



UNIVERSITÄT FÜR BODENKULTUR WIEN

# Masterarbeit

## Genetische Diversität und Populationsstruktur der Auerhuhn-Vorkommen (*Tetrao urogallus*) in Vorarlberg

verfasst von

Laura-Marie KETZMERICK, B.Sc.

im Rahmen des Masterstudiums

Wildtierökologie und Wildtiermanagement

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

Wien, Monat 2022

Betreut von:

Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat. techn. Christian Stauffer  
Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz  
Department für Wald- und Bodenwissenschaften

Mitbetreut von:

Assoc. Prof. Priv.-Doz. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Ursula Nopp-Mayr

Institut für Wildbiologie und Jagdwirtschaft (IWJ)

Department für Integrative Biologie und Biodiversitätsforschung

Dr.nat.techn. Florian Kunz

Institut für Wildbiologie und Jagdwirtschaft (IWJ)

Department für Integrative Biologie und Biodiversitätsforschung

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich diese Masterarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Gedanken, die im Wortlaut oder in grundlegenden Inhalten aus unveröffentlichten Texten oder aus veröffentlichter Literatur übernommen wurden, sind ordnungsgemäß gekennzeichnet, zitiert und mit genauer Quellenangabe versehen.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher weder ganz noch teilweise in gleicher oder ähnlicher Form an einer Bildungseinrichtung als Voraussetzung für den Erwerb eines akademischen Grades eingereicht. Sie entspricht vollumfänglich den Leitlinien der Wissenschaftlichen Integrität und den Richtlinien der Guten Wissenschaftlichen Praxis.

Ort, Datum

Laura-Marie KETZMERICK (eigenhändig)

*Für Omi.*

## Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Betreuer Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat. techn. Christian Stauffer und meinen Co-Betreuer\*innen Assoc. Prof. Priv.-Doz. Dipl.-Ing. Dr.nat. techn. Ursula Nopp-Mayr und Dr.nat. techn. Florian Kunz für die konstante Unterstützung bedanken. Für die Unterstützung bei der Laborarbeit bin ich Susanne Krumböck dankbar.

Zusätzlich möchte ich mich bei meinen Tharandter-Laborfreund\*innen bedanken, ohne eure Unterstützung hätte ich schon meinen Bachelor nicht geschafft. Danke Jens, dass ich dich immer alles fragen kann, danke euch fürs Mut machen und dafür, dass ich durch euch die Freude im wissenschaftlichen Arbeiten gefunden habe.

Schließlich möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freund\*innen bedanken, für all die Zeit, all die Nerven und die emotionale Unterstützung. Danke Hanna und Hexe, dass ihr mich liebt und ausgehalten habt.

## Abstract

The Austrian Western Capercaillie (*Tetrao urogallus*) populations are among the largest in Central Europe. Due to its endangerment, the species is a target species of the EU Birds Directive and plays an important role in nature conservation planning due to its characteristics as an indicator and umbrella species. The aim of this study is to assess the genetic diversity and population structure of Western Capercaillie populations in Vorarlberg. This Master's thesis addresses the following questions: (1) How is the genetic diversity of the Capercaillie population in Vorarlberg? (2) Do the different areas show differences in their genetic diversity and is it possible to delimit the areas on this basis? (3) Can the individual geographically definable areas be assigned into genetic clusters? (4) Can hybrid zones be identified which represent important migration corridors? (5) Do individual subpopulations show higher inbreeding values compared to the others? The genetic analysis was carried out on non-invasive samples by amplifying twelve microsatellites, using four multiplex PCRs. Sex differentiation is done by a separate PCR. The analysis of genetic diversity is carried out using multivariate analyses, and the population structure is examined using the STRUCTURE software package. Overall, the results showed a high genetic diversity of Western Capercaillie occurrences in Vorarlberg, with barely any differences found between subpopulations. In addition, the data indicate a population structure, whereby a significant differentiation of the subpopulations could be observed. No evidence of inbreeding was found in any of the subpopulations. With the help of these results, an important basis for future Capercaillie management in Vorarlberg is created.

## Kurzfassung

Die österreichischen Auerhuhn-Vorkommen (*Tetrao urogallus*) gehören zu den größten in Zentraleuropa. Die Art ist aufgrund ihrer Gefährdung eine Zielart der EU-Vogelschutzrichtlinie und spielt durch ihre Eigenschaften als Indikator- und Schirmart eine wichtige Rolle in der Naturschutzplanung. Ziel dieser Arbeit ist es, die genetische Diversität und die Populationsstruktur der Auerhuhn-Vorkommen in Vorarlberg zu erheben. Im Rahmen dieser Masterarbeit werden folgende Fragestellungen bearbeitet: (1) Wie hoch ist die genetische Diversität der Auerhuhnpopulation in Vorarlberg? (2) Zeigen die verschiedenen Gebiete Unterschiede in ihrer genetischen Diversität und ist eine Abgrenzung der Gebiete aufgrund dessen möglich? (3) Lassen sich die einzelnen geographisch abgrenzbare Gebiete in genetische Cluster einteilen? (4) Können Hybridzonen festgestellt werden, welche wichtigen Korridore der Migration darstellen? (5) Zeigen einzelne Teilpopulationen im Vergleich zu den anderen höhere Inzuchtwerte? Die genetische Analyse erfolgte durch die Amplifizierung von zwölf Mikrosatelliten, mittels vier Multiplex PCRs. Die Geschlechtsunterscheidung erfolgt über eine gesonderte PCR. Die Analyse der genetischen Diversität erfolgt mit Hilfe von multivariaten Analysen, die Populationsstruktur wird mittels des Softwarepakets STRUCTURE untersucht. Die Ergebnisse zeigten insgesamt eine hohe genetische Diversität der Auerhuhn-Vorkommen in Vorarlberg, wobei kaum Unterschiede zwischen den Subpopulation festgestellt werden konnten. Zudem weisen die Daten auf eine Populationsstruktur hin, wobei durchaus eine signifikante Differenzierung der Subpopulationen beobachtet werden konnte. In keiner der Subpopulationen konnten Hinweise auf Inzucht gefunden werden. Mit Hilfe dieser Ergebnisse wird eine wichtige Grundlage für das zukünftige Auerhuhnmanagement in Vorarlberg geschaffen.

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung .....	1
1.1.	Das Auerhuhn .....	1
1.2.	Naturschutzstatus des Auerhuhns .....	2
1.3.	Die Situation in Vorarlberg .....	2
1.4.	Naturschutzgenetik des Auerhuhns .....	3
2.	Ziel der Arbeit und Forschungsfragen .....	6
3.	Material und Methoden .....	7
3.1.	Studiengebiet und Probensammlung .....	7
3.2.	Mikrosatellitenauswahl .....	7
3.3.	DNS-Extraktion und Amplifikation der Mikrosatelliten .....	8
3.4.	Genotypisierung .....	10
3.5.	Analyse der genetischen Diversität .....	11
3.6.	Analyse der Populationsstruktur .....	11
4.	Ergebnisse .....	13
4.1.	Extraktions- und Amplifikationserfolg .....	13
4.2.	Prüfen auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, Kopplungsungleichgewicht und Identitätswahrscheinlichkeit .....	13
4.3.	Genetische Diversität pro Locus .....	14
4.4.	Genetische Diversität pro Subpopulation .....	15
4.5.	Populationsstruktur .....	16
5.	Diskussion .....	19
6.	Schlussfolgerung .....	22
7.	Quellen .....	23



