Annahme bei Kohlmeisen s. Strohbach *et al.* 1998), so stellt der Abstand vom Nistkasten eines Weibchens zum Nistkasten seines jeweiligen EPC-Partners ein gutes Maß für die Entfernung dar, die weibliche Kohlmeisen für Kopulationen außerhalb des Paarbundes zurücklegen. Vergleicht man die von Weibchen für EPCs tatsächlich zurückgelegten Distanzen mit denjenigen, die auf Basis der realen räumlichen Verteilung der Brutpaare per Zufall zu erwarten wären, so lassen sich daraus erste Schlüsse auf einen potentiellen Zusammenhang zwischen dieser räumlichen Komponente und dem EPC-Verhalten der Weibchen ziehen.

Um die entsprechenden Analysen durchführen zu können, wurden zunächst die Entfernungen zwischen den Weibchen und ihren EPC-Partnern ($n = 59^*$) ermittelt und die betreffenden Daten dann in 50 m-Klassen zusammengefaßt (s. Abb. 14). Anschließend wurde auf der Basis der realen räumlichen Verbreitung der Brutpaare in den Jahren 1993 bis 1996 die Verteilung berechnet, welche sich bei zufälliger, d.h. von der Entfernung unabhängiger, Wahl eines Männchens im Radius von 650 m ergeben würde (s. Abb. 14).

Die Analyse der erhaltenen Datensätze zeigte, daß sich die erwartete und beobachtete Verteilung statistisch signifikant voneinander unterschieden (KS-Test: $p < 0,001$, s.a. Abb. 14). In 79,7% aller Fälle (47 von 59) wurden Männchen als EPC-Partner gewählt, deren Nistkästen in einer Entfernung von bis zu 150 m lagen. Danach fällt die Zahl der nachgewiesenen Fälle drastisch ab (s. Abb. 14). Männchen, deren Bruthöhlen sich zwar innerhalb des für die Vatersuche veranschlagten Radius von 650 m befanden, aber weiter

* Insgesamt handelte es sich um 61 verschiedene Kombinationen von Weibchen und EPC-Partnern (vgl. 3.4.2). Da zwei genetische Väter allerdings nur über Blutproben aus der Zweitbrut ermittelt werden konnten und Angaben zum Brutort der betreffenden Erstbruten fehlten, reduzierte sich der zur Analyse zur Verfügung stehende Datensatz um diese beiden Fälle.

als 400 m von der Focushöhle entfernt lagen, konnten niemals als EPC-Partner nachgewiesen werden (s. Abb. 14). Damit ist gezeigt, daß Weibchen ihre EPC-Partner in bezug auf die Entfernung nicht zufällig aus der Grundpopulationen auswählen (zu möglichen Ursachen, s. Kap. 4).

Alle bisher dargestellten Befunde zu den identifizierten genetischen Vätern bezogen sich ausschließlich auf Erstbruten. Obwohl für Zweitbruten aufgrund der kleinen Stichprobe (s. 3.2.2) nur wenige EPMs ermittelt werden konnten, soll hier kurz auf die diesbezüglichen Daten eingegangen werden, da sie wegen der signifikant höheren EPY-Rate in Zweitbruten (s. 3.2.2) an dieser Stelle relevant erscheinen.

Für die EPY aus Zweitbruten konnten drei EPMs als genetische Väter identifiziert werden, die selber jeweils nur durch eine Erstbrut vertreten waren. In allen drei Fällen lag die Distanz zwischen dem Zweitbrut-Nistkasten des betreffenden Weibchens und dem Nistkasten der Erstbrut des jeweiligen genetischen Vaters zwischen 150 und 200 m. Damit lagen die Entfernungen in allen Fällen außerhalb des 150 m Radius, in dem sich 79,7% der genetischen Väter für die Erstbruten finden ließen (s.o.). Zwei der drei Zweitbrut-Weibchen hatten in ihrer Erstbrut keine EPY. Obwohl das dritte Weibchen in seiner Erstbrut ein EPY mit demselben EPM wie in der Zweitbrut hatte, lag die EPY-Rate in der Erstbrut deutlich niedriger (Erstbrut: 12,5% [1 von 8], Zweitbrut: 83,3% [5 von 6]).

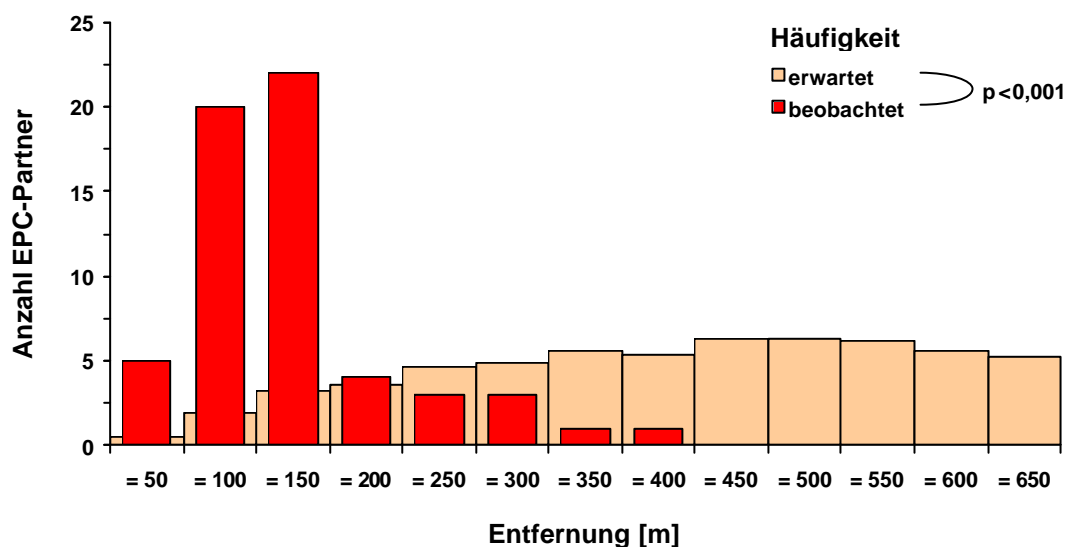


Abb. 14: Entfernungen (in 50 m-Klassen) zwischen den Nistkästen der Weibchen und den Bruthöhlen ihrer EPC-Partner (■) für die Jahre 1993 bis 1996 (die Verteilungen der einzelnen Jahre unterschieden sich diesbezüglich nicht voneinander; KS-Tests: p jeweils $\geq 0,28$). Im Hintergrund (□) ist die Verteilung dargestellt, welche sich bei einer zufälligen Wahl der EPC-Partner im Radius von 650 m auf Basis der realen räumlichen Verteilung der Bruten in den Jahren 1993 bis 1996 ergeben würde. Das angegebene Signifikanzniveau bezieht sich auf den Vergleich von beobachteter und erwarteter Verteilung mit Hilfe eines Kolmogorov-Smirnov-Tests (s.a. Text).

Die Befunde zu den Zweitbruten stehen trotz der größeren Entfernungen zwischen den Nistkästen (jeweils > 150 m) nicht in Widerspruch zu den Befunden für die Erstbruten: Da die identifizierten genetischen Väter keine eigene Zweitbrut hatten, waren sie zum betreffenden Zeitpunkt auch keinen Zwängen in bezug auf das eigene Brutgeschäft unterworfen, wie z.B. Partnerbewachung oder Revierverteidigung. Dies könnte dazu geführt haben, daß sie ihren Aktivitätsradius im Vergleich zur Erstbrut deutlich vergrößerten und sich damit während der Zweitbrutphase im EPC-Aktionsradius der betreffenden Weibchen befanden. Die größeren Entfernungen können deshalb unter Umständen auch als ein erster empirischer Hinweis für die Richtigkeit bestimmter Überlegungen zur Erklärung der höheren EPY-Raten in Zweitbruten gewertet werden. Der betreffende Erklärungsansatz (s. Lubjuhn *et al.* 2001) geht nämlich ebenfalls von einem Anstieg in der Verfügbarkeit potentieller Paarungspartner für Weibchen während der Zweitbrutphase aus, der durch Männchen ohne eigene Zweitbrut zustande kommt.

3.5.2 Limitierungen in bezug auf die Synchronität des Brutgeschäfts

Neben der räumlichen Distanz zu potentiellen EPC-Partnern könnte auch noch eine zeitliche Komponente relevant sein, die sich auf die Synchronität der Brutpaare bezieht. So könnten z.B. Männchen, die ihr eigenes Weibchen während der fertilen Phase bewachen müssen, nur eingeschränkt als Kopulationspartner für EPCs zur Verfügung stehen (vgl. 3.3).

Um den möglichen Einfluß des Faktors Brutsynchronität auf dem Individualniveau zu analysieren, wurde ähnlich vorgegangen, wie bei den Untersuchungen zum potentiellen Einfluß des Faktors Distanz. Als Maß für die Synchronität der betreffenden Bruten, also die Brut des Weibchen und die Brut des jeweiligen EPC-Partners, wurde die Differenz im Legebeginn herangezogen. Begann das Focusweibchen vor dem Weibchen des EPC-Partners mit der Eiablage, so wurde die Differenz als positiver Wert ausgedrückt, im umgekehrten Fall als negativer Wert. Die Verteilung der so für Weibchen und ihre EPC-Partner ermittelten Werte ($n = 59$, s.a. Fußnote in 3.5.1) wurde mit der Verteilung verglichen, die auf Basis der realen Legebeginndifferenzen der Jahre 1993 bis 1996, bei Wahl der EPC-Partner unabhängig von der Synchronität, zu erwarten gewesen wäre (s. Abb. 15). Die beiden Verteilungen unterschieden sich statistisch nicht voneinander (KS-Test: $p = 1,0$; s.a. Abb. 15). Weibchen bevorzugen als EPC-Partner also weder Männchen mit relativ synchronen Bruten (die beobachtete Verteilung der Legebeginndifferenzen hätte in diesem Fall stark geklumpt um eine Differenz von Null Tagen liegen müssen) noch Männchen mit relativ asynchronen Bruten (in diesem Fall hätten gehäuft große positive und/oder negative Legebeginndifferenzen auftreten müssen). Demnach läßt sich auch bei einer Analyse auf dem Individualniveau kein Hinweis für einen Einfluß der Brutsynchronität auf das Zustandekommen bzw. Nicht-Zustandekommen von EPCs finden (vgl. 3.3).

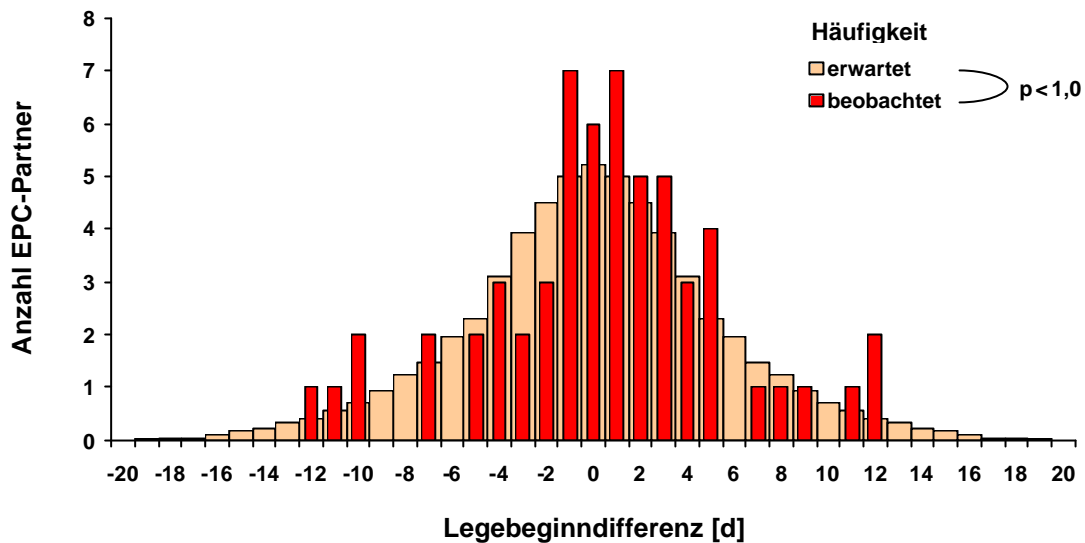


Abb. 15: Legebeginndifferenzen zwischen den EPC-Weibchen und den Weibchen ihrer EPC-Partner (■) für die Jahre 1993 bis 1996 (die Verteilungen der einzelnen Jahre unterschieden sich diesbezüglich nicht voneinander; KS-Tests: p jeweils $\geq 0,20$). Positive Differenzen stehen für die Fälle, in denen das Focusweibchen vor dem Weibchen des EPC-Partners mit der Eiablage begann, negative Werte entsprechend für die umgekehrte Situation. Im Hintergrund (□) ist die Verteilung dargestellt, welche sich bei einer zufälligen Wahl des EPC-Partners hinsichtlich der Legebeginndifferenz auf Basis der realen zeitlichen Verteilung der Bruten in den Jahren 1993 bis 1996 ergeben hätte. Das angegebene Signifikanzniveau bezieht sich auf den Vergleich von beobachteter und erwarteter Verteilung mit Hilfe eines Kolmogorov-Smirnov-Tests (s.a. Text).

3.5.3 Können proximate Faktoren das Nicht-Vorhandensein von EPY erklären?

Die in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Entfernung zu potentiellen Kopulationspartnern das Zustandekommen von EPCs beeinflusst (s. 3.5.1), die Synchronität der Brutpaare hingegen nicht (s. 3.5.2). Diese Resultate führen zu der Frage, inwieweit sich das Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein von EPY in den untersuchten Erstbruten unter Umständen generell durch die lokale Brutpaardichte erklären läßt.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden alle analysierten Erstbruten der Jahre 1993 bis 1996 einer von zwei Gruppen zugeordnet. Zum einen waren dies Bruten ohne benachbartes Brutpaar im Umkreis von 150 m, zum anderen Bruten mit einem oder mehreren Nachbarn innerhalb desselben Radius. Wenn Weibchen bezüglich des Zustandekommens von EPCs durch die hierfür zurückzulegende Entfernung limitiert sind (s. 3.5.1), so würde man in Bruten von Weibchen ohne Nachbarn im Umkreis von 150 m seltener EPY erwarten als in der anderen Gruppe. Abbildung 16 zeigt, daß der Unterschied im Anteil der Bruten, die EPY enthielten, numerisch tatsächlich in diese Richtung weist. Während sich für Weibchen ohne benachbartes Brutpaar im Umkreis von 150 m in nur 17% (1 von 6) der Bruten

EPY nachweisen ließen, waren es für Weibchen mit mindestens einem benachbarten Brutpaar 35% (79 von 227). Der Unterschied ist allerdings nicht signifikant (χ^2 -Test: $p = 0,67$). Dies könnte aber auch mit der kleinen Stichprobe für Weibchen ohne Nachbarn in einem Umkreis von 150 m zusammenhängen, da der Unterschied selbst dann nicht signifikant würde, wenn auch das einzige Weibchen mit EPY aus der Gruppe ohne Nachbarn keine EPCs eingegangen wäre (ein entsprechender χ^2 -Test ergäbe in diesem Fall $p = 0,10$).

Unabhängig von der Frage, ob Bruten von Weibchen ohne Nachbarn im Umkreis von 150 m seltener EPY enthalten als solche von Weibchen mit einem oder mehreren benachbarten Brutpaaren in diesem Radius, kann festgehalten werden, daß in der Bahrdorfer Kohlmeisen-Population für die Jahre 1993 bis 1996 nur insgesamt 6 von 233 Weibchen (2,6%) nach dem in Kapitel 3.5.1 festgelegten Entfernungskriterium limitiert waren (s.a. Abb. 16). Dies bedeutet, daß das Nicht-Vorhandensein von EPY in Kohlmeisen-Erstbruten nur in seltenen Ausnahmefällen durch das Fehlen von potentiellen EPC-Partnern erklärt werden kann. Für die Varianz in bezug auf das Vorhandensein von EPY müssen folglich in den allermeisten Fällen andere Erklärungsansätze gefunden werden. Da die bis zu diesem Punkt der Arbeit erzielten Ergebnisse nahelegen, daß fast alle Weibchen die Möglichkeit zu EPCs hatten, setzt sich das folgende Kapitel konsequenterweise mit Erklärungsansätzen auseinander, die mögliche ultimate Einflußgrößen in das Zentrum der Betrachtung stellen.

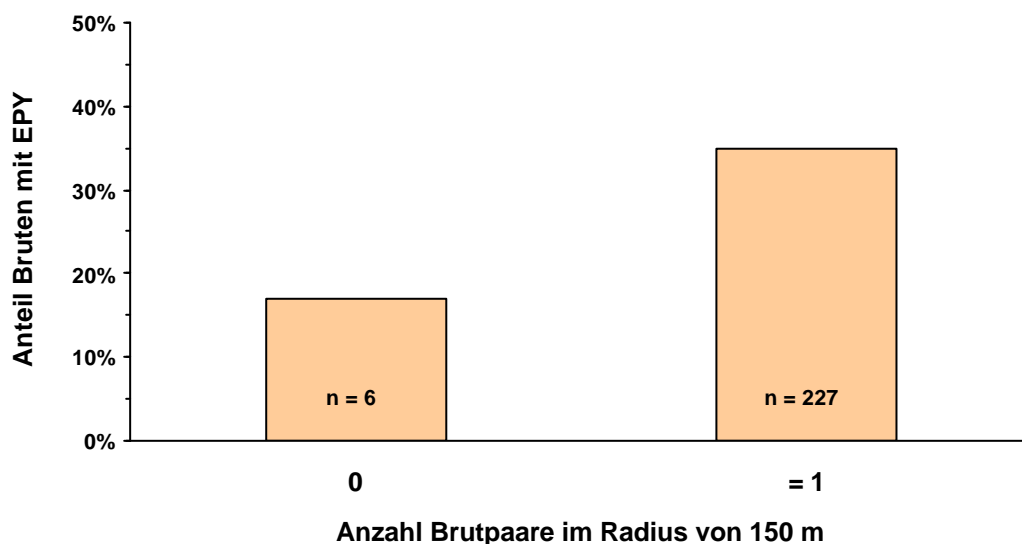


Abb. 16: Vergleich des Anteils der Bruten, die EPY enthielten, für Weibchen ohne benachbartes Brutpaar und Weibchen mit mindestens einem benachbarten Brutpaar im Umkreis von 150 m.

3.6 Einfluß ultimativer Faktoren auf das Auftreten von EPY

Die bisher dargestellten Ergebnisse machen deutlich, daß proximate Faktoren – im vorliegenden Fall die Entfernung zu potentiellen EPC-Partnern – das Zustandekommen von Kopulationen außerhalb des Paarbundes mit beeinflussen können (s. 3.5.1). Der Einfluß dieser Variable kann allerdings in den meisten Fällen nicht erklären, warum bestimmte Weibchen EPCs eingehen, andere hingegen nicht, da bei fast allen Weibchen mindestens ein benachbartes Brutpaar im EPC-Aktionsradius vorhanden war (s. 3.5.3). Das folgenden Kapitel setzt sich daher mit weiteren Erklärungsansätzen zur Varianz im Verhalten der Weibchen bezüglich des Auftretens von EPY auseinander. Sie beziehen sich auf mögliche ultimative Einflußgrößen, die in der Literatur im Zusammenhang mit dem Auftreten von EPCs diskutiert werden.

Zum möglichen Nutzen von Kopulationen außerhalb des Paarbundes für Weibchen werden verschiedene Modelle diskutiert (s. Übersichten in: Westneat *et al.* 1990, Birkhead & Møller 1992, Kempnaers & Dhondt 1993). Die folgenden Analysen konzentrieren sich auf zwei dieser Hypothesen (auf weitere Hypothesen wird in der Diskussion eingegangen, s. Kap. 4). Beide Hypothesen postulieren einen indirekten Nutzen von EPCs für die Weibchen, der auf eine Verbesserung der genetischen Qualität der Nachkommen abzielt:

- (i) *„Gute Gene“-Hypothese:* Weibchen gehen Kopulationen außerhalb des Paarbundes mit solchen Männchen ein, deren genetische Qualität (in Form erblicher, phänotypischer Qualität bezogen auf Umwelt-Interaktionen oder Attraktivität bei der Partnerwahl) diejenige des Paarpartners übertrifft (Kempnaers & Dhondt 1993, Møller 1994, Petrie 1994, Hallelquist *et al.* 1996, Kempnaers *et al.* 1997, 1999, Saino *et al.* 1997, Sheldon *et al.* 1997). Dieser Hypothese zufolge sind die genetischen Qualitäten der einzelnen Männchen relativ zueinander zu bewerten. Sie stehen aber untereinander für jedes Weibchen in derselben klaren hierarchischen Beziehung.
- (ii) *Kompatibilitäts-Hypothese:* Weibchen gehen dann Kopulationen außerhalb des Paarbundes ein, wenn die genetische Qualität (s.o.) der Nachkommen durch den Synergismus beider Genome diejenige von Nachkommen aus Kopulationen mit dem Paarpartner übertrifft (Kempnaers & Dhondt 1993, Kempnaers *et al.* 1999, Zeh & Zeh 1996, 1997). Dieser Hypothese zufolge würde die genetische Qualität zweier Männchen nicht für alle Weibchen in derselben hierarchischen Beziehung zueinander stehen. Stattdessen wäre sie von dem Genom des jeweiligen Weibchens abhängig und damit unter Umständen für verschiedene Weibchen unterschiedlich.

Aus beiden Hypothesen lassen sich spezifische Vorhersagen ableiten, die auf Basis der vorliegenden Daten geprüft werden können. Ein Teil dieser Vorhersagen sollte bei Zutreffen beider Hypothesen erfüllt sein und grenzt sie somit „nur“ gegen die Nullhypothese ab, die besagt, daß kein indirekter Nutzen durch eine Erhöhung der genetischen Qualität der Nachkommen vorhanden ist (s. 3.6.1 und 3.6.4). Andere Vorhersagen unterscheiden sich allerdings unter den von beiden Hypothesen gemachten Annahmen und erlauben somit zwischen ihnen zu differenzieren (s. 3.6.2 und 3.6.3).

3.6.1 Einfluß vermehrter EPC-Möglichkeiten auf die EPY-Rate

Abhängig von der Wahrscheinlichkeit innerhalb des EPC-Aktionsradius eines Weibchens (150 m, vgl. 3.5.1) ein geeignetes Männchen für Kopulationen außerhalb des Paarbundes anzutreffen, läßt sich in bezug auf die EPC-Rate eine spezifische Erwartung formulieren. Sowohl unter den Annahmen der „Gute Gene“-Hypothese als auch unter den Annahmen der Kompatibilitäts-Hypothese wäre zu erwarten, daß die Wahrscheinlichkeit ein genetisch hochwertigeres bzw. kompatibleres Männchen zu finden mit der Anzahl potentieller EPC-Partner im EPC-Aktionsradius steigt. Dementsprechend sollten Kopulationen außerhalb des Paarbundes bei Weibchen mit nur einem benachbarten Brutpaar im Umkreis von 150 m seltener nachzuweisen sein als bei Weibchen mit zwei oder mehr Brutpaaren innerhalb dieses Radius.

Um diese Vorhersage zu prüfen, wurden die Weibchen der analysierten Erstbruten von 1993 bis 1996 – wie schon in Kapitel 3.5.3 – in zwei Gruppen aufgeteilt. Dabei wurde zwischen Weibchen mit genau einem weiteren Brutpaar im EPC-Aktionsradius von 150 m und Weibchen mit zwei oder mehr potentiellen EPC-Partnern unterschieden. Weibchen ohne benachbartes Brutpaar im betreffenden Radius wurden von der Analyse ausgeschlossen, da eine Limitierung allein durch die Entfernung zu potentiellen Paarpartnern nicht auszuschließen ist (s. 3.5.3). Als Maß für die EPY-Rate wurde wieder der Anteil an EPY-Bruten an der Gesamtzahl untersuchter Bruten in beiden Gruppen gewählt (s. Abb. 17). Mit 38% (73 von 190) fanden sich bei Weibchen mit mindestens zwei benachbarten Brutpaaren im Umkreis von 150 m signifikant mehr Bruten mit EPY als mit nur 16% (6 von 37) bei Weibchen mit einem einzigen potentiellen EPC-Partner innerhalb des betreffenden Radius (χ^2 -Test: $p = 0,009$; s. Abb. 17).

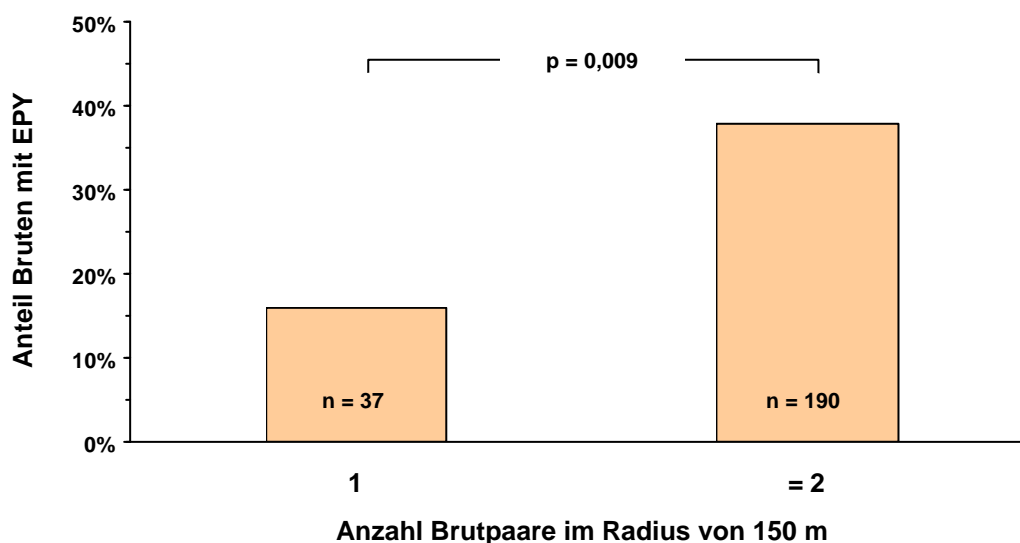


Abb. 17: Vergleich des Anteils der Bruten, die EPY enthielten, für Weibchen mit genau einem benachbarten Brutpaar und Weibchen mit zwei oder mehr benachbarten Brutpaaren im Umkreis von 150 m. Das angegebene Signifikanzniveau bezieht sich auf den entsprechenden χ^2 -Test.

Dieses Ergebnis ist – wie eingangs bereits erwähnt – mit beiden Hypothesen zum indirekten Nutzen von EPCs für Weibchen vereinbar. Bei einigen anderen Hypothesen zum adaptiven Wert von EPCs für Weibchen wäre ein solcher Unterschied hingegen nicht zu erwarten (s. Kap. 4). Unabhängig von seiner Bedeutung hinsichtlich der Diskussion um einen möglichen Nutzen von EPCs für Weibchen macht der Befund noch einmal deutlich, daß der Radius von 150 m für die Weibchen tatsächlich relevant zu sein scheint (s.a. Kap. 4).

3.6.2 Reziproker „Betrug“

Wird ein Männchen als EPC-Partner gewählt, dessen Weibchen ihn selbst mit dem Paarpartner der betreffenden EPC-Partnerin „betrogen“ hat, so spricht man von reziprokem „Betrug“. Auf der Basis der „Gute Gene“-Hypothese, die davon ausgeht, daß die genetische Qualität der einzelnen Männchen in einer für alle Weibchen gleichen, hierarchischen Beziehung zueinander steht, ist das Auftreten von reziprokem „Betrug“ allenfalls in Ausnahmefällen zu erwarten. Den Annahmen der Kompatibilitäts-Hypothese würden derart zirkuläre Zusammenhänge hingegen nicht widersprechen. Hier kann die genetische Qualität des potentiellen EPC-Partners nicht isoliert betrachtet werden, da die Kompatibilität mit dem Genom des Weibchens ausschlaggebend ist. Für jedes Weibchen könnte also ein jeweils anderes Männchen die optimalen genetischen Voraussetzungen zur Verbesserung der genetischen Qualität der Nachkommen besitzen, was dann auch reziproken „Betrug“ zur Folge haben könnte.

Auf Grundlage der Daten zu den identifizierten genetischen Vätern der EPY ($n = 61$, vgl. 3.4.2) ließ sich die Frequenz reziproken „Betrugs“ feststellen. Die betreffenden Analysen zeigten, daß er keinesfalls eine Ausnahmeerscheinung darstellt, da 16,4% der Männchen (10 von 61) in reziproken „Betrug“ verwickelt waren (s. Abb. 18, Fall A). Die Frequenz erhöht sich noch, wenn man einen Spezialfall von reziprokem „Betrug“ mit einbezieht, für den ebenfalls die eingangs geschilderten Erwartungen zutreffen. Anders als beim reziproken „Betrug“ im engeren Sinne (s.o.) waren in diesem Fall drei Brutpaare beteiligt (im folgenden als A, B und C bezeichnet). Weibchen A hatte Nachkommen mit Männchen B, Weibchen B mit Männchen C und Weibchen C wiederum mit Männchen A (vgl. Abb. 18, Fall B). Auch dieser Fall widerspricht klar der Annahme, daß die genetische Qualität der Männchen in einer für alle Weibchen identischen, hierarchischen Struktur zueinander steht. Integriert man diesen Fall in die Auswertung, so waren insgesamt 21,3% der Männchen (13 von 61) in reziproken „Betrug“ verwickelt. Die Ergebnisse sprechen damit gegen ein Zutreffen der „Gute Gene“-Hypothese. Mit den Annahmen der Kompatibilitäts-Hypothese sind sie vereinbar.

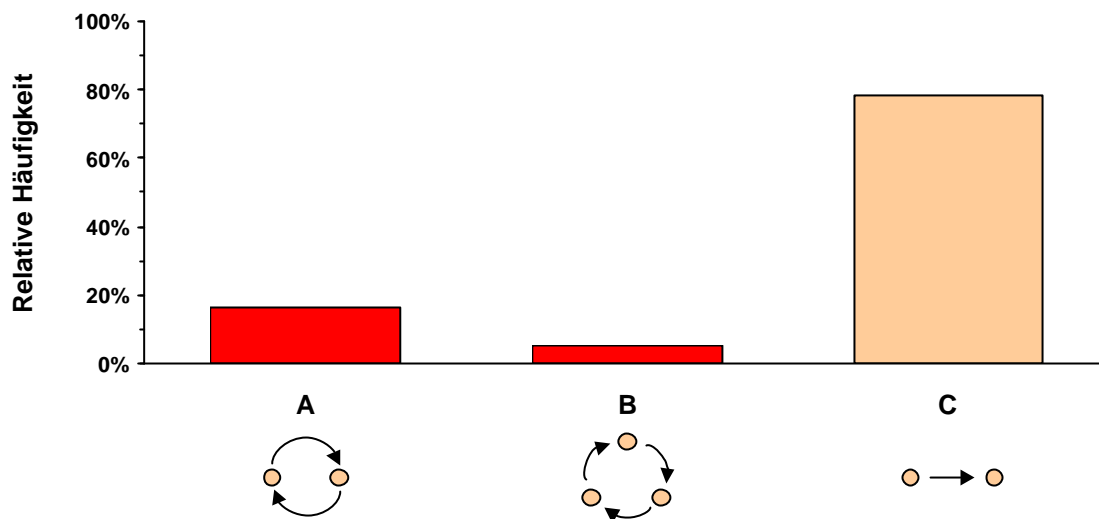


Abb. 18: Relative Häufigkeit des Auftretens von reziprokem „Betrug“, ermittelt auf Basis der Daten zu den identifizierten genetischen Vätern der EPY. **A** und **B** fassen die Fälle zusammen, bei denen Männchen in reziproken „Betrug“ verwickelt waren (weitere Erläuterungen, s. Text); **C** gibt die Frequenz der Männchen an, für die anhand der molekulargenetischen Untersuchungen keine Verwicklung in reziproken „Betrug“ nachgewiesen werden konnte.