# 1. Einführung

## 1.1. Das Auerhuhn

Das Auerhuhn (*Tetrao urogallus*) gehört zu der Ordnung der Hühnervögel (Galliformes), der Familie der Fasanartigen (Phasianidae) und gemeinsam mit den drei anderen in Österreich heimischen Arten – Birkhuhn (*Lyrurus tetrix*), Alpenschneehuhn (*Lagopus muta*) und Haselhuhn (*Tetrastes bonasia*) - zu der Unterfamilie der Raufußhühner (Tetraoninae). Der Lebensraum des Auerwilds erstreckt sich über die boreale Nadelwaldzone Nord- & Osteuropas und die hochmontanen Wälder der Alpen, sowie der Mittelgebirge Zentraleuropas (Storch 2007a; Coppes et al. 2015). Das Auerhuhn weist ein eher geringes Dispersionspotential auf. Dieses beträgt für adulte Tiere ca. 1-2 km, bei juvenilen Tieren werden Distanzen von <10 km angenommen. Aufgrund dessen braucht es eine gute Vernetzung von geeigneten Lebensraumbereichen, u.a. auch durch Trittsteine. (Storch und Segelbacher 2000). Die Art benötigt lichte zusammenhängende Waldbestände (>20 ha), welche eine horizontale und vertikale Strukturvielfalt aufweisen. Diese sollten einen hohen Altholzanteil (25-30%) und eine vielfältige Bodenvegetation aufweisen. Waldbestände, welche zudem ca. 2/3 Nadelholzanteil, einen geringen Kronenschlussgrad (<60-70%) und Grenzlinien (zw. Altholz & Jungwuchs) aufweisen bieten, optimale Bedingungen (Bollmann et al. 2005). Die Nahrung der Vögel unterscheidet sich je nach Jahreszeit, Lebensphase und Vorkommensgebieten. Die Küken sind bis zur 3. Lebenswoche auf tierische Kost angewiesen. Adulte Tiere ernähren sich hauptsächlich herbivor, im Sommer von der Bodenvegetation (Blätter, Knospen, Früchte) und im Winter im Wesentlichen von Knospen und Nadeln verschiedener Bäume (*Pinus spec.*, *Picea spec.*, *Abies spec.*, *Fagus spec.*). Die Balzzeit liegt je nach Höhenlage und Witterungsverlauf zwischen März und Mai, wobei es sich um eine Arenabalz handelt (Klaus und Bergmann 2020).

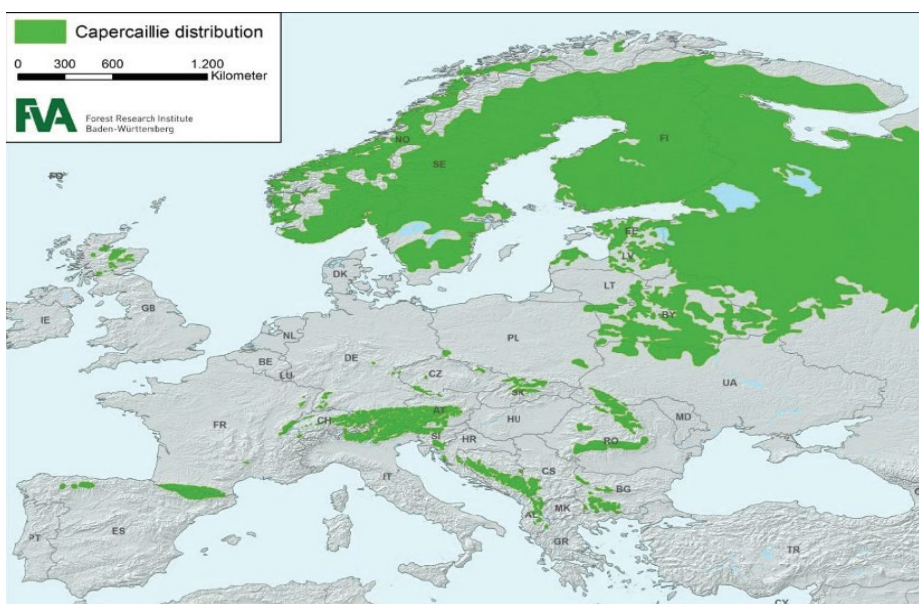


Abb. 1: Verbreitung von *Tetrao urogallus* in Europa (Coppes et al. 2015)

## 1.2. Naturschutzstatus des Auerhuhns

Der Schutzstatus des Auerhuhns unterscheidet sich je nach Gebiet stark. Die großen zusammenhängenden Vorkommen in Nord-Ost-Europa lassen sich kaum mit den fragmentierten Gebieten Zentraleuropas vergleichen (Storch 2007b). Laut der Roten Liste Österreich gilt die Art als gefährdet (VU) und ist sowohl in der Vogelschutzrichtlinie (Anhang I, II/2, III/2) als auch in der Berner Konvention (Anhang III) gelistet (europäisches Parlament 2009). In der „IUCN Red List“ ist die Art jedoch als „least concern“ (LC) gelistet (BirdLife International 2021). Die ökologische Bedeutung des Auerhuhns liegt in seiner Rolle als Indikator- und Schirmart. Es ist Indikatorart für lichte, großflächig zusammenhängende und strukturierte boreale / montane Waldlebensräume (Suter et al. 2002; Pakkala et al. 2003). Das Auerhuhn fungiert als Schirmart für mehrere gefährdete Bergwald-spezialisierte Vogelarten (z. B. Birkhuhn *Tetrao tetrix*, Sperlingskauz *Glaucidium passerinum*, Dreizehenspecht *Picoides tridactylus*). Diese kommen in Gebieten mit Auerhuhn-Vorkommen häufiger vor und die Vogelgemeinschaften sind artenreicher als in Gebieten ohne Auerhühner (Pakkala et al. 2003; Ellmayer 2005). Dies ist durch die ähnlichen Lebensraumsprüche der Arten zu erklären. Die Verantwortung des Landes Österreich für den Schutz des Auerhuhns lässt sich durch folgende Punkte zusammenfassen: Die österreichischen Auerhuhn-Vorkommen gehören zu den größten in Zentraleuropa, es ist eine Zielart der EU-Vogelschutzrichtlinie und aufgrund seiner Eigenschaften als Indikator- und Schirmart spielt es eine wichtige Rolle in der Naturschutzplanung (Ellmayer 2005). Um den Schutzstatus der Art für die einzelnen Vorkommen abschätzen zu können ist ein umfassendes Wissen um diese von hoher Bedeutung.

## 1.3. Die Situation in Vorarlberg

Seit 1977 ist das Auerwild in Vorarlberg ganzjährig geschont, seitdem hat die Meldung von Nachweisen nachgelassen (Grünschachner-Berger und Pfeifer 2020). Ob dies am sinkenden Interesse, oder an tatsächlich sinkenden Bestandeszahlen liegt, ist unklar (Grünschachner-Berger und Pfeifer 2020; Grünschachner-Berger et al. 2021). Die letzte Bestandserhebung fand im Jahr 2018, jedoch mit geringen Rücklaufquoten, durch die Vorarlberger Jäger\*innenschaft statt (Grünschachner-Berger und Pfeifer 2020). Eine Karte zur historischen Verbreitung der Auerhühner in Vorarlberg stammt von Josef Henrich aus dem Jahr 1928. Die von ihm beschriebenen Kerngebiete wurden durch Nachweismeldungen immer wieder bestätigt und die Vermutung liegt nahe, dass diese auch heute die größten Auerhuhn-Vorkommen aufweisen. Für das Land Vorarlberg liegt eine Karte des langfristig landschaftsökologischen Habitatpotentials für Auerhühner vor, mit dieser und Begehungen wurde eine Fläche von ca. 600ha mit Potential für Quellpopulationen ausgewiesen (Grünschachner-Berger et al. 2021). Es existieren also keine aktuellen Daten zur Populationsstruktur und der genetischen Diversität der Auerhuhn-Vorkommen in Vorarlberg, diese sollen im Rahmen meiner Arbeit erstmals erhoben werden. Dies geschieht im Rahmen eines landesweiten Projekts zur Sicherung des Auerwilds in Vorarlberg,

welches in Zusammenarbeit des Landes Vorarlberg (Abteilung Umwelt- und Klimaschutz + Forstwirtschaft und Landwirtschaft), der Vorarlberger Jäger\*innenschaft, Stiftung „Gamsfreiheit“, Birdlife Vorarlberg, dem Natura2000-Regionsmanagement und einem Team von Wildökolog\*innen realisiert wird. Das übergeordnete Ziel dieses Projektes ist die Zustandserhebung der Auerhuhnvorkommen, sowie langfristig die Sicherung eines überlebensfähigen Auerhuhnvorkommens und eine Vernetzung der vorhandenen Vorkommen. Hierfür ist ein Überblick über die genetische Situation der bestehenden Bestände nötig um Fragen nach der genetischen Vielfalt, möglichen Isolationseffekten zwischen den verschiedenen Teilpopulationen und der Relevanz von Korridoren und Trittsteinen für die Zukunft zu beantworten. Mit Hilfe dieser Daten soll anhand eines lokalen Maßnahmenkatalogs eine wichtige Grundlage für das zukünftige Management geschaffen werden (Grünschachner-Berger und Pfeifer 2020; Grünschachner-Berger et al. 2021) um der schon oben genannte Verantwortung des Landes Österreich für den Schutz des Auerhuhns nachzukommen.

#### 1.4. Naturschutzgenetik des Auerhuhns

Naturschutzgenetik hat zum Ziel, Arten als dynamische Einheiten zu erhalten, welche sich an Umweltveränderungen anpassen können. Hierzu gehört unter anderem das genetische Management kleiner Populationen, die Definition von Managementeinheiten innerhalb von Arten und die Steigerung des Verständnisses der Biologie von Arten. Naturschutzgenetik trägt als Monitoringverfahren für das Naturschutzmanagement zum Schutz der biologischen Vielfalt bei (Frankham et al. 2002). Der anthropogen verursachte Klimawandel und die durch den Menschen hervorgerufene Veränderung der Lebensräume werden als die bedeutendste Bedrohung der biologischen Vielfalt gesehen. Für Schutz- und Erhaltungsmanagement ist es nötig den Zustand von Ökosystemen zu überwachen und zu bewerten, hierfür sind einzelne Schirmarten eine kosteneffiziente Strategie. Das Auerhuhn scheint, aufgrund seiner komplexen und spezifischen Lebensraumanforderungen und der Möglichkeit der nichtinvasiven Probenahme, als Schirmart geeignet zu sein (Pakkala et al. 2003; Regnaut et al. 2006; Andesner et al. 2021). Es werden genetische Methoden genutzt, um für den Schutz der Zielart wichtige Kennwerte zu erfassen. Hierfür müssen im ersten Schritt die genetischen Unterschiede zwischen Individuen festgestellt werden. Dies geschieht mittels Allel-Bestimmung anhand von genetischen Markern. Mikrosatelliten werden als genetisch neutrale Marker bezeichnet. Diese sind kurze, sich wiederholende DNS-Sequenzen. Für die Ermittlung des Genotyps der Individuen wird eine Anzahl von 10-20 Mikrosatelliten empfohlen (Balkenhol et al. 2016). Der Vorteil dieser Art von Markern liegt in ihrer hohen Variabilität, hierdurch kann mit einer geringen Anzahl von Markern eine gute Unterscheidung der Individuen ermöglicht werden. Mikrosatelliten decken jedoch nicht das gesamte Genom ab, da sie in den neutralen Bereichen des Genoms liegen, deswegen lässt sich beispielsweise die Anpassung an Umweltveränderungen nicht erfassen. Mit Hilfe der neutralen Marker lassen sich jedoch eine Vielzahl von Kennwerten und Prozessen erfassen, welche für die Naturschutzgenetik von Bedeutung sind (Balkenhol et al. 2016).

Die genetische Differenzierung der Auerhuhn-Vorkommen verläuft, in unterschiedlichen Stadien, entlang eines räumlichen Gradienten. Dies ist drauf zurückzuführen, dass die Art in Europa fragmentarisch verbreitet ist, da der stetige Rückgang der Populationen in Mittel- und Westeuropa ausgeprägter ist als in den borealen Wäldern der Paläarktis (Segelbacher et al. 2003). Dies ist darin begründet, dass die Wälder stärker fragmentiert sind und die Forstwirtschaft deutlichen Veränderungen unterworfen ist (Zohmann et al. 2014). Die südliche Grenze des Verbreitungsgebietes ist durch dicht besiedelte Regionen gekennzeichnet hieraus ist zu schließen, dass die anthropogene Landnutzung und die daraus resultierende Habitatfragmentierung einen entscheidenden Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der dortigen Auerhuhnpopulationen hat (Segelbacher und Storch 2002; Storch 2007b). Die kontinuierlichen Verbreitungsgebiete der borealen Wälder stellen Bereiche mit hoher Konnektivität, geringer genetischer Differenzierung und hoher genetischer Vielfalt dar. Im Gegensatz dazu stehen die kürzlich isolierten Vorkommen in Mitteleuropa und die länger isolierten Vorkommen der Pyrenäen, diese stellen Bereiche mit geringer Konnektivität, höherer genetischer Differenzierung und geringerer genetischer Vielfalt dar. Die Meta-Populationssysteme der Alpen nehmen eine Zwischenstellung ein, hier ist die genetische Differenzierung höher als in den Bereichen mit hoher Konnektivität, jedoch geringer als in den isolierten Vorkommen. Ähnlich verhält es sich mit der genetischen Vielfalt, welche in den Alpen höher ist als in den isolierten Vorkommen, jedoch geringer als in den kontinuierlichen Verbreitungsgebieten (Segelbacher et al. 2003). Trotz dieser Erkenntnisse zeigen sich auch in den isolierten Vorkommen der Jura-Pyrenäenpopulation weder Anzeichen für Inzucht noch für reduzierte genetische Vielfalt; dies deutet darauf hin, dass die Vorkommen ein Potential für ein langfristiges Überleben haben, sollte der Populationsrückgang gestoppt werden (Regnaut 2004). Ähnliches gilt für die Auerhuhn-Vorkommen im Schwarzwald, auch hier zeigte sich eine flache genetische Struktur und trotz eines drastischen Populationsrückgangs von >90% keine signifikante Abnahme der genetischen Vielfalt (Segelbacher et al. 2008). Eine aktuelle Studie aus dem Schwarzwald fand eine Zunahme der genetischen Differenzierung und weist damit auf eine eingeschränkte Migration in Verbindung mit einer zurückgehenden funktionalen Konnektivität der Subpopulationen hin (Kunz et al. 2021). In den Metapopulationssystemen der Alpen zeigte sich in allen Populationen ein hohes Maß an genetischer Vielfalt, wenn auch Hinweise auf einen rezenten Populationsrückgang gefunden werden konnten. Dieser Populationsrückgang führte zu einem verringerten Genfluss und einer Differenzierung der Populationen durch genetischen Drift; aufgrund der hohen genetischen Variation ist darauf zu schließen, dass es sich um einen kurzfristig aufgetreten Prozess handelt (Segelbacher und Storch 2002). Metapopulation meint hier eine Gruppe von Subpopulationen, welche miteinander in eingeschränktem genetischen Austausch steht (Frankham et al. 2002). Eine genetische Studie zu den Auerhuhnvorkommen in Rumänien ist zu einem ähnlichen Ergebnis gekommen, auch hier zeigte sich eine flache Populationsstruktur, was auf einen ausreichend vorhandenen Genfluss zwischen den Gebieten hindeutet (National Institute for Research and Development in Forestry "Marin Drăcea": Brasov, Brasov, RO et al. 2021).

Rückschlüsse von der Habitatfragmentierung auf eine verringerte genetische Vielfalt sollten also mit Vorsicht gezogen und auf verschiedenen zeitlichen Ebenen überprüft werden (Segelbacher et al. 2008; Kunz et al. 2021). Die anthropogen verursachte Veränderung und Fragmentierung von Habitaten hat genetische und evolutionsbiologische Folgen für die vorhandenen Populationen. Um diese zu schützen ist es nötig, gerade in fragmentierten Lebensräumen, ein hohes Maß an genetischer Vielfalt zu erhalten. Hierfür sollte das Augenmerk von Schutzmaßnahmen auf der Verbindung von räumlich getrennten Populationen liegen (Segelbacher et al. 2003; Kunz et al. 2021).