3.6.3 Überleben der Männchen

Auch in bezug auf das Überleben der Männchen lassen sich aus den beiden Hypothesen unterschiedliche Vorhersagen ableiten. Als Maß für die Überlebensraten der Männchen wurde bei der Überprüfung dieser Vorhersagen jeweils die Wiederfangrate herangezogen. Dieser Wert sollte aufgrund der ausgeprägten Brutortstreue adulter Kohlmeisen (Glutz von Blotzheim & Bauer 1993) mit den tatsächlichen Überlebensraten nahezu identisch sein. Bei der Ermittlung der Wiederfangraten wurden jeweils die beiden folgenden Brutjahre berücksichtigt (entsprechende Aufzeichnungen lagen auch für die Brutsaison 1997 und 1998 vor). Wegen der weiter unten aufgeführten Gründe wurden in bezug auf das Überleben der Männchen zwei unterschiedliche Vergleiche durchgeführt: Zum einen wurde das Überleben von „betrogenen“ und nicht „betrogenen“ Männchen miteinander verglichen, zum anderen das Überleben der sozialen und genetischen Väter der EPY.

Überleben „betrogener“ und nicht „betrogener“ Männchen

Folgt man der „Gute Gene“-Hypothese, so sind Männchen, die von ihrer Paarpartnerin „betrogen“ werden, von geringerer genetischer Qualität als Männchen, die nicht „betrogen“ werden. Erstere sollten daher seltener bis ins nächste Jahr überleben als letztere (vgl. Kempnaers *et al.* 1992, 1997). Unter den Annahmen der Kompatibilitäts-Hypothese wäre ein solcher Unterschied hingegen nicht zu erwarten, da die genetische Qualität hier einzig die Kompatibilität zum Genom des Weibchens widerspiegelt und keine Aussagen über die absolute Qualität der Männchen zulässt.

Entgegen der Vorhersage, die aus der „Gute Gene“-Hypothese abgeleitet wurde, ließ sich in keiner Brutsaison ein signifikanter Unterschied im Überleben von „betrogenen“ und nicht „betrogenen“ Männchen feststellen (χ^2 -Tests: p jeweils $\geq 0,23$; s. Abb. 19; der jeweilige Stichprobenumfang ergibt sich aus den in Tab. 2 für Erstbruten angegebenen Werten). Auch nach Zusammenfassen der Daten aller Jahre zeigte sich kein Unterschied zwischen den Überlebensraten beider Männchengruppen (nicht „betrogen“ Männchen: 49 von 153, „betrogen“ Männchen: 26 von 80; χ^2 -Test: $p = 0,94$).

Die Ergebnisse widersprechen damit der aus der „Gute Gene“-Hypothese abgeleiteten Vorhersage. Es muß hier allerdings eine Einschränkung gemacht werden: Die Analysen zum Auftreten von EPY in Zweitbruten (s. 3.2.2) machen deutlich, daß die Zuordnung der Männchen zu den Gruppen „betrogen“ bzw. nicht „betrogen“ Männchen aufgrund des teilweise inkonsistenten Verhaltens auf Seiten der Weibchen problematisch sein kann. So wird bei den oben für die Erstbruten durchgeführten Analysen ein Teil der Männchen, die während der Zweitbrut „betrogen“ wurden, in die Gruppe nicht „betrogen“ Männchen eingeordnet (vgl. 3.2.2, Abb. 4). Frühere Untersuchungen zeigen zudem, daß sich Weibchen hinsichtlich des Auftretens von EPCs auch in aufeinanderfolgenden Jahren unterschiedlich verhalten können, obwohl sie mit demselben Männchen verpaart sind (s. Lubjuhn *et al.* 1999 a). Die aus diesen Gründen bei der Zuordnung der Männchen in die jeweilige Gruppe resultierende Unschärfe der Datensätze könnte einen im Sinne der „Gute Gene“-Hypothese vorhandenen Unterschied verwischen. Durch die Identifizierung der genetischen Väter (s. 3.4.2) lassen sich die genannten Schwierigkeiten allerdings umgehen (s.u.).

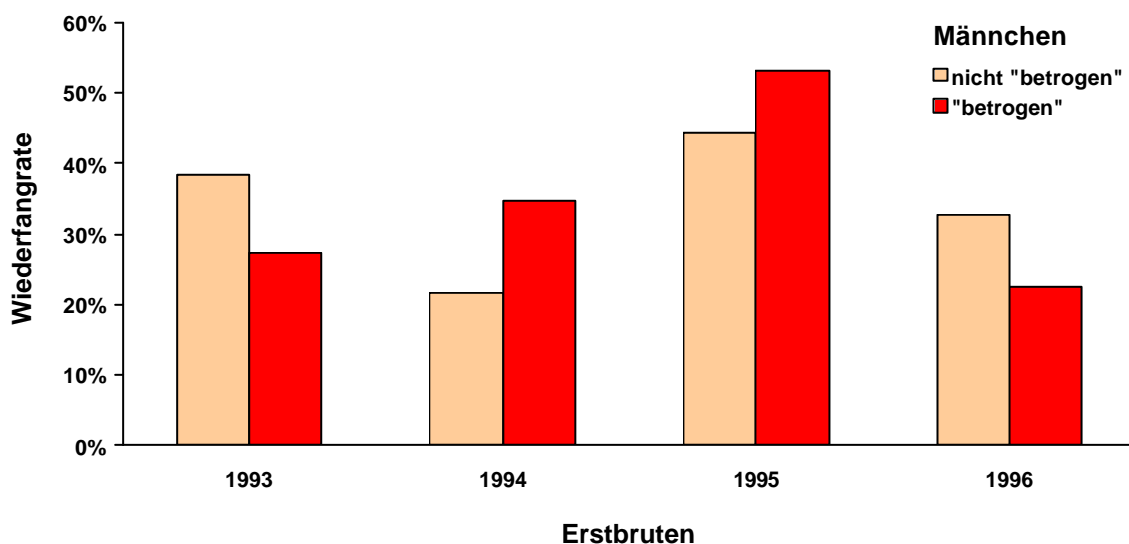


Abb. 19: Wiederfangraten für die in den einzelnen Untersuchungsjahren „betrogenen“ und nicht „betrogenen“ Männchen (s.a. Text).

Überleben sozialer und genetischer Väter von EPY

Für einen paarweisen Vergleich der Überlebensraten von sozialen und genetischen Vätern gelten die oben genannten Einwände nicht, da der „Gute Gene“-Hypothese zufolge der tatsächliche Vater eines EPY immer eine höhere genetische Qualität aufweisen sollte als der soziale Vater. Auf der Basis der „Gute Gene“-Hypothese wäre also zu erwarten, daß die genetischen Väter von EPY häufiger ins nächste Jahr überleben als die jeweiligen sozialen Väter. Unter den Annahmen der Kompatibilitäts-Hypothese gilt dies aus den oben genannten Gründen nicht.

Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, wurden alle Paare von sozialen und genetischen Vätern ($n = 61$) auf das Überleben der einzelnen Männchen hin überprüft. Abbildung 20 zeigt die betreffenden Resultate. Für die statistische Auswertung relevant sind dabei die Fälle, in denen nur eines der beiden Männchen überlebte (s. dunkle Balken in Abb. 20). Der entsprechende Test zeigte, daß diesbezüglich kein Unterschied zwischen genetischen und sozialen Vätern besteht (Vorzeichen-Test: $p = 0,44$).

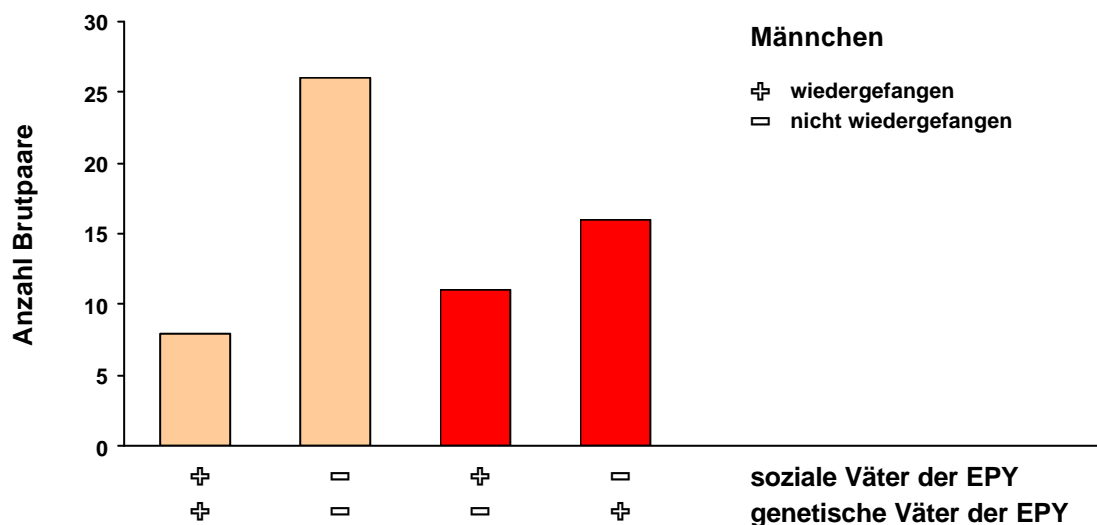


Abb. 20: Paarweiser Vergleich zum Überleben der sozialen und genetischen Väter der EPY. Die hellgrauen Balken (□) repräsentieren Fälle, in denen entweder beide ($n = 8$) oder keines der beiden Männchen ($n = 26$) wiedergefangen werden konnte. Die dunkelgrauen Balken (■) stehen hingegen für die Fälle, in denen entweder nur der soziale ($n = 11$) oder nur der genetische Vater ($n = 16$) nachweislich überlebte.

Fazit

Der nach der „Gute Gene“-Hypothese zu erwartende Unterschied im Überleben verschiedener Gruppen von Männchen (vgl. Kempnaers *et al.* 1992, 1997) konnte nicht nachgewiesen werden. Dies gilt sowohl für den Vergleich der Überlebensraten „betrogener“ und nicht „betrogener“ Männchen als auch für den Vergleich der Überlebensraten sozialer und genetischer Väter. Die Daten zum Überleben der Männchen sprechen somit ebenfalls gegen ein Zutreffen der „Gute Gene“-Hypothese. Den Annahmen der Kompatibilitäts-Hypothese widersprechen die Ergebnisse hingegen nicht.

3.6.4 Überleben und Reproduktionserfolg der Nachkommen

Die bisher dargestellten Ergebnisse lassen ein Zutreffen der „Gute Gene“-Hypothese unwahrscheinlich erscheinen. Mit der Kompatibilitäts-Hypothese sind die erzielten Befunde hingegen vereinbar. Da die in den vorangegangenen beiden Kapiteln geprüften Vorhersagen aber jeweils nur bei Zutreffen der „Gute Gene“-Hypothese hätten erfüllt sein sollen, sind die Resultate selbstverständlich nicht gleichbedeutend mit einer Verifizierung der Kompatibilitäts-Hypothese. Daher soll abschließend einer Vorhersage nachgegangen werden, die sich aus beiden Hypothesen ableiten läßt und die somit auch eine Verifizierung oder Falsifizierung der Kompatibilitäts-Hypothese erlaubt. Die betreffende Vorhersage bezieht sich auf das Überleben und den Reproduktionserfolg der Nachkommen. Sowohl die „Gute Gene“-Hypothese als auch die Kompatibilitäts-Hypothese gehen von einem indirekten Nutzen von EPCs für Weibchen in Form einer Steigerung der genetischen Qualität der betreffenden Nachkommen im Vergleich zu ihren Halbgeschwistern aus (s. Definitionen in 3.6). Um evolutionsbiologisch relevant zu sein, muß sich dieser Nutzen, d.h. die höhere genetische Qualität der EPY, entweder in einem besseren Überleben oder in einem höheren Reproduktionserfolg der betreffenden Nachkommen niederschlagen.

Überleben der Nachkommen

Als Maß für die Überlebensraten der Nachkommen wurden, wie schon im vorangegangenen Kapitel (s. 3.6.3), die Wiederfangraten der individuell markierten Tiere in den folgenden zwei Jahren herangezogen. Die Analyse erfolgte über einen paarweisen Vergleich des Überlebens beider Halbgeschwister-Gruppen innerhalb der EPY-Bruten.

Insgesamt konnten 27 Jungtiere aus 15 EPY-Bruten wiedergefangen werden. In 9 Bruten überlebte jeweils nur ein einziger Nestling, für die übrigen sechs Bruten konnten bis zu sechs Jungvögel einer Brut wiedergefangen werden (3 x 2, 2 x 3 und 1 x 6 Nestlinge). Dreimal überlebten aus einer einzelnen Brut sowohl ein Teil der EPY als auch ein Teil ihrer Halbgeschwister. In diesen Fällen wurde für den nachfolgenden Paarvergleich der jeweilige Anteil der überlebenden Nestlinge an der betreffenden Halbgeschwistergruppe im Nest berechnet und miteinander verglichen. Die anschließende Analyse der Daten hinsichtlich der Frage, ob die EPY besser überleben als ihre Halbgeschwister, erbrachte keinen signifikanten Unterschied (Vorzeichen-Test: $p = 0,12$; s.a. Abb. 21). Entgegen der ein-

gangs abgeleiteten Vorhersage war es sogar so, daß Fälle, in denen die Nicht-EPY aus EPY-Bruten besser überlebten als ihre Halbgeschwister, deutlich häufiger vorkamen ($n = 11$) als der umgekehrte Fall ($n = 4$, s. Abb. 21). Der von beiden Hypothesen postulierte indirekte Nutzen von EPY bezogen auf ihre genetische Qualität in Form eines besseren Überlebens konnte also nicht nachgewiesen werden.

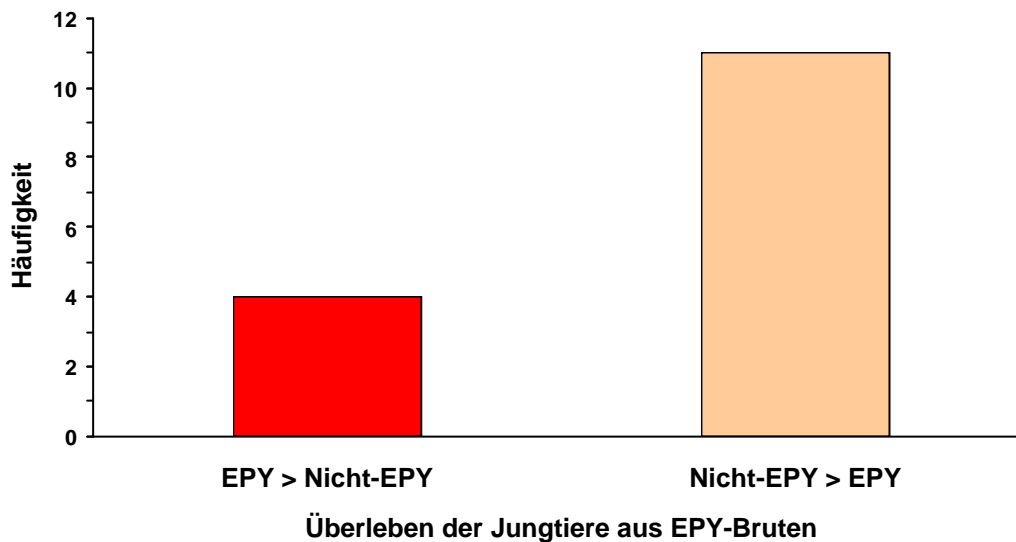


Abb. 21: Vergleich des Überlebens von EPY und Nicht-EPY aus denselben EPY-Bruten auf Basis der Wiederfangraten (s.a. Text). Unterschieden wird dabei zwischen Fällen, in denen die EPY prozentual besser überlebten als ihre Halbgeschwister (EPY > Nicht-EPY ■), und dem umgekehrten Sachverhalt (Nicht-EPY > EPY ■).

Reproduktionserfolg der überlebenden Nestlinge

Aus evolutionsbiologischer Sicht könnte sich ein indirekter Nutzen von EPCs auch in einem erhöhten Reproduktionserfolg der EPY niederschlagen. Da ein paarweiser Vergleich in diesem Fall nicht möglich war, da nur in drei Fällen Nestlinge beider Halbgeschwistergruppen aus derselben Brut überlebten (s.o.), mußte auf einen Gruppenvergleich ausgewichen werden. Als Maß für den Reproduktionserfolg der Nestlinge wurde dabei die Anzahl der Nachkommen im ersten nachweislichen Brutjahr herangezogen. Handelte es sich bei den überlebenden Jungtieren um ein Weibchen, ging die Gesamtzahl der analysierten Erstbrut-Nestlinge in die Auswertung ein. Für Männchen wurde die Anzahl der Nestlinge um die in der betreffenden Erstbrut enthaltenen EPY nach unten korrigiert. Für die wiedergefangenen EPY betrug der so ermittelte Wert durchschnittlich $5,8 \pm 2,5$ Jungtiere ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 5$), für ihre Halbgeschwister $7,1 \pm 2,0$ Jungtiere ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 21^*$; s. Abb. 22). Die Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander (U-Test: $p = 0,19$) und lagen nume-

* Für die Brut eines überlebenden männlichen Nestlings lagen keine Elternschaftsnachweise vor. Er wurde daher von der betreffenden Analyse ausgeschlossen.

risch wieder entgegengesetzt zu dem, was man bei einer höheren genetischen Qualität der EPY erwarten würde (s. Abb. 22). Ein indirekter Nutzen von EPCs läßt sich also auch in bezug auf den Reproduktionserfolg nicht nachweisen.

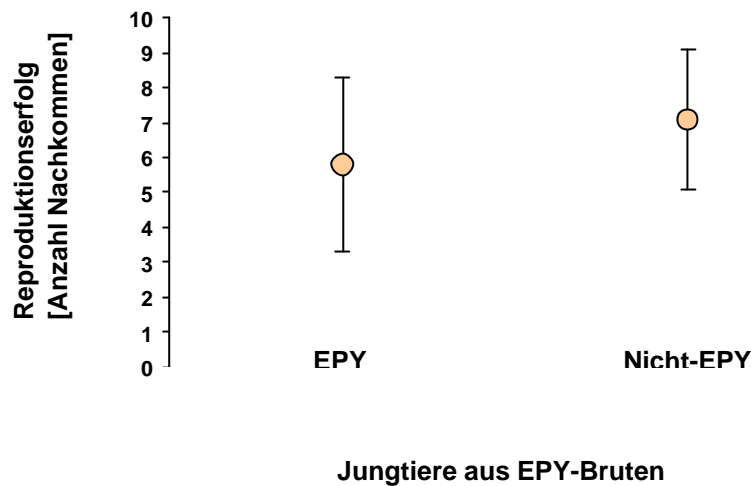


Abb. 22: Reproduktionserfolg der als Brutvogel nachgewiesenen Jungtiere aus EPY-Bruten getrennt für EPY und ihre Halbgeschwister (= Nicht-EPY).

Fazit

Weder in bezug auf das Überleben noch in bezug auf den Reproduktionserfolg konnten Unterschiede zwischen EPY und ihren Halbgeschwistern festgestellt werden. Dies spricht gegen einen indirekten Nutzen von EPCs für Weibchen. Zwar ist die Stichprobe für die Analysen trotz des an sich umfangreichen Datenmaterials aufgrund der hohen Nestlingsmortalität vergleichsweise klein. Es wären jedoch auch bei einer größeren Stichprobe keine anderen Resultate zu erwarten, da die numerischen Unterschiede in beiden Fällen in eine, den Vorhersagen der „Gute Gene“- und der Kompatibilitäts-Hypothese entgegengesetzte Richtung weisen. Die Analysen zum Überleben und zum Reproduktionserfolg der Nestlinge lassen damit begründete Zweifel am Zutreffen beider Hypothesen aufkommen, deren Bedeutung für weitere Untersuchung zum Fortpflanzungsverhalten von Vögeln an anderer Stelle erörtert wird (s. Kap. 4).

4 Diskussion

Multilocus DNA-Fingerprint Untersuchungen

Eine Vielzahl von Studien an verschiedenen Vogelarten konnte belegen, daß die Methode des Multilocus DNA-Fingerprinting sichere Abstammungsbegutachtungen bei Vögeln erlaubt (Übersicht z.B. in Westneat & Sherman 1997). Dies gilt auch für die in der vorliegenden Untersuchung an Kohlmeisen (*Parus major*) verwendete Restriktionsenzym/Oligonukleotidsonden-Kombination *Hae* III/(CA)₈. Sie wurde bereits in früheren Untersuchungen eingesetzt und liefert Bandenmuster von hinreichender individueller Variabilität und Informativität, um zweifelsfreie Elternschaftbestimmungen bei Kohlmeisen durchzuführen (vgl. Lubjuhn *et al.* 1993, 1996, 1999 a, 2001, Lubjuhn 1994, 1995, Krawczak & Lubjuhn 1995, Strohbach *et al.* 1998, Lubjuhn & Sauer 1999).

In der insgesamt analysierten Stichprobe von 276 Bruten mit 1997 Nestlingen (s. 3.1.1) konnten bei den betreffenden Analysen sieben Jungtiere aus insgesamt vier Bruten identifiziert werden, die keinem der beiden sozialen Eltern zuzuordnen waren (s. 3.2.1). Ein solcher Befund könnte als Indiz für das Auftreten von intraspezifischem Brutparasitismus (ISBP) gewertet werden (s. Definitionen in 3.2). Da ISBP bei Nesthockern als Fortpflanzungsstrategie jedoch eher eine untergeordnete Rolle spielt (MacWhirter 1989) und bei Kohlmeisen bisher nicht sicher nachgewiesen werden konnte (Gullberg *et al.* 1992, Glutz von Blotzheim & Bauer 1993, Gosler 1993, Lubjuhn *et al.* 1993, 1999 a, Kempenaers *et al.* 1995, Verboven & Mateman 1997, Krokene *et al.* 1998, Strohbach *et al.* 1998), müssen auch alternative Erklärungsansätze für das Vorhandensein der betreffenden sieben Jungtiere ins Auge gefaßt werden (z.B. überbaute Gelege, Manipulation der Gelege durch Spaziergänger; s. 3.2.1). Ungeachtet der tatsächlichen Ursachen, die zu diesem Befund geführt haben, kann aufgrund der geringen Frequenz festgehalten werden, daß ISBP bei Kohlmeisen keinesfalls eine regelmäßig auftretende alternative Fortpflanzungsstrategie darstellt. Sollten die wenigen Fälle tatsächlich auf ISBP zurückzuführen sein, ist es eher vorstellbar, daß einzelne Weibchen gezwungen waren Eier in ein fremdes Nest zu legen, nachdem sie ihren eigenen Nistkasten während der Legephase aus irgendwelchen Gründen (z.B. Prädation) aufgeben mußten (*best of a bad job*-Strategie). Da die Umstände letztendlich nicht geklärt werden konnten, wurden die betreffenden vier Bruten von allen weiteren Untersuchungen ausgeschlossen (s. 3.2.1).

Im Gegensatz zu ISBP konnte das Auftreten von Kopulationen außerhalb des Paarbundes (*extra-pair copulations*, EPCs) innerhalb der untersuchten Population häufig nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen (s. Gullberg *et al.* 1992, Lubjuhn *et al.* 1993, 1999 a, 2001, Lubjuhn 1994, 1995, Verboven & Mateman 1997, Krokene *et al.* 1998, Strohbach *et al.* 1998). Mit insgesamt 34,9% der untersuchten Bruten, die mindestens ein Jungtier als Resultat von EPCs enthielten (*extra-pair young*, EPY), bzw. einem Anteil von 9,6% der EPY an der Gesamtzahl der analysierten Nestlinge (s. 3.2.2) liegen Kohlmeisen bezüglich der Frequenz dieses Verhaltens im mittleren Be-

reich einer vergleichenden Studie, welche die EPY-Raten von 53 Singvogelarten erfaßt (s. Westneat & Sherman 1997).

Bei der Analyse der Elternschaften wurde in der vorliegenden Arbeit zwischen Erst- und Zweitbruten, sowie Nachgelegen unterschieden (zur Definition s. 2.1.3.3). Da die drei Bruttypen mit unterschiedlicher Intensität beprobt wurden (s. 3.1.2) und sich die EPY-Raten für die Erst- und Zweitbruten unterschieden (s.u.), werden die Ergebnisse im folgenden zunächst getrennt diskutiert, bevor näher auf die beobachtete Variabilität in den EPY-Raten eingegangen wird.

Für die Erstbruten lag das bei weitem umfassendste Datenmaterial vor (s. 3.2.2). Hier konnten in den Jahren 1993 bis 1996 in insgesamt 34,3% der 233 analysierten Bruten EPY nachgewiesen werden. Ihr Anteil an der Gesamtzahl analysierter Nestlinge lag bei insgesamt 8,9%. Diese Werte liegen im Bereich der in früheren Untersuchungen bei dieser Vogelart festgestellten EPY-Raten zwischen 10,1-53,3% (bezogen auf Bruten) bzw. 3,5-20,2% (bezogen auf Nestlinge; vgl. Gullberg *et al.* 1992, Lubjuhn *et al.* 1993, Verboven & Mateman 1997, Krokene *et al.* 1998, Strohbach *et al.* 1998). Im Vergleich mit anderen Meisenarten ergeben sich für Blaumeisen (*P. caeruleus*) mit 28,6-51,4% bzw. 5,9-13,4% sehr ähnliche Werte (s. Gullberg *et al.* 1992, Rathmann 1996, Kempnaers *et al.* 1997, Krokene *et al.* 1998). Die Werte für Erstbruten von Tannenmeisen (*P. ater*) liegen mit 65,9-75,0% für den Anteil der Bruten bzw. 25,3-27,1% für den Anteil der Nestlinge deutlich darüber (s. Lubjuhn *et al.* 1999 b, Dietrich 2001).

Für Zweitbruten lagen die in dieser Arbeit festgestellten EPY-Raten bezogen auf Bruten bei 57,9% und bezogen auf Nestlinge bei 24,5% (s. 3.2.2). Durch einen Vergleich zwischen den Erst- und Zweitbruten identischer Brutpaare konnte dabei gezeigt werden, daß Zweitbruten eine signifikant höhere EPY-Rate aufweisen (s. 3.2.2). Dieses Ergebnis stimmt mit bereits publizierten Untersuchungen an Kohlmeisen überein, welche auf der Grundlage des vorliegenden Datenmaterials unter Einbeziehung weiterer Erst- und Zweitbrutpaare durchgeführt wurden (Lubjuhn *et al.* 2001). Während bei der nahverwandten Tannenmeise in einer umfangreichen Studie ähnliche Ergebnisse erzielt werden konnten (Dietrich 2001), gestaltet sich das Bild bei einem Vergleich mit Untersuchungen an anderen Vogelarten uneinheitlich. Beim Haustyran (*Sayornis phoebe*) wurden Unterschiede in der gleichen Richtung festgestellt (s. Conrad *et al.* 1998), während für zwei weitere Vogelarten, den Kapuzenwaldsänger (*Wilsonia citrina*, Stutchbury *et al.* 1994) und die Grasammer (*Passerculus sandwichensis*, Freeman-Gallant 1996), umgekehrte Verhältnisse mit signifikant höheren EPY-Raten in Erstbruten nachgewiesen werden konnten. Bei Rohrämmern (*Emberiza schoeniclus*) unterschieden sich die EPY-Raten in Erst- und Zweitbrut dagegen nicht voneinander (Dixon *et al.* 1994). Unabhängig von der Richtung der Veränderung stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage nach den Faktoren, welche die teilweise erhebliche Variation in den EPY-Raten bei Erst- und Zweitbruten hervorrufen. Auf diesen Punkt soll aber – wie bereits erwähnt – erst weiter unten in Zusammenhang mit der Diskussion um Faktoren, die das Auftreten von EPCs generell beeinflussen können, eingegangen werden.

Für die Nachgelege war ein Vergleich mit den EPY-Raten in Erst- und Zweitbruten nicht möglich. Paarweise Vergleiche, wie zwischen Erst- und Zweitbruten, konnten nicht durchgeführt werden, da es sich bei den Nachgelegen um Brutansätze handelt, die aufgrund der Aufgabe eines Erstbrutgeleges oder des frühen Todes der betreffenden Jungtiere als Ersatzgelege initiiert werden (s.a. 2.1.3.3). Dies hat nämlich unter anderem zur Folge, daß eine Identifizierung der Altvögel während der betreffenden Erstbrutansätze unmöglich ist (der Fang der Altvögel erfolgte erst während der Fütterung der acht- bis zwölf-tägigen Jungtiere, s. 2.1.3.4). Ferner ist es aufgrund der Zuordnung der Brutansätze zu den einzelnen Bruttypen nicht auszuschließen, daß sich die Gruppe der Nachgelege inhomogen aus Erstbruten, echten Nachgelege und Zweitbruten zusammensetzt (s. 2.1.3.3). Diese Inhomogenität würde – zusammen mit der vergleichsweise kleinen Stichprobe – die Aussagekraft der betreffenden Vergleiche weiter einschränken. Aus allen genannten Gründen erscheint eine tiefergehende Betrachtung der für die Nachgelege erzielten Werten daher wenig sinnvoll.

Ermittlung der genetischen Väter durch Mikrosatelliten-Analysen

Bevor im folgenden detailliert auf proximate und ultimate Faktoren und ihren möglichen Einfluß auf die EPY-Raten eingegangen wird, sollen an dieser Stelle zunächst einige andere Punkte zu den mit Hilfe der Mikrosatelliten-Analysen erzielten Daten erörtert werden.

Mit Hilfe der beiden eigens für diese Untersuchung etablierten Mikrosatellitensysteme *2KM* und *4KM* (s. 2.2.2 und 3.4.1) ließen sich – in Kombination mit weiteren Multilocus DNA-Fingerprint Analysen – die genetischen Väter von insgesamt 61,7% aller EPY aus Erstbruten auf effiziente Art und Weise identifizieren (s. 3.4.2). Dabei konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß Männchen ohne eigenes Brutrevier (sogenannte *Floater*) – wenn überhaupt – nur unmaßgeblich an der Reproduktion innerhalb der untersuchten Kohlmeisen-Population beteiligt sind (s. 3.4.2.3). Dies ist nicht unbedingt trivial, da z.B. Kempenaers *et al.* (2001) für Baumschwalben (*Tachycineta bicolor*) eine massive Beteiligung männlicher *Floater* an der Reproduktion in der von ihnen untersuchten Population nachweisen konnten. Wäre dieses Phänomen bei Kohlmeisen mit ähnlicher Frequenz aufgetreten, so hätte dies einige Schwierigkeiten nach sich gezogen: Da die Adultvögel aus methodischen Gründen beim Füttern der Nestlinge gefangen wurden (s. 2.1.3.4), wäre eine Identifizierung von Männchen ohne eigene Brut unmöglich gewesen. Eine massive Beteiligung nicht identifizierter Tiere an der Reproduktion hätte aber einen großen Anteil ungeklärter Vaterschaften zur Folge gehabt (s.a. 3.4.2.3), welcher wiederum die Interpretation der weiter unten diskutierten Ergebnisse erschwert bzw. unmöglich gemacht hätte.

Das mit Hilfe der Mikrosatellitensysteme erhaltene Datenmaterial (61 verschiedene Kombinationen aus Weibchen und ihren EPC-Partnern, s. 3.4.2) bot für Kohlmeisen erstmals die Möglichkeit, eine Reihe weiterführender Analysen zur Fortpflanzungsbiologie durchzuführen. Dabei konnte unter anderem gezeigt werden, daß Weibchen Populationen außerhalb des Paarbundes meist mit nur einem einzigen Männchen eingehen (s. 3.4.2.1). Zwar enthielt ein Großteil der Bruten nur ein einzelnes EPY, aber auch in den meisten der verbleibenden Fälle war ein einzelnes Männchen Vater aller EPY einer Brut (s. 3.4.2.1;

vgl. Lubjuhn *et al.* 1996). Ferner konnte anhand der erzielten Daten gezeigt werden, daß Männchen innerhalb einer Brutsaison meist nur in einer einzigen Brut durch EPY repräsentiert waren (s. 3.4.2.2). Beide Befunde könnten sowohl durch proximate als auch durch ultimate Faktoren beeinflusst sein. So könnte beispielsweise die geringe Zahl der EPC-Partner eines Weibchens einerseits durch Limitierungen in der Anzahl verfügbarer Männchen hervorgerufen werden (proximater Erklärungsansatz), andererseits aber auch dadurch, daß Weibchen aus evolutionsbiologisch relevanten Gründen keine EPCs mit weiteren Männchen eingehen (ultimater Erklärungsansatz).

Unabhängig von den Faktoren, die für das beobachtete EPY-Muster verantwortlich sind, konnte auf der Basis der Daten zu den identifizierten genetischen Vätern eine Erhöhung der Varianz im Reproduktionserfolg der Männchen durch EPY von 34,3% nachgewiesen werden (s. 3.4.2.2). Daraus folgt, daß sich bei Kohlmeisen durch Kopulationen außerhalb des Paarbundes das Potential für die sexuelle Selektion erhöht. Berechnet man einen entsprechenden Index (s. Wade & Arnold 1980), so ergibt sich eine Steigerung des Selektionspotentials durch EPY um den Faktor 1,5. Diese Steigerung liegt im Rahmen dessen, was auch andere Autoren bei ihren Untersuchungen an verschiedenen Singvogelarten feststellen konnten (vgl. Übersicht in Møller 1998).