## 2. Ziel der Arbeit und Forschungsfragen

Ziel dieser Arbeit ist es, erstmals die genetische Diversität und die Populationsstruktur der Auerhuhn-Vorkommen in Vorarlberg zu erheben. Hierfür wurden folgende, in zwei Themenschwerpunkte unterteilte, Forschungsfragen gestellt:

### (1) Genetische Diversität

(1a) Wie hoch ist die genetische Diversität der Auerhuhnpopulation in Vorarlberg?

(1b) Zeigen die verschiedenen Gebiete Unterschiede in ihrer genetischen Diversität und ist eine Abgrenzung der Gebiete aufgrund dessen möglich?

### (2) Populationsstruktur

(2a) Lassen sich die einzelnen geographisch abgrenzbaren Gebiete in genetische Cluster einteilen?

(2b) Können Hybridzonen festgestellt werden, welche wichtigen Korridore der Migration darstellen?

(2c) Zeigen einzelne Teilpopulationen im Vergleich zu den anderen höhere Inzuchtwerte?

Mit Hilfe der erhobenen Daten kann eine wichtige Grundlage für das zukünftige Management der Auerhuhnvorkommen in Vorarlberg geschaffen werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Studiengebiet und Probensammlung

Vorarlberg ist das westlichste Bundesland Österreichs mit einer Fläche von 2601 km<sup>2</sup>. Die Gebirge fallen in Richtung Norden steil ab. Ungefähr ein Drittel der Landesfläche ist bewaldet. In den tal- und sonnenseitigen Hanglagen dominieren Buchenmischwälder, den zweiten dominierende Waldtyp stellen die Fichtenbergmischwälder dar.

Die verwendeten nichtinvasiven Auerhuhn-Proben wurden im Januar 2021 (N=50) und Juni 2021 (N=161) durch Revierinhaber\*innen und Grundeigentümer\*innen in Vorarlberg gesammelt. Im Anschluss wurden alle Proben a priori in vier Subpopulationen eingeteilt. Die Einteilung der Subpopulationen erfolgte durch Dr. Veronika Grünschachner-Berger (WILDBIOLOGISCHES BÜRO/DDr. Veronika Grünschachner-Berger/Dürradmer 4a/8632 Mariazell), basierend auf den topographischen Begebenheiten, dem Dispersionspotential der Art (siehe Kapitel 1.1) und den historischen Vorkommensnachweisen (siehe Kapitel 1.3).

Tab. 1: A priori Einteilung der Subpopulationen - N bezieht sich auf die Anzahl der Proben

Nr.	Subpopulation	Abkürzung	Anzahl der Proben (N)
1	Vorarlberg – Süd (Montafon)	MON	32
2	Bürserberg	BUE	22
3	Bregenzer Wald	BRE	38
4	Allgäu	ALL	36

### 3.2. Mikrosatellitenauswahl

Die für das westliche Auerhuhn genutzten Mikrosatelliten stammen grundlegend aus zwei Studien. Zehn der auch von uns verwendeten Marker (TUD1 / TUD6 / TUT2 / TUD7 / TUD3 / TUT3 / TUD4 / TUT4 / TUT1 / TUD5) gehen aus einer Studie von Segelbacher (2000) hervor. In dieser Studie wurde eine mikrosatellitenreiche partielle genomische Bibliothek erstellt, die DNS hierfür stammte von einem adulten Auerhuhnweibchen. Die genetische Variabilität wurde bei  $\approx$  20 Individuen aus den europäischen Alpen untersucht. Bei den analysierten Loci konnte eine hohe Variabilität festgestellt werden, welche für populationsgenetische Studien genutzt werden kann (Segelbacher et al. 2000). Diese zehn Primerpaare wurden von Jacob (2010) neugestaltet, indem sie auf kürzere Fragmente abzielen. Diese wurden in dieser Arbeit genutzt (Jacob et al. 2010a). Die restlichen zwei genutzten Mikrosatelliten (BG15 / BG18) stammen von Piertney und Höglund (2001), hierbei wurden zehn Mikrosatelliten aus Birkhühnern (*Tetrao tetrix*) isoliert und durch ein Klonierungsverfahren charakterisiert. Bei 70 untersuchten Individuen konnte ein hohes

Maß an Heterozygotie und eine hohe Anzahl von Allelen ermittelt werden, damit können die Marker für populationsgenetische Studien genutzt werden (Piertney und Höglund 2001). Das in dieser Studie genutzte Mikrosatelliten-Set (TUD1 / TUD6 / TUT2 / TUD7 / TUD3 / TUT3 / TUD4 / TUT4 / TUT1 / TUD5 / BG15 / BG18) geht auf das Protokoll von Jacob et al. (2010) zurück. In dieser Studie wurden die lokalen Populationsgrößen an acht Standorten anhand von indirekten Methoden geschätzt und verglichen. Hierbei wurden die unterschiedlichen Raufußhuhnarten anhand der Mikrosatelliten-Loci BG15 und BG18 unterschieden (Jacob et al. 2010a). Um die genetischen Daten aus unterschiedlichen Studien zur genetischen Diversität und lokalen Populationsstruktur von Auerhühnern und Birkhühnern vergleichen zu können haben Andesner et al. 2021 einen Katalog von fünfzig Referenzallelen sowie von zwölf Mikrosatelliten-Loci und eine dazu gehörige anpassbare Allelleiter veröffentlicht. Hierdurch wird eine Standardisierung erreicht, welche überregionale Daten zum Raufußhuhn-Monitoring zusammenführen und damit einen wichtigen Beitrag zum länderübergreifenden Management der Arten leisten kann. In dieser Studie wurde mit acht der von uns genutzten Mikrosatelliten gearbeitet (TUT1 / TUT2 / TUT3 / TUT4 / TUD1 / TUD6 / BG15 / BG18). Drei der acht Loci (TUT2 / BG15 / BG18) wurden zur Artunterscheidung zwischen Birkhühnern und Auerhühnern genutzt (Andesner et al. 2021).

### 3.3. DNS-Extraktion und Amplifikation der Mikrosatelliten

Die DNS-Extraktion der Losungsproben erfolgte mittels dem QIAamp – Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), nach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll. Es wurden jedoch folgende Änderungen am Protokoll vorgenommen, um eine bessere Qualität der DNS zu gewährleisten: von den gefrorenen Losungsproben wurden dünne Späne geschnitten (1-2cm), diese wurden in 15ml Tubes mit 3ml Inhibiting Ex Buffer (Qiagen) vermischt. Die Losungsteile, welche mit Urinsäure bedeckt waren, wurden nicht verwendet, da diese PCR-Inhibitoren enthält (Khan et al. 1991). Die Lyse erfolgte anschließend über Nacht (ca. 12h) bei 55°C, nach erneutem Aufmischen der Proben wurden diese zentrifugiert (12min / 18°C / 5.000rpm). Von dem hierbei entstandenen Überstand wurden 1,6ml in ein 2ml-Tube überführt. Die folgenden Schritte erfolgten, bis zur DNS-Elution, wie im Hersteller-Protokoll beschrieben. Dieser letzte Schritt der Extraktion wurde zweimal hintereinander, mit jeweils 70µl ATE Buffer (Qiagen) und nach einer Inkubationszeit von 5min bei Raumtemperatur, ausgeführt.

Die Extraktion der Federn erfolgte mit dem GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten). Hierfür wurden im ersten Schritt kurze Stücke des Kiels sowie des Afterschafts geschnitten und 3 Minuten lang in einer Kugelmühle zerkleinert. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K wurden die Proben 24 h lang unter ständigem Schütteln inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten nach dem angepassten Standardprotokoll des Herstellers. Die Elution erfolgte zweimal hintereinander mit 50 µl und anschließend 30 µl der bereitgestellten Elutionslösung (Sigma-Aldrich) nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur.



Die DNS-Proben wurden mittels zwölf Mikrosatelliten-Loci analysiert. Die Amplifizierung von zwölf Mikrosatelliten erfolgte mittels vier multiplex PCRs mit je drei Primerpaaren.