Bei den Analysen zum tatsächlichen Reproduktionserfolg der Männchen kam die vorliegende Untersuchung zu einem äußerst interessanten Befund: Die identifizierten genetischen Väter der EPY (*extra-pair males*, EPMs) wurden häufiger von ihrer Paarpartnerin „betrogen“ als dies auf der Basis der Daten zur Gesamtpopulation zu erwarten gewesen wäre (s. 3.4.2.2). Einen solchen Unterschied konnten die wenigen diesbezüglichen Untersuchungen an anderen Vogelarten bisher nicht feststellen (s. Gibbs *et al.* 1990, Yezerinac *et al.* 1995). Als mögliche Ursache für die signifikant höhere „Betrugsrate“ bei den EPMs kommen Konflikte bei der Partnerbewachung in Betracht, auf die an anderer Stelle eingegangen wird. Festgehalten werden muß hier allerdings noch, daß die EPMs ihren Gesamt-reproduktionserfolg durch Kopulationen außerhalb des Paarbundes trotz des größeren „Betrugsrisikos“ signifikant erhöhen konnten (s. 3.4.2.2). Dies bestätigt die bislang selten getestete Annahme (zu Ausnahmen s. Gibbs *et al.* 1990, Yezerinac *et al.* 1995, Stutchbury *et al.* 1997), daß der adaptive Wert von EPCs für Männchen tatsächlich in einer Erhöhung des Gesamt-reproduktionserfolges liegt.

Einfluß verschiedener Varianzfaktoren auf die EPY-Raten

Die bei verschiedenen Vogelarten festgestellten EPY-Raten weisen eine hohe Variabilität auf (s. Übersicht in Westneat & Sherman 1997). Sie reichen in bezug auf den Anteil der Bruten, die EPY enthalten, von 0%, z.B. beim Steinkauz (*Athene noctua*, Müller *et al.* 2001) oder bei Buntfußsturmschwalben (*Oceanites oceanicus*, s. Quillfeldt *et al.* 2001), bis hin zu 95% beim australischen Pracht-Staffelschwanz (*Malurus cyaneus*, s. Mulder *et al.* 1994). Auch zwischen verschiedenen Populationen derselben Art lassen sich deutliche Unterschiede feststellen (z.B. für Trauerschnäpper [*Ficedula hypoleuca*], s. Brün *et al.* 1996, Brün 1999, Lubjuhn *et al.* 2000). Desweiteren kann der Anteil der EPY an der Gesamtzahl der Nestlinge auch innerhalb derselben Population zwischen verschiedenen Jah-

ren variieren, wie die Befunde der vorliegenden Arbeit deutlich machen (s. 3.2.2). Fragt man sich, welche Einflußgrößen generell am Zustandekommen von EPY-Raten beteiligt sein können, so muß zunächst zwischen proximativen und ultimativen Faktoren unterschieden werden. Zu beiden Kategorien potentieller Einflußgrößen wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen durchgeführt (s.a. 3.3, 3.5 und 3.6).

Proximate Faktoren

Es konnte gezeigt werden, daß sich die EPY-Raten bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Nestlinge in der Bahrdorfer Kohlmeisen-Population zwischen den einzelnen Jahren signifikant unterschieden (s. 3.2.2). Die Varianz wurde durch den Synergismus zweier Faktoren hervorgerufen: Zum einen korrelierte der Anteil an Weibchen, die in den einzelnen Jahren nachweislich EPCs eingingen, mit der EPY-Rate und zum anderen der prozentuale Anteil der EPY innerhalb von EPY-Bruten (s. 3.2.2). Dabei konnte ausgeschlossen werden, daß die Variabilität in den EPY-Raten auf das, für die Jahre 1993 und 1996 hinsichtlich des Legebeginns aus verschiedenen Gründen inhomogene Datenmaterial (s. 3.1.2) zurückzuführen ist, da generell kein Zusammenhang zwischen Legebeginn und EPY-Raten festzustellen war (s. 3.2.3). Die vorliegende Untersuchung relativiert damit auch den einzigen anderslautenden Befund an Kohlmeisen: Strohbach *et al.* (1998) konnten einen negativen Zusammenhang zwischen den EPY-Raten und dem Fortschreiten der Brutsaison feststellen. Dies galt allerdings nur in einem von zwei untersuchten Jahren. Da die vorliegende Untersuchung für vier weitere Jahre keinen derartigen Zusammenhang erkennen läßt, muß davon ausgegangen werden, daß die von Strohbach *et al.* (1998) beschriebene Korrelation auf Besonderheiten in der betreffenden Brutsaison beruht und damit für die Interpretation der hier erzielten Ergebnisse keine Rolle spielt.

Hinsichtlich proximativer Faktoren, die das Auftreten von EPY beeinflussen könnten, werden in der Literatur insbesondere zwei Einflußgrößen angeführt: Die Brutpaardichte (z.B. Gibbs *et al.* 1990, Gowaty & Bridges 1991 a, Dunn *et al.* 1994, Übersicht in Westneat & Sherman 1997) und die Brutsynchronität (z.B. Stutchbury & Morton 1995, Kempnaers 1997, Stutchbury 1998 a, b, Weatherhead & Yezerinac 1998). Für die Brutpaardichte liegt die Art des potentiellen Einflusses auf der Hand, da eine Erhöhung der Brutpaardichte in einer Zunahme an EPC-Möglichkeiten resultieren sollte (vgl. 3.3). Bezüglich des potentiellen Einflusses der Brutsynchronität werden hingegen zwei grundsätzlich verschiedene Möglichkeiten diskutiert (vgl. 3.3): Eine Hypothese geht davon aus, daß eine Zunahme der Brutsynchronität das Auftreten von EPCs begünstigt (vgl. Stutchbury & Morton 1995, Stutchbury 1998 a, b), die andere postuliert einen entgegengesetzten Zusammenhang (Birkhead & Biggins 1987, Westneat *et al.* 1990, Weatherhead 1997, Weatherhead & Yezerinac 1998, Westneat & Gray 1998).

Auf dem Populationsniveau konnte weder für die Brutpaardichte noch für die Brutsynchronität ein Einfluß festgestellt werden (s. 3.3). Dabei ist allerdings zu beachten, daß sich die betreffenden Analysen auf „nur“ vier Untersuchungsjahre stützen. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß die Auswirkung der genannten Faktoren unter Umständen lokal begrenzt ist (vgl. Conrad *et al.* 1998, Lubjuhn *et al.* 1999 a, 2001, Webster *et al.* 2001).

Aus diesem Grund wurden die betreffenden Untersuchungen, auf Basis der Daten zu den identifizierten genetischen Vätern, vom Populations- auf das Individualniveau ausgeweitet (s. 3.5.1 und 3.5.2). Dabei konnte gezeigt werden, daß die Brutpaardichte lokal begrenzt anscheinend tatsächlich eine Rolle spielt: Ein Vergleich der von Weibchen für EPCs zurückgelegten Entfernungen (zur aktiven Rolle der Weibchen s. Strohbach *et al.* 1998) mit dem, was auf Basis der realen räumlichen Verteilung der Brutpaare von 1993 bis 1996 bei distanzunabhängiger Wahl der EPC-Partner zu erwarten gewesen wäre, ergab einen signifikanten Unterschied, der offensichtlich durch die Begrenzung des EPC-Aktionsradius auf 150 m hervorgerufen wird (s. 3.5.1). Ein Einfluß der Brutsynchronität konnte jedoch auch auf dem Individualniveau nicht festgestellt werden (s. 3.5.2).

Die nachfolgend auf diese Befunde aufbauenden Analysen machten dann allerdings auch deutlich, daß die beobachteten EPY-Muster nicht allein durch die Entfernung zu potentiellen Paarpartnern erklärt werden können (s. 3.5.3). Kohlmeisen-Weibchen scheinen zwar kaum EPCs einzugehen, wenn sich kein anderes Brutpaar im Umkreis von 150 m befindet (s. 3.5.3). Doch waren in der untersuchten Population über alle Jahre zusammengefaßt nur 6 von 233 Weibchen diesbezüglich limitiert (s. 3.5.3), d.h. das Nicht-Zustandekommen von EPCs kann nicht allein auf das Nicht-Vorhandensein eines potentiellen EPC-Partners im betreffenden EPC-Aktionsradius zurückgeführt werden.

Auch wenn das Nicht-Vorhandensein von EPY in den allermeisten Fällen nicht durch das Fehlen von potentiellen EPC-Partnern erklärt werden kann, wurde die Bedeutung des Radius von 150 m für die EPCs der Weibchen durch weitere Ergebnisse gestützt. So lagen z.B. die Nistkästen aller drei identifizierten genetischen Väter der EPY aus Zweitbruten während der Erstbrut mehr als 150 m vom entsprechenden Nistkasten entfernt (s. 3.5.1). Die betreffenden Zweitbrut-Weibchen hatten in ihrer jeweiligen Erstbrut entweder keine ($n = 2$) oder weniger EPY als in der Zweitbrut ($n = 1$, s. 3.5.1). Da nicht einzusehen ist, warum Weibchen während der Zweitbrut größere Strecken für EPCs zurücklegen sollten als während der Erstbrut, lassen sich die Befunde eigentlich nur wie folgt interpretieren: Durch das Fehlen einer eigenen Zweitbrut (s. 3.5.1) könnte es allen drei genetischen Vätern der Zweitbrut-EPY möglich gewesen sein, ihren Aktivitätsradius im Vergleich zur Erstbrut auszudehnen und damit in den 150 m EPC-Aktionsradius der betreffenden Weibchen zu gelangen. Trifft diese Interpretation zu, so können die erzielten Ergebnisse für Kohlmeisen als erster empirischer Hinweis auf eine erhöhte Verfügbarkeit bestimmter Männchen während der Zweitbrut gewertet werden, die aus Männchen ohne eigene Zweitbrut resultiert. Diese könnte dann wiederum die entsprechend höheren EPY-Raten nach sich ziehen (vgl. Lubjuhn *et al.* 2001).

Unabhängig von den Erörterungen zu den höheren EPY-Raten in Zweitbruten liefert die vorliegende Studie relevante Erkenntnisse, die in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden sollten. Für Kohlmeisen in dünner besiedelten Habitaten wären z.B. deutlich mehr Weibchen ohne potentiellen EPC-Partner im Umkreis von 150 m zu erwarten und die EPY-Rate in der betreffenden Weibchengruppe sollte außergewöhnlich niedrig liegen. Ferner wäre es interessant zu erfahren, wie weit die EPC-Aktionsradien bei anderen Vogelarten reichen. Es wäre immerhin denkbar, daß sich die interspezifische Variabilität

der EPY-Raten (s.o.) bei Berücksichtigung der jeweiligen lokalen Brutpaardichte zumindest teilweise durch eine zwischenartliche Varianz in den EPC-Aktionsradien erklären läßt.

Betont werden muß hier noch, daß durch die vorliegende Arbeit die Ursache für die Begrenzung des EPC-Radius der Weibchen auf 150 m nicht ermittelt werden kann. Am wahrscheinlichsten scheint diesbezüglich eine Limitierung der Weibchen hinsichtlich ihres Zeit- und Energiebudgets zu sein. Zudem könnte aber auch die Partnerbewachung durch die Männchen Einfluß auf den EPC-Aktionsradius der Weibchen nehmen (s.a. abschließende Diskussion zum möglichen Einfluß der Partnerbewachung generell): Ist es für Weibchen von Bedeutung, EPCs vom Paarpartner unbemerkt einzugehen, um so eine mögliche Reduktion seines Brutpflegeaufwandes zu vermeiden (s.u.), so kann sich ein Weibchen nicht beliebig lange vom Paarpartner entfernen und somit für Kopulationen außerhalb des Paarbundes auch nicht beliebig weit fliegen.

Ultimate Faktoren

Die oben diskutierten Ergebnisse zeigen, daß proximate Faktoren zwar eine Rolle beim Auftreten von EPCs spielen, allein jedoch nicht erklären können, warum einige Weibchen Kopulationen außerhalb des Paarbundes eingehen, andere hingegen nicht. Die vorliegende Arbeit setzte sich daher konsequenterweise auch mit dem Einfluß ultimativer Faktoren hinsichtlich des Zustandekommens von EPCs auseinander (s. 3.6).

Während der Nutzen von EPCs für Männchen auf der Hand liegt, da diese – wie auch die vorliegende Arbeit zeigt (s. 3.4.2.2) – ihren Fortpflanzungserfolg gemessen an der Nachkommenzahl steigern können, ist ein Nutzen für Weibchen nicht derart offensichtlich. Er muß aus evolutionsbiologischer Sicht allerdings gefordert werden, da für verschiedene Vogelarten gezeigt werden konnte, daß „betrogene“ Männchen ihren Brutpflegeaufwand senken (Lubjuhn *et al.* 1993, Dixon *et al.* 1994, Weatherhead *et al.* 1994, Wright & Cotton 1994, Lubjuhn 1995, Møller & Tegelström 1997, Sheldon *et al.* 1997, Lifjeld *et al.* 1998). Würden Weibchen keinen Nutzen aus EPCs ziehen, so wäre dieses Verhalten demnach nicht evolutionsstabil, d.h. es sollte durch Selektion immer seltener auftreten bzw. hätte erst gar nicht evolvieren können.

Bezüglich eines potentiellen Nutzens von EPCs für Weibchen werden in der Literatur verschiedene Hypothesen diskutiert, von denen zwei in der vorliegenden Studie intensiv untersucht wurden („Gute Gene“-Hypothese und Kompatibilitäts-Hypothese, s. 3.6). Im folgenden werden die Ergebnisse zunächst nur in Zusammenhang mit diesen beiden Hypothesen diskutiert. Daran anschließend wird aber auch noch auf die Relevanz einzelner Resultate bezüglich anderer Hypothesen zum Nutzen von EPCs für Weibchen eingegangen.

Ein wesentliches Resultat der vorliegenden Arbeit ist, daß Weibchen mit nur einem benachbarten Brutpaar im Umkreis von 150 m seltener EPCs eingehen als Weibchen mit zwei oder mehr benachbarten Brutpaaren innerhalb dieses Radius (s. 3.6.1). Dies macht noch einmal deutlich, daß der Radius von 150 m beim Zustandekommen von EPCs von Bedeutung ist. Das Ergebnis ist allerdings nicht geeignet zwischen der „Gute Gene“-Hypothese und der Kompatibilitäts-Hypothese zu unterscheiden, da es den Vorhersagen beider

Hypothesen entspricht. Auf der Basis einiger anderer Hypothesen zum Nutzen von EPCs für Weibchen wäre allerdings nicht ohne weiteres mit einem solchen Resultat zu rechnen (s.u.).

Um zwischen einem möglichen Zutreffen der „Gute Gene“-Hypothese oder der Kompatibilitäts-Hypothese unterscheiden zu können, wurden weitere Vorhersagen geprüft (s. 3.6.2 und 3.6.3). Diese Vorhersagen waren unter den Annahmen der beiden Hypothesen deshalb unterschiedlich, weil die „Gute Gene“-Hypothese von einer hierarchisch strukturierten, absoluten genetischen Qualität der Männchen ausgeht, die für alle Weibchen identisch ist, während die genetische Qualität der Männchen unter den Annahmen der Kompatibilitäts-Hypothese vom Genom des betreffenden Weibchens abhängt und damit für einzelne Weibchen durchaus unterschiedlich sein kann (s.a. Definitionen in 3.6). Sowohl die nachweislich relativ hohe Frequenz von reziprokem „Betrug“ (s. 3.6.2) als auch die Ergebnisse der Analysen zum Überleben der Männchen (s. 3.6.3) sprechen gegen eine absolute, für alle Weibchen identische Qualität der Männchen und damit gegen ein Zutreffen der „Gute Gene“-Hypothese. Dies deckt sich mit der Interpretation der Ergebnisse früherer Untersuchungen an Kohlmeisen (vgl. Krokene *et al.* 1998, Strohbach *et al.* 1998, Lubjuhn *et al.* 1999 a), die allerdings größtenteils auf einem vollständig anderen Datenmaterial basierten, da in den betreffenden Studien Informationen zu den genetischen Vätern der EPY allenfalls in Ausnahmefällen vorhanden waren.

Alle bisher aufgegriffenen Ergebnisse sind immer noch mit den Annahmen der Kompatibilitäts-Hypothese vereinbar. Anders verhält es sich jedoch mit den Resultaten, die bei den Vergleichen zum Überleben und zum Reproduktionserfolg von EPY und ihren Halbgeschwistern erzielt wurden (s. 3.6.4). Die diesbezüglich getesteten Vorhersagen (s. 3.6.4) sind deshalb von zentraler Bedeutung, weil sie sich direkt auf den durch beide Hypothesen postulierten indirekten Nutzen von EPCs beziehen. Es muß aus evolutionsbiologischer Sicht nämlich in jedem Fall gefordert werden, daß sich der Nutzen von EPCs in einer Erhöhung des Reproduktionserfolges niederschlägt. Sowohl auf der Basis der „Gute Gene“-Hypothese als auch auf der Basis der Kompatibilitäts-Hypothese wäre also zu erwarten, daß EPY einen größeren Beitrag zum Fortpflanzungserfolg der Weibchen leisten als die Nestlinge, die vom eigenen Paarpartner abstammen. Dabei ist es völlig unerheblich, wodurch die höhere genetische Qualität der EPY zustande kommt. Sei es durch eine bessere Kompatibilität des Genoms des EPC-Partners mit dem Genom des jeweiligen Weibchens oder durch eine im Vergleich zum Paarpartner absolut höhere genetische Qualität des betreffenden Tieres.

Die auf der Basis beider Hypothesen zu fordernde höhere Qualität der EPY könnte sich sowohl in einem besseren Überleben als auch in einem höheren Reproduktionserfolg ausdrücken. Hinsichtlich beider Faktoren konnte jedoch kein Unterschied zwischen EPY und ihren Halbgeschwistern festgestellt werden (s. 3.6.4). Die numerischen Unterschiede lagen zudem in beiden Fällen entgegen der auf Basis der „Gute Gene“- und Kompatibilitäts-Hypothese zu erwartenden Richtung (s. 3.6.4). Dies bedeutet, daß auch bei einem größeren Datenmaterial nicht mit anderen Ergebnissen gerechnet werden kann. Außerdem ist zu berücksichtigen, daß sich die beiden numerischen Effekte (schlechteres Überleben von

EPY und geringerer Fortpflanzungserfolg) in bezug auf die inklusive Fitness der betreffenden Weibchen multiplikativ auswirken.

Insgesamt kann festgehalten werden, daß die letztgenannten Ergebnisse zum Überleben und zum Reproduktionserfolg der Nestlinge gegen jede Hypothese sprechen, die den Nutzen von EPCs in einer, wie auch immer gearteten, höheren Qualität der EPY gegenüber ihren Halbgeschwistern sieht. Die Befunde sind deshalb von besonderem Interesse, da sie anderslautende Ergebnisse an verschiedenen Vogelarten (z.B. Houtman 1992, Kempnaers *et al.* 1992, 1997, 1999, Hasselquist *et al.* 1996, Sundberg & Dixon 1996, Johnsen *et al.* 2000) relativieren und keinesfalls von einem allgemeingültigen Zutreffen der aufgeführten Hypothesen ausgegangen werden kann. Zumindest bei Kohlmeisen müssen andere Erklärungsansätze gefunden werden, um das Muster des Auftretens von EPY zu erklären.

Der bereits weiter oben angeführte Befund der unterschiedlichen EPY-Raten von Weibchen mit nur einem benachbarten Brutpaar im Umkreis von 150 m und Weibchen mit zwei oder mehr benachbarten Brutpaaren innerhalb dieses Radius (s. 3.6.1) war zwar nicht geeignet, zwischen der „Gute Gene“-Hypothese und der Kompatibilitäts-Hypothese zu differenzieren. Doch eignet er sich zum Test zweier weiterer Hypothesen zum Nutzen von EPCs für Weibchen, auf die im folgenden daher kurz eingegangen werden soll.

Eine weitere Hypothese zum Nutzen von EPCs für Weibchen geht davon aus, daß sich die Weibchen durch EPCs vor einer möglichen Infertilität des Paarpartners schützen (z.B. Wetton & Parkin 1991, Kempnaers & Dhondt 1993, Gray 1997 a, Krokene *et al.* 1998). Träfe diese Hypothese zu, wäre nicht einzusehen, warum Weibchen mit mehreren Nachbarn häufiger EPCs eingehen als Weibchen mit nur einem benachbarten Brutpaar. Ein entsprechender Nutzen von EPCs sollte schließlich bereits bei Kopulationen mit nur einem weiteren Männchen vorhanden sein. Auch weitere Befunde sprechen gegen das Zutreffen der Hypothese zur Sicherstellung der Befruchtung. So müßte Infertilität z.B. ein vergleichsweise verbreitetes Phänomen sein, damit der postulierte Nutzen – von dem Hintergrund der oben genannten Kosten – evolutionsbiologisch wirksam werden kann. Da in nahezu allen Brutten auch Nachkommen des sozialen Paarpartners vorhanden waren (s. 3.2.2), kann dies jedoch weitgehend ausgeschlossen werden. Offen bleiben muß allerdings, ob eine möglicherweise nur temporäre Infertilität, z.B. durch Erschöpfung der Spermiovorräte, eine Rolle spielen könnte (vgl. Romanoff 1960, Aguilera 1989, Birkhead 1991, Birkhead & Møller 1992, Sheldon 1993).

Eine andere Hypothese sieht den Nutzen von EPCs für Weibchen darin, daß Weibchen durch EPCs versuchen, die genetische Variabilität ihrer Nachkommen zu erhöhen (s. z.B. Birkhead & Møller 1992, Kempnaers & Dhondt 1993), was in wechselnden Umwelten von Vorteil sein könnte. Auch in diesem Fall wäre aber zu erwarten, daß der betreffende Nutzen sich bereits bei Kopulationen mit einem einzelnen benachbarten Männchen ergibt. Allgemein läßt sich gegen die Hypothese zur Erhöhung der genetischen Variabilität zudem einwenden, daß durch Meiose und Rekombination bereits innerhalb der regulären Nachkommen mit dem Paarpartner eine hinreichende Diversität erzeugt werden sollte, die sich durch EPCs nicht wesentlich erhöhen läßt (Williams 1975).

Zusammenfassend muß an dieser Stelle festgehalten werden, daß die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse mit keiner der diskutierten Hypothesen zum Nutzen von EPCs für Weibchen widerspruchsfrei in Einklang zu bringen sind. Damit können die angesprochenen ultimativen Einflußgrößen das Muster im Auftreten von EPY in der untersuchten Kohlmeisen-Population ebenfalls nicht erklären. Zukünftige Untersuchungen zur Frage, warum einige Kohlmeisen-Weibchen Kopulationen außerhalb des Paarbundes eingehen, andere hingegen nicht, müssen daher weitere mögliche Einflußgrößen mit einbeziehen (s.u.). Dabei sollte auch berücksichtigt werden, daß eine Reihe von Faktoren vielleicht auf äußerst komplexe Art und Weise zusammenwirkt. Unter Umständen müssen aber sogar vollständig neue Erklärungsansätze hinsichtlich des Auftretens von EPCs bei Vögeln entwickelt werden, die in die bisherigen theoretischen Überlegungen zu diesem Punkt nicht eingehen.

Ausblicke

Im folgenden soll abschließend noch ein möglicher Weg für zukünftige Untersuchungen aufgezeigt werden. Ein Faktor, der in der vorliegenden Arbeit nicht detailliert untersucht werden konnte, ist die Partnerbewachung durch die Männchen (*mate guarding*). Sie stellt einen bei Singvögeln verbreiteten Mechanismus zur Vaterschaftssicherung dar und könnte das Zustandekommen von EPCs ebenfalls beeinflussen (s. Übersicht in Birkhead & Møller 1992 und zur Partnerbewachung bei Kohlmeisen Björklund & Westman 1986). Da eines der Hauptziele der vorliegenden Arbeit die Identifizierung der genetischen Väter der EPY war, stand bei den Freilandarbeiten die Erfassung und Beprobung möglichst aller Brutvögel und ihrer Nachkommen im Vordergrund. Dies machte es aus Zeitgründen unmöglich, detaillierte Verhaltensbeobachtungen durchzuführen, die zur Bewertung der Intensität der Partnerbewachung bei einzelnen Brutpaaren notwendig gewesen wären. Gleichwohl kann ein Teil der erzielten Ergebnisse unter Umständen auch mit der Partnerbewachung zusammenhängen. Es ist z.B. durchaus vorstellbar, daß die signifikant höhere „Betrugsrate“ bei den EPMs (s. 3.4.2.2) aus einer eingeschränkten Partnerbewachung auf Seiten dieser Männchen resultiert. Um selbst EPCs eingehen zu können, müssen EPMs unter Umständen die Intensität der Bewachung des eigenen Weibchens einschränken, was wiederum für die betreffenden Weibchen in einer Zunahme an EPC-Möglichkeiten resultieren könnte.

Auch die Befunde zur erhöhten EPY-Rate in Zweitbruten (s. 3.2.2) lassen sich indirekt mit der Partnerbewachung in Zusammenhang bringen. Bei den EPMs der Zweitbruten handelte es sich um Männchen, die selbst keine Zweitbrut hatten (s. 3.5.1). Damit waren sie von allen Pflichten das eigene Brutgeschäft betreffend, inklusive der Bewachung des eigenen Weibchens, befreit, was ihnen wiederum eine Vergrößerung ihres Aktivitätsradius ermöglichen könnte. Gestützt wird diese Vermutung – wie an anderer Stelle bereits ausgeführt – durch die für Zweitbrut-EPMs ermittelten Distanzen (s.o.).

Weiterhin könnte die Partnerbewachung einer der Faktoren sein, welche den EPC-Aktionsradius von Weibchen beeinflussen. Es wäre nämlich denkbar, daß die Intensität der Partnerbewachung durch das Männchen die Zeitdauer (und damit auch die maximale Distanz) beeinflusst, mit der sich ein Weibchen unbemerkt vom Nistkasten entfernen kann, ohne

eine mögliche Reduktion des Brutpflegeaufwands auf Seiten des Männchens zu riskieren (s.o.). Selbst der signifikante Unterschied zwischen den EPY-Raten von Weibchen mit nur einem und Weibchen mit mehreren benachbarten Brutpaaren im Umkreis von 150 m ließen sich mit der Partnerbewachung erklären. Mehrere benachbarte Brutpaare bringen nämlich unter Umständen nicht nur eine Erhöhung der Anzahl potentieller EPC-Partner für Weibchen mit sich, sondern resultieren aus Sicht der Männchen auch in einem erhöhten Konkurrenzdruck. Da es generell einfacher sein sollte, die Vaterschaft gegen nur einen Konkurrenten zu „verteidigen“, spiegelt die höhere EPY-Rate bei Weibchen mit mehreren benachbarten Brutpaaren also vielleicht lediglich eine vermehrte EPC-Möglichkeit aufgrund eingeschränkter Partnerbewachung durch das eigene Männchen wider. Sollte dieser alternative Erklärungsansatz zutreffen, müßten die aus dem betreffenden Befund abgeleiteten Einwände gegen Hypothesen zum Nutzen von EPCs für Weibchen (s.o.) zurückgenommen werden. Da keine Daten zur Partnerbewachung durch die Männchen vorliegen, muß diese Frage allerdings offen bleiben.

Die obigen Ausführungen lassen es sinnvoll erscheinen, bei zukünftigen Untersuchungen zum Verständnis des Auftretens von Kopulationen außerhalb des Paarbundes bei der Kohlmeise, den möglichen Einfluß der Partnerbewachung gebührend zu berücksichtigen. Die vorliegende Arbeit steuert einige neue Erkenntnisse bei, die bei der Umsetzung solcher Untersuchungen hilfreich sein können. Sie macht jedoch gleichzeitig deutlich, wie groß die Zahl der zu berücksichtigenden Einflußgrößen ist.

5 Zusammenfassung

Zur Durchführung von Abstammungsbegutachtungen bei der Kohlmeise (*Parus major*) wurde in der vorliegenden Untersuchung das Multilocus DNA-Fingerprinting eingesetzt. Mit Hilfe der Restriktionsenzym/Oligonukleotidsonden-Kombination *Hae* III/(CA)₈ konnte gezeigt werden, daß intraspezifischer Brutparasitismus bei der untersuchten Vogelart keine besondere Rolle spielt. Kopulationen außerhalb des Paarbundes stellen dagegen nachweislich eine regelmäßig auftretende, alternative Fortpflanzungsstrategie im Paarungssystem dieser sozial monogamen Singvogelart dar. Die Frequenz des Auftretens von Jungtieren, die das Resultat von Kopulationen außerhalb des Paarbundes waren (*extra-pair young*, EPY), variierte dabei zwischen verschiedenen Brutjahren und war in Zweitbruten höher als in Erstbruten.

Zur Identifizierung der genetischen Väter der EPY wurden eigens Mikrosatellitensysteme für Kohlmeisen entwickelt (2KM und 4KM). Mit ihrer Hilfe ließ sich die Vaterschaft von 61,7% aller EPY aus Erstbruten ($n = 154$) klären. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Männchen durch Kopulationen außerhalb des Paarbundes ihren Reproduktionserfolg innerhalb einer Brutsaison erhöhen können.

Um der Frage nachzugehen, warum einige Weibchen Kopulationen außerhalb des Paarbundes eingehen, andere hingegen nicht, wurden zunächst proximate Einflüsse analysiert und anschließend Vorhersagen anhand von Hypothesen zu ultimativen Faktoren getestet.

Auf Ebene der proximativen Faktoren konnte ein Einfluß der lokalen Brutpaardichte auf die EPY-Rate nachgewiesen werden. Dabei konnte gezeigt werden, daß der Aktionsradius der meisten Weibchen für Kopulationen außerhalb des Paarbundes auf 150 m begrenzt ist. Ein Einfluß der Brutsynchronität konnte dagegen weder auf der Populationsebene noch auf dem Individualniveau festgestellt werden. Die Befunde zu den proximativen Faktoren allein reichten allerdings zur Klärung des festgestellten Musters von Fremdkopulationen nicht aus.

Bei der Analyse der ultimativen Faktoren wurden Vorhersagen getestet, die aus der „Gute Gene“-Hypothese und der Kompatibilitäts-Hypothese abgeleitet wurden. Beide Hypothesen postulieren einen indirekten Nutzen von Kopulationen außerhalb des Paarbundes in Form einer erhöhten genetischen Qualität entsprechender Nachkommen, welche sich in einer überlegenen Phänotyp-Umwelt Interaktion dieser Jungtiere manifestieren sollte. Keine der beiden Hypothesen konnte jedoch bestätigt werden, da EPY weder besser überlebten noch einen größeren Reproduktionserfolg aufwiesen als ihre jeweiligen Halbgeschwister.

Keiner der analysierten Faktoren und keine der getesteten Hypothesen konnten damit widerspruchsfrei das Zustandekommen bzw. das Nicht-Zustandekommen von Kopulationen außerhalb des Paarbundes bei Kohlmeisen erklären. Mögliche Konsequenzen, die sich aus der vorliegenden Studie für zukünftige Untersuchungen ergeben, werden diskutiert.

6 Danksagung

Herrn Prof. Dr. K.P. Sauer und Herrn PD Dr. T. Lubjuhn danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der zur Durchführung der vorliegenden Dissertation am Institut für Evolutionsbiologie und Ökologie erforderlichen Sach- und Finanzmittel. Darüber hinaus danke ich beiden Herren für ihr stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und viele konstruktive Gespräche.

Herrn Prof. Dr. J.T. Epplen möchte ich für die freundliche und großzügige Unterstützung bei der Etablierung der DNA-Mikrosatelliten und der Hybridisierung der „Fingerprint“-Gele am Institut für Molekulare Humangenetik (Ruhr-Universität-Bochum) danken.

Beim Leiter der Außenstation Braunschweig des Instituts für Vogelforschung „Vogelwarte Helgoland“, Herrn Dr. W. Winkel, und seiner Frau D. Winkel bedanke ich mich für die Möglichkeit, in dem von ihnen betreuten Versuchsgebiet arbeiten zu können und darüber hinaus für die jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft. Dies gilt in gleichem Maße für den Revierleiter, Herrn Forstoberinspektor A. Schlüter, und den Bürgermeister von Bahrndorf, Herrn I. Waurich.