Tab. 2: Mikrosatelliten nach Multiplex-PCR mit der jeweiligen Zyklen-Anzahl / Temperatur Primerhybridisierung

<b>Set A</b>	<b>Set B</b>	<b>Set C</b>	<b>Set D</b>
39 Zyklen / 56°C	37 Zyklen / 56°C	37 Zyklen / 56°C	39 Zyklen / 52°C
TUD1	BG15	TUD6	TUT2
TUD7	TUD3	TUT3	TUD4
TUT4	TUT1	TUD5	BG18

Der PCR-Mastermix enthält 5µl SuperHot Mastermix 2x (Genaxxon bioscience, Ulm, Deutschland), 1µl Primermix (enthält alle mit Lumineszenz gekennzeichneten vorwärts- und die nicht gekennzeichneten rückwärts-Primer des jeweiligen Sets), 3µl autoklaviertes und gefiltertes Wasser und 1µl der extrahierten DNS pro Probe (insgesamt 10µl). Der SuperHot Mastermix enthält: chemisch modifizierte Taq DNA-Polymerase, PCR-Puffer, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>. Er wurde entwickelt um die PCR nach einem 15min Aktivierungsschritt durch hohe Temperaturen (95°C) zu starten. Laut Hersteller garantiert dies reproduzierbare Ergebnisse und erhöht die Sensitivität der multiplex PCRs.

Die PCR-Zyklus-Konditionen unterscheiden sich zwischen den Sets jeweils nur in der Anzahl der Zyklen und der Temperatur der Primerhybridisierung (siehe Tab. 1). Jede der multiplex PCRs beginnt mit dem initialen Denaturierungs-Schritt (95°C/15min) gefolgt von den Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht: der Denaturierung der DNS (Aufspaltung Wasserstoff-Brücken-Bindungen der DNS bei 95°C/30sec), Primerhybridisierung (Temperatur Abhängig von verwendetem Primer / 1min – Primer binden jeweils an 3'-Ende der Gensequenz) und Amplifikation (Polymerase synthetisiert bei 72°C/1min von Primer aus in 5' – zu 3' – Richtung den komplementären Strang). Sind alle Zyklen abgeschlossen, folgte die finale Amplifikation (72°C/20min).

Die Geschlechterunterscheidung erfolgt über eine gesonderte PCR. Die hierfür genutzten Primer (1237L, 1272H) amplifizieren ein Intron im CHD-1-Gen, welches sich in seiner Größe auf dem Z- und W-Chromosom unterscheidet (Kahn et al. 1998). Der Mastermix enthielt 5,9µl autoklaviertes und gefiltertes Wasser, 1µl Buffer für DreamTaq (Thermo Scientific), BSA (1mg/ml) 1µl, dNTPs 0,2µl, Primer 2x 0,3µl (vorwärts/rückwärts), DreamTaq DNA-Polymerase 0,1µl und 1,2µl der extrahierten DNS pro Probe (insgesamt 10µl). Im Laufe der Laborversuche wurde von der DreamTaq DNA-Polymerase auf die OneTaq DNA-Polymerase (New England BioLabs) gewechselt. Hierfür wurde der Mastermix wie folgt angepasst: 4,93µl autoklaviertes und gefiltertes Wasser, 2µl Buffer für OneTaq (New England BioLabs), BSA (1mg/ml) 1µl, dNTPs 0,2µl, Primer 2x 0,3µl (vorwärts/rückwärts), OneTaq DNA-Polymerase 0,07µl und 1,2µl der extrahierten DNS pro Probe (insgesamt 10µl). Beide Polymerasen führten, mit beiden

Protokollen, zu auswertbaren Ergebnissen. Zwischen den beiden wurde kein Unterschied festgestellt.

Die PCR-Zyklus-Konditionen der DreamTaq DNA-Polymerase beginnen mit dem initialen Denaturierungs-Schritt (94°C/3min) gefolgt von 35 Zyklen. Die Denaturierung der DNS erfolgt bei 94°C/30sec, die Primerhybridisierung läuft bei 49°C/1min ab und die Amplifikation bei 72°C/1min. Sind alle Zyklen abgeschlossen, folgte die finale Amplifikation (72°C/10min). Die PCR-Zyklus-Konditionen der OneTaq DNA-Polymerase beginnen ebenfalls mit einem Initialen Denaturierungs-Schritt (94°C/2min), im Anschluss folgen die 35 Zyklen. Die Denaturierung der DNS erfolgt bei 94°C/30sec, die Primerhybridisierung läuft bei 49°C/30sec. ab und die Amplifikation bei 68°C/1min. Sind alle Zyklen abgeschlossen, folgte die finale Amplifikation (68°C/7min).

Zur Verhinderung von Kontaminationen wurden die DNS-Extraktion, die PCR-Vorbereitung und die Nachbereitung der Proben in drei unterschiedlichen Räumen durchgeführt. Jeder PCR-Ansatz enthielt mindestens eine Negativkontrolle ohne DNS, um auf Gesamtkontamination zu prüfen.

### 3.4. Genotypisierung

Die Fragmentlängenanalyse wurde von dem kommerziellen Anbieter „Comprehensive Cancer Center DNA Sequencing Facility“ in Chicago durchgeführt. Die Auswertung der Allellängen wurde mit Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems), unter Verwendung des Standards LIZ500 (GeneScan), durchgeführt. Da nichtinvasive Proben eine unterschiedliche Quantität und Qualität der DNS aufweisen und dies zu Genotypisierungsfehlern führen kann, wurden von allen Proben für alle vier multiplex PCR-Sets mindestens drei Wiederholungen angefertigt (Navidi et al. 1992; Taberlet 1996; Regnaut et al. 2006). Ein Genotyp wurde erfasst, wenn mindestens zwei von drei unabhängigen Wiederholungen die gleiche Allelkombination aufwiesen. Heterozygote Loci werden trotz des Fehlens eines Allels in einer der akzeptierten Wiederholungen als gesichert angesehen. Homozygote Loci hingegen müssen in allen akzeptierten Wiederholungen die gleiche Allelkombination aufweisen, da sonst die Unterscheidung zwischen einem falschen Allel (z.B. durch Kontamination) oder dem Ausfall eines Allels nicht möglich ist. Individuen, bei denen vier oder mehr Loci durch Amplifikationsfehler oder Unsicherheiten ausgefallen sind, wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen.

Da es bei der Bestimmung der Genotypen zu auffälligen Ausreißern bei den Mikrosatelliten BG15, BG18 und TUT2 kam, wurden diese genauer betrachtet (siehe Anhang, Abb.3/4/5). Die gefundenen Allele wurden mit den Referenzallelen und der Allelleiter von Andesner et al. (2021) verglichen, da in dieser Studie jene drei Mikrosatelliten für die Artunterscheidung zwischen Auerhuhn und Birkhuhn (*Tetrao tetrix*), genutzt wurden (Andesner et al. 2021)(siehe Anhang, Abb.6). Proben, welche an allen, oder zwei von drei Mikrosatelliten Auffälligkeiten zeigten,

wurden aus dem Datensatz ausgeschlossen, um eine Kontamination mit Birkhuhn-Proben zu vermeiden.

### 3.5. Analyse der genetischen Diversität

Mit Hilfe von GenAEx 6.51b2 (Peakall und Smouse 2006, 2012) wurden übereinstimmende Genotypen ermittelt, um sie von weiteren Analysen ausschließen zu können. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass Proben des selben Geschlechts und einer identischen Allelkombination an allen Mikrosatelliten-Loci von ein und demselben Individuum stammen. Ebenfalls mit GenAEx 6.51b2 wurde die Identitätswahrscheinlichkeit (PI) und die Identitätswahrscheinlichkeit für Geschwister ( $PI_{SIB}$ ) berechnet, um die Fähigkeit der verwendeten Mikrosatelliten, Individuen zu identifizieren, zu überprüfen. Um den Datensatz auf Genotypisierungsfehler wie Nullallele, Kurze-Allel-Dominanz und „Stottern“ zu überprüfen wurde Micro-Checker 2.2 (Van Oosterhout et al. 2004) verwendet. Dies ist nötig, da diese Art von Fehlern zu Abweichungen der Hardy-Weinberg-Verhältnisse führen kann. Die Webapplikation Genepop 4.7.5 (Raymond und Rousset 1995; Rousset 2008) wurde genutzt, um den Datensatz auf Abweichungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts und Kopplungsungleichgewicht zu überprüfen. Die folgenden zusammenfassenden Standardparameter der genetischen Diversität wurden mittels GenAEx 6.51b2 bestimmt: Anzahl der Allele (A), effektive Anzahl der Allele ( $A_E$ ), beobachtete Heterozygotie ( $H_O$ ), erwartete Heterozygotie ( $H_E$ ) und der Inzuchtgrad ( $F_{IS}$ ). Das Allelreichtum ( $A_R$ ), die Anzahl der Allele durch statistisches Verfahren (Rarefaktion) vereinheitlicht und damit unabhängig von der Stichprobengröße, wurde mit Fstat294 (Goudet 1995) (pro Locus) und HP-Rare (Kalinowski 2005) (pro Subpopulation) berechnet.

### 3.6. Analyse der Populationsstruktur

Zuerst wurden die F-Statistik und die paarigen  $F_{ST}$ -Werte mittels diveRsity (Version 1.9.89) (Keenan et al. 2013) berechnet (Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ ). Für die Berechnung der molekularen Varianz (AMOVA) wurde GenAEx 6.51b2 genutzt (Peakall und Smouse 2006, 2012). Mit Hilfe des in STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) implementierten systematischen Bayes'schen Clustering-Ansatz, wurden Cluster von Individuen aufgrund ihrer unterschiedlichen Genotypen identifiziert. Die Einstellungen hierfür waren sowohl für die Analysen mit und ohne LOCPRIOR-Informationen (a priori Einteilung der Subpopulationen) die folgenden: Admixture-Modell mit korrelierten Allelfrequenzen mit einem Burnin von 200.000 Wiederholungen, gefolgt von 600.000 Markov-Chain-Monte-Carlo (MCMC) Wiederholungen. Aufgrund der unterschiedlichen Stichprobengrößen wurde dem alternativen Abstammungsprinzip nach der Studie von Wang (2017) gearbeitet. Dieses lässt eine unterschiedliche Repräsentation der Ausgangspopulationen in der Stichprobe zu; so können selbst bei sehr ungleichen Stichproben genaue individuelle Zuordnungen erfolgen (Wang 2017).

Es wurden drei Versuche durchgeführt:

- a) Alle Individuen des Untersuchungsgebiets Vorarlberg (N=70) ohne LOCPRIOR-Informationen (K = 1-6 / Iterationen = 30)
- b) Individuen, welche eindeutig den vier a priori Subpopulationen zugeordnet werden konnten (N=64), ohne LOCPRIOR-Informationen (K = 1-6 / Iterationen = 30)
- c) Individuen, welche eindeutig den vier a priori Subpopulationen zugeordnet werden konnten (N=64), mit LOCPRIOR-Informationen (K = 1-4 / Iterationen = 30)

Die Ergebnisse dieser Versuche wurden mit der Web-Applikation STRUCTURE Harvester (Earl und vonHoldt 2012) auf die wahrscheinlichste Anzahl an Subpopulationen (K) geprüft. Das Programm bewertet und visualisiert die Likelihood-Werte über die angenommene Anzahl der Cluster und Iterationen. Die Anzahl der genetischen Gruppen, welche am besten zu dem eingegeben Datensatz passt, zeichnet sich durch den höchsten  $\Delta K$  Wert aus (Evanno et al. 2005). Es wurden auch die Werte für die nächsthöhere Anzahl an genetischen Gruppen berücksichtigt, da diese weiterführende Informationen der genetischen Zugehörigkeit liefern. Mit Hilfe der Web-Applikation CLUMPAK (Kopelman et al. 2015) wurden die Mittelwerte über alle Iterationen berechnet und die Daten mittels Balkendiagrammen visualisiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Extraktions- und Amplifikationserfolg

Die verwendeten Auerhuhn-Proben wurden im Januar 2021 (N=50) und Juni 2021 (N=161) in Vorarlberg gesammelt. Aus den 211 DNS-Extraktionen konnten 156 Genotypen abgeleitet werden, da 55 Proben aufgrund von Amplifikationsfehlern durch DNS-Degradation exkludiert wurden. Von diesen 156 Genotypen wurden, aufgrund der Annahme, dass es sich um Birkhuhn-Proben handelt, noch einmal 32 Proben von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Von den verbleibenden 124 Proben erwiesen sich 54 als Wiederfunde und wurden somit ebenfalls aus dem Datensatz entfernt. Die verbliebenen 70 Individuen bilden den endgültigen Datensatz (siehe Anhang, Tab.7). Die Geschlechtsdetermination ergab eine Verteilung von 51 Hähnen und 18 Hennen, das Geschlecht von 1 Individuum konnte nicht bestimmt werden. Von diesen 70 Individuen konnten 64 den vier a priori eingeteilten Subpopulationen zugewiesen werden.

Tab. 3: a priori Einteilung der Subpopulationen - N bezieht sich auf die tatsächliche Anzahl der Individuen

Nr.	Subpopulation	Abkürzung	Anzahl der Individuen (N)
1	Vorarlberg – Süd (Montafon)	MON	16
2	Bürserberg	BUE	11
3	Bregenzer Wald	BRE	19
4	Allgäu	ALL	18

### 4.2. Prüfen auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, Kopplungsungleichgewicht und Identitätswahrscheinlichkeit

Der Datensatz wurde auf Abweichungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts und auf das Kopplungsungleichgewicht geprüft. Hiernach zeigten 6 der 12 Mikrosatelliten Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, nach einer Bonferroni-Korrektur erwies sich jedoch nur die Abweichung von sTUD7 als signifikant. Dieser Mikrosatellit-Locus (sTUD7) wurde infolgedessen von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Bei der Überprüfung der Mikrosatelliten auf Null-Allele zeigte sTUT1 einen Überschuss an homozygoten Individuen und damit einen Hinweis auf die Präsenz von Null-Allelen. Da dieser Locus aber im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht liegt und keine verzerrenden Auswirkungen auf die weiteren Analysen hatte, wurde er im Datensatz belassen. Um den Datensatz auf das Kopplungsungleichgewicht zu prüfen, wurde der p-Wert für jedes Locus-Paar nach der Fisher's-Methode berechnet. Bei neun (16%) der 55 möglichen Loci-Paarungen wurde ein Kopplungsungleichgewicht festgestellt, nach einer Bonferroni-Korrektur blieben nur drei (5%) signifikant.

Die Identitätswahrscheinlichkeit ( $PI = 2.6 \times 10^{-10}$ ) ist in dem von Waits et al. 2001 empfohlenen Bereich und damit angemessen niedrig für biologische Studien. Die Identitätswahrscheinlichkeit zwischen Geschwistern ( $PI_{SIB} = 1,3 \times 10^{-4}$ ), welche um die Effekte potenzieller Populationsstrukturen oder verwandter Individuen korrigiert wurde, gewährleistet in dem gefundenen Bereich eine exakte Bestimmung der Individuen nach ihrem Genotyp (Waits et al. 2001).