Für ihre tatkräftige Hilfe im Freiland bedanke ich mich außerdem bei den Mitarbeitern des Instituts für Evolutionsbiologie und Ökologie und der Arbeitsgruppe für Verhaltensforschung (Ruhr-Universität-Bochum) – für letztere insbesondere bei Herrn Dr. J. Kretzschmar.

Frau Dr. C. Epplen und Frau I. Over haben mir mit ihrer Kompetenz bei der Etablierung der DNA-Mikrosatelliten zur Seite gestanden und mit ihrer Art eine äußerst angenehme und produktive Laboratmosphäre geschaffen. Dafür und für die vielen anderen „Kleinigkeiten“ bedanke ich mich herzlich. Gleiches gilt für den Einsatz der Damen M. Orland, C. Wallnisch, S. Bleidißel und A. Kalt.

Gesondert und ausdrücklich möchte ich mich hier noch einmal bei Herrn PD Dr. T. Lubjuhn und Herrn Dr. J. Brün für weit mehr als ihre sprichwörtlich unermüdliche Diskussionsbereitschaft bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre vielseitige und bedingungslose Unterstützung.

Besonderen Dank und Hochachtung möchte ich an dieser Stelle gegenüber meiner Frau, Dr. Miriam Schlangen, und meiner Familie aussprechen, für den „in guten wie in schlechten Zeiten“ geleisteten Rückhalt. Danke, Trollo!

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft durch die Sachbeihilfe Lu 572/1-1,2,3 unterstützt.

7 Literaturverzeichnis

- Aguilera, E. (1989) Sperm competition and copulation intervals of the white spoonbill (*Platalea leucorodia*, Aves, Threskiornithidae). *Ethology* 82: 230-237
- Alatalo, R.V., Gustafsson, L. & Lundberg, A. (1984) High frequency of cuckoldry in pied and collared flycatchers. *Oikos* 42: 41-47
- Ali, S., Müller, C.R. & Epplen, J.T. (1986) DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specific for simple repeats. *Human Genetics* 74: 239-243
- Andersson, M. (1986) Evolution of condition-dependent sex ornaments and mating preferences: sexual selection based on viability differences. *Evolution* 40: 804-816
- Arctander, P. (1988) Comparative studies on avian DNA restriction fragment length polymorphism analysis: Convenient procedures based on blood samples from live birds. *Journal für Ornithologie* 129: 205-216
- Berndt, R. (1938) Über die Anzahl der Jahresbruten bei Meisen und ihre Abhängigkeit vom Lebensraum, mit Angaben über Gelegestärke und Brutzeit. *Vogelwelt* 63: 140-151 und 174-181
- Berndt, R. & Winkel, W. (1967) Die Gelegegröße des Trauerschnäppers (*Ficedula hypoleuca*) in Beziehung zu Ort, Zeit, Biotop und Alter. *Vogelwelt* 88: 97-136
- Birkhead, T.R. & Biggins, J.D. (1987) Reproductive synchrony and extra-pair copulations in birds. *Ethology* 74: 320-334
- Birkhead, T.R., Burke, T., Zann, T., Hunter, F.M. & Krupa, A.P. (1990) Extra-pair paternity and intraspecific brood parasitism in wild zebra finches *Taeniopygia guttata*, revealed by DNA fingerprinting. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 27: 315-324
- Birkhead, T.R. (1991) Sperm depletion in the Bengalese finch, *Lonchura striata*. *Behavioral Ecology* 2: 267-275
- Birkhead, T.R. & Møller, A.P. (1992) *Sperm Competition in Birds: Evolutionary Causes and Consequences*. Academic Press, London
- Björklund, M. & Westman, B. (1986) Mate-guarding in the Great Tit: tactics of a territorial forest-living species. *Ornis Scandinavica* 17: 99-105
- Björklund, M., Møller, A.P., Sundberg, J. & Westman, B. (1992) Female great tits, *Parus major*, avoid extra-pair copulation attempts. *Animal Behaviour* 43 : 691-693
- Brown, J.L. (1997) A theory of mate choice based on heterozygosity. *Behavioral Ecology* 8: 60-65

- Brün, J., Winkel, W., Epplen, J.T. & Lubjuhn, T. (1996) Elternschaftsnachweise bei Trauerschnäppern *Ficedula hypoleuca* am Westrand ihres mitteleuropäischen Verbreitungsareals. *Journal für Ornithologie* 137: 435-446
- Brün, J. (1999) Kopulationen außerhalb des Paarbundes und ihr Einfluß auf den Reproduktionserfolg monogamer und polygyner Männchen des Trauerschnäppers (*Ficedula hypoleuca* Pallas 1764). Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Burke, T. & Bruford, M.W. (1987) DNA fingerprinting in birds. *Nature* 327: 149-152
- Cheng, K.M., Burns, J.T. & McKinney, F. (1983) Forced copulation in captive mallards. III. Sperm competition. *Auk* 100: 302-310
- Conrad, K.F., Robertson, R.J. & Boag, P.T. (1998) Frequency of extrapair young increases in second broods of Eastern phoebes. *Auk* 115: 497-502
- Curio E., Regelman, K. & Zimmermann, U. (1984) The defence of first and second broods by Great Tit (*Parus major*) parents: a test of predictive sociobiology. *Zeitschrift für Tierpsychologie* 66: 101-127
- Dietrich, V. (2001) Zum Auftreten alternativer Fortpflanzungsstrategien in einer Lingener Population der Tannenmeise (*Parus ater*). Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig
- Dixon, A., Ross, D., O'Malley, S.L.C. & Burke, T. (1994) Paternal investment inversely related to degree of extra-pair paternity in the reed bunting. *Nature* 371: 698-700
- Double, M. & Cockburn, A. (2000) Pre-dawn infidelity: females control extra-pair mating in superb fairy wrens. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267: 465-470
- Dunn, P.O., Whittingham, L.A., Lifjeld, J.T., Robertson, R.J. & Boag, P.T. (1994) Effects of breeding density, synchrony and experience on extrapair paternity in tree swallows. *Behavioral Ecology* 5 : 123-129
- Emlen, S.T. & Oring, L.W. (1977) Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science* 197: 215-223
- Epplen, J.T. (1992) The methodology of multilocus DNA fingerprinting using radioactive or nonradioactive oligonucleotide probes specific for simple repeat motifs. In: Chrambach, A., Dunn, M.J. & Radola, B.J. (eds.) *Advances in Electrophoresis*, Vol. 5. VCH, Weinheim. 59-112
- Fisher, R.A. (1930) *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford
- Freeman-Gallant, C.R. (1996) DNA fingerprinting reveals female preference for male parental care in Savannah Sparrows. *Proceedings of the Royal Society of London B* 263: 157-160

- Gibb J.A (1950) The breeding biology of the Great and Blue Titmice. *Ibis* 92: 507-539
- Gibb J.A (1954) Population changes of titmice, 1947-1951. *Bird Study* 1: 40-48
- Gibbs, H.L., Weatherhead, P.J., Boag, P.T., White, B.N., Tabak, L.M. & Hoysak, D.J. (1990) Realized reproductive success of polygynous red-winged blackbirds revealed by DNA markers. *Science* 250: 1394-1397
- Glutz von Blotzheim, U.N. & Bauer, K.M. (1993) *Handbuch der Vögel Mitteleuropas, Band 13/I, Passeriformes (4. Teil)*. Aula, Wiesbaden
- Goodwin, D. (1955) Some observations on the reproductive behaviour of rooks. *British Birds* 48: 97-107
- Gosler, A. (1993) *The Great Tit*. Hamlyn, London
- Gowaty, P.A. & Bridges, W.C. (1991 a) Nestbox availability affects extra-pair fertilizations and conspecific nest parasitism in eastern bluebirds, *Sialia sialis*. *Animal Behaviour* 41: 661-675
- Gowaty, P.A. & Bridges, W.C. (1991 b) Behavioral, demographic, and environmental correlates of extra-pair fertilizations in eastern bluebirds, *Sialia sialis*. *Behavioral Ecology* 2: 339-350
- Gowaty, P.A. (1994) Architects of sperm competition. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 160-162
- Gowaty, P.A. (1996) Battles of the sexes and origins of monogamy. In: Black, J.M. (ed.) *Partnerships in Birds: The Study of Monogamy*. Oxford University Press, New York. 21-52
- Gray, E.M. (1997 a) Do female red-winged blackbirds benefit genetically from seeking extra-pair copulations? *Animal Behaviour* 53: 605-623
- Gray, E.M. (1997 b) Female red-winged blackbirds accrue material benefits from copulating with extra-pair males. *Animal Behaviour* 53: 625-639
- Gullberg, A., Tegelström, H. & Gelter, H.P. (1992) DNA fingerprinting reveals multiple paternity in families of Great and Blue Tits (*Parus major* and *P. caeruleus*). *Hereditas* 117: 103-108
- Hamilton, W.D. & Zuk, M. (1982) Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* 218: 384-387
- Hasselquist, D., Bensch, S. & von Schantz, T. (1996) Correlation between male song repertoire, extra-pair paternity and offspring-survival in the great reed warbler. *Nature* 381: 229-232

- Hoelzel, A.R. & Green, A. (1992) Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. In: Hoelzel, A.R. (ed.) *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, New York. 159-188
- Hoi, H. (1997) Assessment of the quality of copulation partners in the monogamous bearded tit. *Animal Behaviour* 53: 277-286
- Houtman, A.M. (1992) Female zebra finches choose extra-pair copulations with genetically attractive males. *Proceedings of the Royal Society of London B* 249: 3-6
- Huxley, J.S. (1912) A „disharmony“ in the reproductive habits of the wild duck (*Anas boschas* L.). *Biologisches Zentralblatt* 32: 621-623
- Invitrogen Corp. (Catalog no. K2600-01) Zero BackgroundTM/Kan Cloning Kit (pZERTM-2.1); A Zero BackgroundTM Cloning Kit with Selektion on Kanamycin (Version A)
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. & Thein, S.L. (1985 a) Hypervariable „minisatellite“ regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. & Thein, S.L. (1985 b) Individual-specific „fingerprints“ of human DNA. *Nature* 316: 76-79
- Jennions, M.D. (1997) Female promiscuity and genetic incompatibility. *Trends in Ecology and Evolution* 12: 251-253
- Jennions, M.D. & Petrie, M. (2000) Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews* 75: 21-64
- Johnsen, A., Andersen, V., Sunding, C. & Lifjeld, J.T. (2000) Female bluethroats enhance offspring immunocompetence through extra-pair copulations. *Nature* 406: 296-299
- Kempenaers, B., Verheyen, G.R., van den Broeck, M., Burke, T., van Broeckhoven, C. & Dhondt, A.A. (1992) Extra-pair paternity results from female preference for high-quality males in the blue tit. *Nature* 357: 494-496
- Kempenaers, B. (1993) The use of a breeding synchrony index. *Ornis Scandinavia* 24: 84
- Kempenaers, B. & Dhondt, A.A. (1993) Why do females engage in extra-pair copulations? A review of hypotheses and their predictions. *Belgian Journal of Zoology* 1: 93-103
- Kempenaers, B., Pinxten, R. & Eens, M. (1995) Intraspecific brood parasitism in two tit *Parus* species: occurrence and responses to experimental parasitism. *Journal of Avian Biology* 26: 114-120
- Kempenaers, B. (1997) Does reproductive synchrony limit male opportunities or enhance female choice for extra-pair paternity? *Behaviour* 134: 551-562

- Kempnaers, B., Verheyen, G.R. & Dhondt, A.A. (1997) Extrapair paternity in the blue tit (*Parus caeruleus*): female choice, male characteristics, and offspring quality. *Behavioral Ecology* 8: 481-492
- Kempnaers, B., Congdon, B., Boag, P.T. & Robertson, R.T. (1999) Extrapair paternity and egg hatchability in tree swallows: evidence for the genetic compatibility hypothesis? *Behavioral Ecology* 10: 304-311
- Kempnaers, B., Everding, S., Bishop, C., Boag, P. & Robertson, R.J. (2001) Extra-pair paternity and the reproductive role of male floaters in the tree swallow (*Tachycineta bicolor*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 49: 251-259
- Kirkpatrick, M. (1982) Sexual selection and the evolution of female choice. *Evolution* 36: 1-12
- Krawczak, M. & Lubjuhn, T. (1995) An informativity index for multilocus DNA fingerprints. *Electrophoresis* 16: 16-21
- Krokene, C., Rigstad, K., Dale, M. & Lifjeld, J.T. (1998) The function of extrapair paternity in blue tits and great tits: good genes or fertility insurance? *Behavioral Ecology* 6: 649-656
- Lack, D. (1968) *Ecological Adaptations for Breeding in Birds*. Methuen, London
- Lifjeld, J.T. & Robertson, R.J. (1992) Female control of extra-pair fertilization in Tree Swallows. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 31: 89-96
- Lifjeld, J.T., Dunn, P.O. & Westneat, D.F. (1994) Sexual selection by sperm competition in birds: male-male competition or female choice? *Journal of Avian Biology* 25: 244-250
- Lifjeld, J.T., Slagsvold, T. & Ellegren, H. (1998) Experimentally reduced paternity affects paternal effort and reproductive success in pied flycatchers. *Animal Behaviour* 55: 319-329
- Lombardo, M.P., Thorpe, P.A. & Power, H.W. (1999) The beneficial sexually transmitted microbe hypothesis of avian copulation. *Behavioral Ecology* 10: 333-350
- Lubjuhn, T., Curio, E., Muth, S.C., Brün, J. & Epplen, J.T. (1993) Influence of extra-pair paternity on parental care in great tits (*Parus major*). In: Pena, S.D.J., Chakraborty, R., Epplen, J.T. & Jeffreys, A.J. (eds.) *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Birkhäuser, Basel. 379-385
- Lubjuhn, T. (1994) *Soziobiologische Aspekte zum Fortpflanzungsverhalten der Kohlmeise (Parus major)*. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- Lubjuhn, T. (1995) Reproductive strategies and parental effort in birds: great tits (*Parus major*) - a case study. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 88.2: 15-21

- Lubjuhn, T., Epplen, C. & Epplen, J.T. (1996) Multilocus fingerprinting and single locus analyses in the Great Tit for paternity determination. *Electrophoresis* 17: 1555-1558
- Lubjuhn, T., Brün, J., Winkel, W. & Muth, S. (1998) Effects of blood sampling in Great Tits. *Journal of Field Ornithology* 69: 595-602
- Lubjuhn, T. & Sauer, K.P. (1999) DNA fingerprinting and profiling in behavioural ecology. In: Epplen, J.T. & Lubjuhn, T. (eds.) *DNA Profiling and DNA Fingerprinting*, Birkhäuser, Basel. 39-52
- Lubjuhn, T., Strohbach, S., Brün, J., Gerken, T. & Epplen, J.T. (1999 a) Extra-pair paternity in Great Tits (*Parus major*) – a long term study. *Behaviour* 136: 1157-1172
- Lubjuhn, T., Gerken, T., Brün, J. & Epplen, J.T. (1999 b) High frequency of extra-pair paternity in the Coal Tit. *Journal of Avian Biology* 30: 229-233
- Lubjuhn, T., Winkel, W., Epplen, J.T. & Brün, J. (2000) Reproductive success of monogamous and polygynous pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*). *Behavioural Ecology and Sociobiology* 48: 12-17
- Lubjuhn, T., Brün, J., Gerken, T. & Epplen, J.T. (2001) Inconsistent pattern of extra-pair paternity in first and second broods of the Great Tit (*Parus major*). *Ardea* 89: 69-73
- MacWhirter, R.B. (1989) On the rarity of intraspecific brood parasitism. *Condor* 91: 485-492
- Marler, P. (1956) Behaviour of the chaffinch *Fringilla coelebs*. *Behaviour Supplement* 5: 1-184
- Miller, S.A., Dykes, D.D. & Polesky, H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1215
- Miyada, C.G., Klofolt, C., Reyes, A.A., McLaughan-Taylor, E. & Wallace, R.B. (1985) Evidence that polymorphism in the murine major histocompatibility complex may be generated by the assortment of subgene sequences. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 82: 2890-2894
- Møller, A.P. (1994) Male ornament size as a reliable cue to enhanced offspring viability in the barn swallow. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 91: 6929-6932
- Møller, A.P. & Birkhead, T.R. (1994) The evolution of plumage brightness in birds is related to extra-pair paternity. *Evolution* 48: 1089-1100
- Møller, A.P. & Tegelström, H. (1997) Extra-pair paternity and tail ornamentation in the barn swallow *Hirundo rustica*. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 41: 353-360