### 4.3. Genetische Diversität pro Locus

Für das beprobte Auerhuhn-Vorkommen in Vorarlberg reicht die Anzahl der Allele (A) pro Locus (Tabelle 4) von vier (BG15) bis fünfzehn (TUD5). An sechs (TUD1, TUD3, TUD4, TUT2, TUT3, TUT4) von elf Loci übersteigt die beobachtete Heterozygotie ( $H_0$ ) die erwartete Heterozygotie ( $H_E$ ), an den restlichen fünf Loci (TUD5, TUD6, TUT1, BG15, BG18) übersteigt die erwartete Heterozygotie ( $H_E$ ) die beobachtete Heterozygotie ( $H_0$ ). Dies erklärt die sechs (TUD1, TUD3, TUD4, TUT2, TUT3, TUT4) negativen Werte des Fixationsindex (= Inzuchtgrad  $F_{IS}$ ), welche auf einen Überschuss an heterozygoten Individuen im Vergleich zu einer „idealen Population“ hindeuten, wohingegen die positiven  $F_{IS}$  auf einen Überschuss an homozygoten Individuen hinweisen (Frankham et al. 2002). Die effektive Anzahl der Allele ( $A_E$ ) ist robust gegenüber Unterschieden im Stichprobenumfang. Sie berücksichtigt die Häufigkeit, mit der Allele auftreten, in Relation zur durchschnittlichen Häufigkeit. Damit werden seltenere Allele mit einer geringeren Weitergabe-Wahrscheinlichkeit im Vergleich zu häufigeren Allelen weniger stark berücksichtigt. Je kleiner  $A_E$  im Vergleich A ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit von Hauptallelen, welche durch Inzuchtzuwachs und genetischen Drift entstehen (Frankham et al. 2002). An allen Mikrosatelliten-Loci liegt  $A_E$  deutlich unter A. Der Allelreichtum ( $A_R$ ), welcher für die kleinste Subpopulationsgröße berechnet wurde, erreicht bei den meisten Loci Werte, welche A sehr ähnlich sind. Bei TUD5, TUD6 liegt  $A_R$  deutlich unter A.

Tab. 4: Zusammenfassende genetische Statistik pro Mikrosatelliten-Locus. Gerundet auf zwei Dezimalstellen. Anzahl der Allele (A), effektive Anzahl der Allele ( $A_E$ ), Allelreichtum ( $A_R$ ), beobachtete Heterozygotie ( $H_0$ ), erwartete Heterozygotie ( $H_E$ ) und Inzuchtgrad ( $F_{IS}$ ) (N=70)

	TUD1 (CA) <sub>14</sub>	TUD3 (TG) <sub>12</sub>	TUD4 (CA) <sub>21</sub>	TUD5 (GT) <sub>23</sub>	TUD6 (CA) <sub>21</sub>	TUT1 (CTAT) <sub>12</sub>	TUT2 (GATA) <sub>12</sub>	TUT3 (TATC) <sub>11</sub>	TUT4 (TATC) <sub>8</sub>	BG15 (CTAT) <sub>16</sub>	BG18 (CTAT) <sub>17</sub>	Mittelwert
A	6	7	10	15	13	5	7	5	5	4	8	7,73
$A_E$	2,41	2,04	4,69	8,82	3,94	2,22	3,86	2,37	2,64	2,55	3,31	3,53
$A_R$	5,51	6,21	8,43	13,01	9,88	4,75	5,50	4,89	4,75	3,98	7,26	6,74
$H_0$	0,60	0,52	0,81	0,88	0,71	0,46	0,80	0,61	0,66	0,52	0,68	0,66
$H_E$	0,59	0,51	0,79	0,89	0,75	0,55	0,74	0,58	0,62	0,61	0,70	0,66
$F_{IS}$	-0,02	-0,02	-0,02	0,00	0,05	0,17	-0,08	-0,06	-0,06	0,15	0,02	0,01

## 4.4. Genetische Diversität pro Subpopulation

Auf dem Level der Subpopulationen zeigten die Individuen aus dem Bregenzer Wald (BRE, N19) die höchsten Werte bei der Anzahl der Allele ( $A$ ), effektiver Anzahl der Allele ( $A_E$ ) und dem Allelreichtum ( $A_R$ ). Zudem zeigt diese Subpopulation einen leichten Überschuss an heterozygoten Individuen, was sich in dem negativen Fixationsindex ( $F_{IS}$ ) und der höheren beobachteten Heterozygotie ( $H_0$ ) im Vergleich zur erwarteten Heterozygotie ( $H_E$ ) zeigt. Noch stärker ist dieses Phänomen bei der Subpopulation Vorarlberg-Süd (MON) ausgeprägt ( $F_{IS} = -0,09$ ). Die Individuen aus Bürserberg (BUE) wiesen die geringsten Werte bei der Anzahl der Allele ( $A$ ), effektiver Anzahl der Allele ( $A_E$ ) und dem Allelreichtum ( $A_R$ ) auf. In dieser Subpopulation war  $H_E$  gleich  $H_0$ . Ein Überschuss an Homozygoten zeigt sich nur bei den Individuen aus dem Allgäu (ALL), und das auch nicht signifikant ( $F_{IS} = 0,04$ ).

Tabelle 5: Zusammenfassende genetische Statistik pro Subpopulation über alle Loci. Gerundet auf zwei Dezimalstellen. Anzahl der Proben (N), Anzahl der Allele (A), effektive Anzahl der Allele ( $A_E$ ), Allelreichtum ( $A_R$ ), beobachtete Heterozygotie ( $H_0$ ), erwartete Heterozygotie ( $H_E$ ) und Inzuchtgrad ( $F_{IS}$ ) ( $N=70 / 64$ )

	N	A	$A_E$	$A_R$	$H_0$	$H_E$	$F_{IS}$
Vbg (gesamt)	70	7,73	3,53	6,38	0,66	0,66	0,01
MON (1)	16	5,09	3,36	4,67	0,73	0,67	-0,09
BUE (2)	11	4,64	3,06	4,64	0,64	0,64	0,02
BRE (3)	19	6,45	3,44	5,42	0,67	0,66	-0,02
ALL (4)	18	5,27	3,17	4,72	0,60	0,62	0,04

## 4.5. Populationsstruktur

Die Populationsstruktur der Auerhuhn-Vorkommen in Vorarlberg wurde mit Hilfe der molekularen Varianz (AMOVA), der F-Statistik und STRUCTURE analysiert. Die Ergebnisse dieser drei Analyseverfahren werden im Folgenden getrennt voneinander vorgestellt

### Analyse der molekularen Varianz

Bei dieser Analysemethode wurde mit den 64 Individuen gearbeitet, welche eindeutig einer der vier a priori eingeteilten Subpopulationen zugeordnet werden konnten. Hierbei konnten 94% der genetischen Variation durch die Unterschiede innerhalb der Individuen und 0% zwischen den Individuen derselben Subpopulation erklärt werden. Es konnten 6% der Varianz durch Unterschiede zwischen den 4 Subpopulationen erklärt werden (siehe Anhang Tab.7).

### F-Statistik und paarweise $F_{ST}$ – Werte

Der Fixierungsindex beträgt  $F_{ST} = 0,060$  und der Gesamt-Fixierungsindex  $F_{IT} = 0,036$ . Die Anzahl migrierender Individuen ( $N_m = [(1 / F_{ST}) - 1] / 4$ ) nimmt einen Wert von 3,883 ein. Der negative Inzuchtkoeffizient  $F_{IS} = -0,026$  weist auf einen Überschuss an heterozygoten Individuen hin, dieser Wert ähnelt den oben genannten  $F_{IS}$  – Werten pro Subpopulation.

Die paarigen  $F_{ST}$  – Werte (Tabelle 6) zeigen durch signifikante Werte ( $>0,05$ ) eine Differenzierung der Subpopulationen an. Hierbei zeigten fünf von sechs Vergleichen signifikante  $F_{ST}$  – Werte. Die stärkste Differenzierung zeigen die Populationen Allgäu (ALL) und Bürserberg (BUE) ( $F_{ST} = 0,085$ ) gefolgt von den Populationen des Bregenzer Wald und Bürserberg (BUE) ( $F_{ST} = 0,074$ ). Die Subpopulation Vorarlberg-Süd (MON) zeigt eine ähnliche Differenzierung zu den drei anderen Populationen, den höchsten  $F_{ST}$  – Wert weist sie zu der Population Bürserberg ( $F_{ST} = 0,067$ ) auf, gefolgt von der Population Allgäu ( $F_{ST} = 0,066$ ) und der des Bregenzer Wald ( $F_{ST} = 0,063$ ). Keine signifikante Differenzierung voneinander zeigen die Populationen Allgäu und Bregenzer Wald ( $F_{ST} = 0,028$ ).