- Møller, A.P. (1998) Sperm competition and sexual selection. In: Birkhead, T.R. & Møller, A.P. (eds.) Sperm Competition and Sexual Selection. Academic Press, London. 55-90
- Mulder, R.A., Dunn, P.O., Cockburn, A., Lazenby-Cohen, K.A. & Howell, M.J. (1994) Helpers liberate female fairy-wrens from constraints on extra-pair mate choice. Proceedings of the Royal Society of London B 255: 223-229
- Müller, W., Epplen, J.T. & Lubjuhn, T. (2001) Genetic paternity analyses in Little Owls (*Athene noctua*): does the high rate of paternal care select against extra-pair young? Journal für Ornithologie 142: 195-203
- Nürnberg, P. & Epplen, J.T. (1992) On the reusability of dried agarose gels for the subsequent analysis of multiple samples from various kingdoms (cautionary notes II). Fingerprint News 4(1): 9
- Perrins, C.M. (1979) British Tits. Collins, London
- Petrie, M. (1994) Improved growth and survival of offspring of peacocks with more elaborated trains. Nature 371: 598-599
- Quillfeldt, P., Schmoll, T., Peter, H.U., Epplen, J.T. & Lubjuhn, T. (2001) Genetic monogamy in Wilson's Storm-Petrel. Auk 118: 242-248
- Rassmann, K., Schlotterer, C. & Tautz, D. (1991) Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction based DNA fingerprinting. Electrophoresis 12: 113-118
- Rathmann, A. (1996) Untersuchungen zum Fortpflanzungsverhalten von Blaumeisen (*Parus caeruleus*) mit Hilfe des DNA-Fingerprinting. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Robinson, A. (1956) The annual reproductive cycle of the magpie, *Gymnorhina dorsalis* Campbell, in south-western Australia. Emu 56: 235-336
- Rohwer, F.C. & Freeman, S. (1989) The distribution of conspecific nest parasitism in birds. Canadian Journal of Zoology 67: 239-253
- Romanoff, A.L. (1960) The Avian Embryo: Structural and Functional Development. Macmillan, New York
- Saiki, R.K., Scharf, S.J., Faloona, F.A., Mullis, K.B., Horn, G.T., Ehrlich, H.A. & Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Ehrlich, H.A. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491

- Saino, N., Primmer, C.R., Ellegren, H. & Møller, A.P. (1997) An experimental study of paternity and tail ornamentation in the barn swallow (*Hirundo rustica*). *Evolution* 51: 562-570
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Schmoll, T. (2000) Genetisches Paarungssystem und Anpassungswert der Lipidakkumulation im Nestlingsalter bei Buntfußsturmschwalben *Oceanites oceanicus* (Kuhl 1820). Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- Sheldon, B.C. (1993) Sexually transmitted disease in birds: occurrence and evolutionary significance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 339: 491-497
- Sheldon, B.C. (1994) Sperm competition in the chaffinch: the role of the female. *Animal Behaviour* 47: 167-173
- Sheldon, B.C., Merilä, J., Qvarnström, A., Gustafsson, L. & Ellegren, H. (1997) Paternal genetic contribution to offspring condition predicted by the size of male secondary sexual character. *Proceedings of the Royal Society of London B* 264: 297-302
- Shinik, T.M., Lund, E., Smithies, O. & Blattner, F.R. (1975) Hybridisation of labeled RNA to DNA in agarose gels. *Nucleic Acids Research* 2: 1911-1929
- Smith, S.M. (1988) Extra-pair copulations in black-capped chickadees: the role of the female. *Behaviour* 107: 15-23
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-517
- Stearns, C.S. & Hoekstra, R.F. (2000) *Evolution: An Introduction*. Oxford University Press, New York
- Strohbach, S., Curio, E., Bathen, A., Epplen, J.T. & Lubjuhn, T. (1998) Extrapair paternity in the great tit (*Parus major*): a test of the „good genes“ hypothesis. *Behavioral Ecology* 9: 388-396
- Stutchbury, B.J.M., Rhymer, J.M. & Morton, E.S. (1994) Extrapair paternity in Hooded Warblers. *Behavioral Ecology* 5: 384-392
- Stutchbury, B.J.M. & Morton, E.S. (1995) The effect of breeding synchrony on extra-pair mating systems in songbirds. *Behaviour* 132: 675-690
- Stutchbury, B.J.M., Piper, W.H., Neudorf, D.L., Tarof, S.A., Rhymer, J.M., Fuller, G. & Fleischer, R.C. (1997) Correlates of extra-pair fertilization success in hooded warblers. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 40: 119-126

- Stutchbury, B.J.M. (1998 a) Female mate choice of extra-pair males: breeding synchrony is important. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 43: 213-215
- Stutchbury, B.J.M. (1998 b) Breeding synchrony best explains variation in extra-pair mating system among avian species. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 43: 221-222
- Sundberg, J. & Dixon, A. (1996) Old, colourful male yellowhammers, *Emberiza citrinella*, benefit from extra-pair copulations. *Animal Behaviour* 52: 113-122
- Thein, S.L. & Wallace, R.B. (1986) The use of synthetic oligonucleotides as a specific hybridization probe in the diagnosis of genetic disorders. In: Davies, K.E. (ed.) *Human Genetic Diseases; A Practical Approach*. IRL Press, Oxford. 33-50
- Trivers, R.L. (1972) Parental investment and sexual selection. In: Campbell, B.G. (ed.) *Sexual Selection and the Descent of Man*. Aldine, Chicago. 137-179
- Tsao, S.G.S., Clifford, F.B. & Pearlman, R.E. (1983) Hybridization of nucleic acids directly in agarose gels. *Analytical Biochemistry* 131: 365-372
- Verboven, N. & Mateman, C. (1997) Low frequency of extra-pair fertilizations in the Great Tit *Parus major* revealed by DNA fingerprinting. *Journal of Avian Biology* 28: 231-239
- Wade, M.J. & Arnold, S.J. (1980) The intensity of sexual selection in relation to male sexual behavior, female choice and sperm precedence. *Animal Behaviour* 28: 446-461
- Wagner, R.H. (1992) The pursuit of extra-pair copulations by monogamous female razor-bills: how do females benefit? *Behavioural Ecology and Sociobiology* 29: 455-464
- Weatherhead, P.J., Montgomerie, R., Bibbs, H.L. & Boag, P.T. (1994) The cost of extra-pair fertilizations to female Red-winged Blackbirds. *Proceedings of the Royal Society of London B* 258: 315-320
- Weatherhead, P.J. (1997) Breeding synchrony and extra-pair mating in red-winged blackbirds. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 40: 151-158
- Weatherhead, P.J. & Yezerinac, S.M. (1998) Breeding synchrony and extra-pair mating in birds. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 43: 217-219
- Weatherhead, P.J. (1999) Sequential mating patterns suggest extra-pair mating is not part of a mixed reproductive strategy by female red-winged blackbirds. *Proceedings of the Royal Society of London B* 266: 1027-1031
- Weber J.L. (1990) Informativness of human (dC-dA)_n o (dG-dT)_n polymorphisms. *Genetics* 7: 524-530

- Webster, M.S., Chuang-Dobbs, H.C. & Holmes, R.T. (2001) Microsatellite identification of extrapair sires in a socially monogamous warbler. *Behavioral Ecology* 12: 439-446
- Westneat, D.F. (1990) Genetic parentage in the Indigo Bunting: A study using DNA fingerprinting. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 27: 67-76
- Westneat, D.F., Sherman, P.W. & Morton, M.L. (1990) The ecology and evolution of extra-pair copulations in birds. *Current Ornithology* 7: 331-369
- Westneat, D.F. & Webster, M.S. (1994) Molecular analysis of kinship in birds: Interesting questions and useful techniques. In: Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G.P. & DeSalle, R. (eds.) *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. Birkhäuser, Basel, 91-126
- Westneat, D.F. & Sherman, P.W. (1997) Density and extra-pair fertilizations in birds: a comparative analysis. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 41: 205-215
- Westneat, D.F. & Gray, E.M. (1998) Breeding synchrony and extrapair fertilizations in two populations of red-winged blackbirds. *Behavioral Ecology* 9: 456-464
- Wetton, J.H., Carter, R.E., Parkin, D.T. & Walters, D. (1987) Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature* 327: 147-149
- Wetton, J.H. & Parkin, D.T. (1991) An association between fertility and cuckoldry in the house sparrow, *Passer domesticus*. *Proceedings of the Royal Society of London B* 245: 227-233
- White, T.J., Arnheim, N. & Ehrlich, H.A. (1989) The polymerase chain reaction. *Trends in Genetics* 5: 185-189
- Whittingham, L.A. & Dunn, P.O. (2001) Survival of extrapair and within-pair young in tree swallows. *Behavioral Ecology* 12: 496-500
- Williams, G.C. (1975) *Sex and Evolution*. Princeton University Press, Princeton
- Winkel, W. (1970) Hinweise zur Art- und Altersbestimmung von Nestlingen höhlenbrütender Vogelarten anhand ihrer Körperentwicklung. *Vogelwelt* 91: 52-59
- Winkel, W. (1975) Vergleichend-brutbiologische Untersuchungen an fünf Meisenarten (*Parus* spp.) in einem niedersächsischen Aufforstungsgebiet mit Japanischer Lärche *Larix leptolepis*. *Vogelwelt* 96: 41-63 und 104-114
- Winkel, W. (1996) Das Braunschweiger Höhlenbrüterprogramm des Instituts für Vogelforschung „Vogelwarte Helgoland“. *Vogelwelt* 117: 269-275
- Wittenberger, J.F. & Tilson, R.L. (1980) The evolution of monogamy: Hypotheses and evidence. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 11: 197-232
- Wrege, P.H. & Emlen, S.T. (1987) Biochemical determination of parental uncertainty in white-fronted bee-eaters. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 20: 153-160

- Wright, J. & Cotton, P.A. (1994) Experimentally induced sex differences in parental care: an effect of certainty of paternity? *Animal Behaviour* 47: 1311-1322
- Yezerinac, S.M., Weatherhead, P.J. & Boag, P.T. (1995) Extra-pair paternity and the opportunity for sexual selection in a socially monogamous bird (*Dendroica petechia*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 37: 179-188
- Yom-Tov, Y. (1980) Intraspecific nest parasitism in birds. *Biological Reviews* 55: 93-108
- Zahavi, A. (1975) Mate selection: a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology* 53: 205-214
- Zeh, J.A. & Zeh, D.W. (1996) The evolution of polyandry. 1. Intra-genomic conflict and genetic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society of London B* 263: 1711-1717
- Zeh, J.A. & Zeh, D.W. (1997) The evolution of polyandry. 2. Post-copulatory defences against genetic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society of London B* 264: 69-75

8 Anhänge

Anhang A

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abkürzungen für Einheiten aus dem „Internationalen Einheitensystem“ (SI-Einheiten) und für daraus abgeleitete Einheiten werden an dieser Stelle nicht aufgeführt. Dasselbe gilt für die Abkürzungen der chemischen Elemente des Periodensystems und für Abkürzungen, die für den Organismus stehen, aus dem die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme isoliert wurden.

A	Adenin	PCR	Polymerasekettenreaktion (P olymerase c hain r eaction)
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser (A qua b idestillata)	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (p on- d us h ydrogenii)
APS	A mmonium p eroxodisulfat	p.a.	p er A nalyse
ATP	A denosin t ri p hosphat	pmol	p icomol
bp	Basenpaar (b ase p air)	rpm	Umdrehungen pro Minute (r ounds p er m inute)
BSA	Rinderserumalbumin (b ovine s erum a lbumin)	SDS	Natriumdodecylsulfat (S odium d ode- c ylsulphat)
C	Cytosin	SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat (S odi- u mchlorid- S odium c itrat)
ccd-Gen	control of cell d eath-Gen	SSPE	Natriumchlorid-Natriumphosphat- E DTA-Puffer (S odiumchlorid- S odium p hosphat- E DTA)
cpm	Anzahl radioaktiver Zerfälle pro Min- ute (counts p er m inute)	T	T hymin
CTP	C ytosin t ri p hosphat	TBE	T ris- B orat- E DTA-Puffer
DEAE	D iethyl a minoethylcellulose	TE	T ris- E DTA-Puffer
DMSO	D imethylsulfoxid	TEMED	N,N,N',N' - T etramethylethylendiamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (D esoxyribo- n ucleic a cid)	Tris	T ris(hydroxymethyl)aminomethan
dNTP	D esoxyribonukleinsäure t ri p hosphat	U	internationale Enzimeinheit (u nit)
E. coli	E cherichia c oli	UV	u ltraviolette s Licht
EDTA	E thylendiamintetraacetat	Vol.	V olumen
G	Guanin	v/v	Volumen pro Volumen (v olu- m e/ v olume)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyransoid	w/v	Gewicht pro Volumen (w eight/ v olume)
kb	K ilobasen		
LB-Agar	L uria B ertani-Agar		
M, mM	M olar (Mol pro Liter), m illimolar (Millimol pro Liter)		

Anhang B

Verzeichnis der verwendeten Lösungen und Chemikalien

Aufgeführt werden im folgenden in alphabetischer Reihenfolge nur solche Lösungen und Chemikalien, deren Herstellung bzw. Verwendung nicht in den Anleitungen bzw. Handbüchern der benutzten Kits und Geräte angegeben ist und die zudem von besonderer Wichtigkeit für einzelne Arbeitsschritte sind. Rezepte für nicht aufgeführte Lösungen finden sich in jedem entsprechend ausgestatteten Laborbereich und der betreffenden Fachliteratur (z.B. Sambrook *et al.* 1989).

APS-Puffer:	10% (w/v) Na ₂ EDTA, 1% (w/v) NaF, gesättigt mit Thymol; pH 8,0
Chloroform/Isoamylalkohol:	24 Vol. Chloroform : 1 Vol. Isoamylalkohol
Denaturierungslösung:	0,15 M NaCl ₂ , 0,5 M NaOH
Denhardt´s Lösung (100x):	2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 2% (w/v) BSA, 2% (w/v) Ficoll (Typ 400)
Elutionspuffer I:	1x TE; pH 8,0
Elutionspuffer II:	0,2 M NaCl ₂ in 1x TE; pH 8,0
Elutionspuffer III:	0,5 M NaCl ₂ in 1x TE; pH 8,0
Ethidiumbromid-Stammlösung:	10 mg Ethidiumbromid/ml A. bidest.
Gelladepuffer (6x):	0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylen Cyanol FF, 30% (w/v) Glycerin
Gesättigte NaCl ₂ -Lösung:	ca. 6 M NaCl ₂
Hybridisierungslösung:	5x SSPE, 5x Denhardt´s Lösung, 0,1% (w/v) SDS, 10 µg/ml <i>E. coli</i> DNA (fragmentiert und denaturiert)
Kinasepuffer (10x):	670 mM Tris, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM Dithiothreitol; pH 8,0
Na-Acetat:	3 M (falls notwendig eingestellt auf den jeweiligen pH-Wert)
Na-Hypochloridlösung:	12-14% (v/v) Na-Hypochlorid, 86-88% (v/v) A. bidest.
Neutralisierungslösung:	0,15 M NaCl ₂ , 0,5 M Tris; pH 8,0
Präparationspuffer A:	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0); vor Gebrauch mit RNase (400 µg/ml) und Lysozym (2 mg/ml) versehen
Präparationspuffer B:	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
Präparationspuffer C:	2,55 M K-Acetat; pH 4,8
Proteinase K-Puffer:	20 mM Tris, 4 mM Na ₂ EDTA, 100 mM NaCl ₂ ; pH 7,4
Proteinase K-Stammlösung:	10 mg Proteinase K/ml A. bidest.
SDS:	10% (w/v A. bidest.)
SSC (6x):	0,9 M NaCl ₂ , 90 mM Na ₃ -Citrat; pH 7,0
SSPE (20x):	3 M NaCl ₂ , 0,2 M Na ₂ HPO ₄ , 20 mM Na ₂ EDTA; pH 7,4
TBE-Puffer (1x):	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM Na ₂ EDTA; pH 8,3
TE-Puffer (1x):	10 mM Tris, 1 mM Na ₂ EDTA; pH 8,0