Tab. 6: paarige  $F_{ST}$ -Werte zwischen Subpopulationen. Gerundet auf drei Dezimalstellen. Hervorgehobene Werte sind statistisch signifikant

	MON (1)	BUE (2)	BRE (3)	ALL (4)
MON (1)				
BUE (2)	<b>0,067</b>			
BRE (3)	<b>0,063</b>	<b>0,074</b>		
ALL (4)	<b>0,066</b>	<b>0,085</b>	0,028	

### STRUCTURE-Analyse

Die STRUCTURE-Analyse, ohne LOCPRIOR-Information (nur auf den genetischen Daten basierend) für den gesamten Datensatz in Vorarlberg (N=70), also auch mit den sechs Individuen welche a priori keiner der vier definierten Populationen zugeordnet wurden, ergab keine unterscheidbare Struktur der Subpopulationen. Die wahrscheinlichste Anzahl der gefundenen



Cluster war  $K = 3$  (Abbildung 2). Die Analyse, welche zwar auch ohne LOCPRIOR-Informationen, jedoch ohne die sechs nicht zuordenbaren Individuen ( $N=64$ ) durchgeführt wurde, zeigte eine Strukturierung der Subpopulationen. Die wahrscheinlichste Anzahl der gefundenen Cluster war  $K = 2$  (Abbildung 2). Wobei die Subpopulationen Vorarlberg-Süd (MON) und Bürserberg (BUE), sowie die Subpopulationen Allgäu (ALL) und Bregenzer Wald (BRE) je annähernd ein Cluster bildeten.

In der dritten Analyse, welche mit LOCPRIOR-Informationen durchgeführt wurde, zeigte sich eine deutlichere Strukturierung der Subpopulationen. Die wahrscheinlichste Anzahl der gefundenen Cluster war auch hier  $K = 2$  (Abbildung 2). Diese Cluster zeigten dasselbe Muster wie die vorherige Analyse allerdings deutlicher, gerade in Bezug auf die Subpopulationen Allgäu (ALL) und Bregenzer Wald (BRE), welche nun deutlich einem Cluster entsprachen. Dies deckte sich mit dem Muster der paarigen  $F_{ST}$  – Werte. Die Ergebnisse für  $K = 3$ , zeigten eine deutliche Unterscheidung der Subpopulationen Allgäu (ALL) (blaues Cluster) und Bürserberg (BUE) (orangenes Cluster) zu den anderen Subpopulationen, auch dies deckt sich mit den  $F_{ST}$  – Werten. Die Subpopulation Vorarlberg-Süd (MON) (violettes Cluster) lässt einen Austausch mit der Subpopulation Bürserberg (BUE) (orangenes Cluster) erahnen. Die Subpopulation Bregenzer Walds (BRE) zeigt sich hier als Mischung aus Allgäu (ALL) und Vorarlberg-Süd (MON), wobei der Anteil des blauen Clusters (ALL) deutlich höher ist als der des violetten Clusters (MON), was auf einen regeren Austausch mit der Subpopulation Allgäu (ALL) hindeutet. Die Ergebnisse für  $K = 4$ , also der Annahme, dass es genauso viele Cluster wie a priori definierte Subpopulationen gibt, zeigen was die Subpopulationen Allgäu (ALL) (blaues Cluster), Bürserberg (BUE) und Vorarlberg-Süd (MON) (grünes Cluster) angeht ein ähnliches Muster wie die vorherigen Analysen. Die Subpopulation des Bregenzerwalds (BRE) zeigt sich hier als eigenes Cluster (dunkelblau), welches jedoch wie auch in den vorherigen Analysen einen Einfluss durch die Subpopulationen Allgäu (ALL) (blaues Cluster) und einen geringeren Einfluss durch Vorarlberg-Süd (MON) (grünes Cluster) unterliegt.

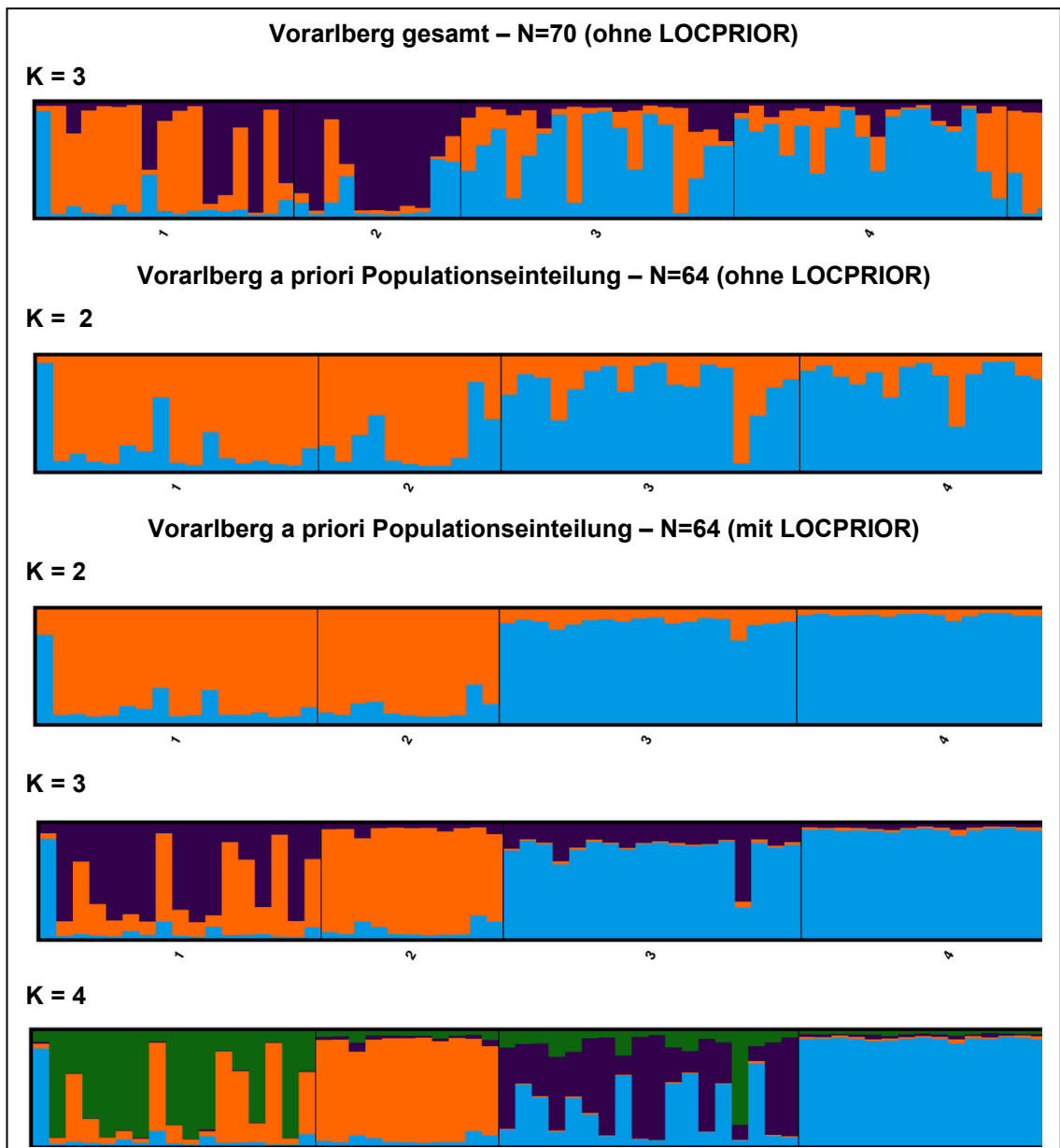


Abbildung 2: Balkendiagramme aus STRUCTURE. 1 = MON / 2 = BUE / 3 = BRE / 4 = ALL  
 Ohne LOCPRIOR Informationen für K = 3 (N=70) und K = 2 (N=64). Mit LOCPRIOR Informationen für K = 2, K = 3 und K = 4

## 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, erstmals die genetische Diversität und die Populationsstruktur der Auerhuhn-Vorkommen in Vorarlberg zu erheben. Diese beiden Themenschwerpunkte sollen auch hier getrennt voneinander behandelt werden.

### Genetische Vielfalt

Die genetische Diversität der Auerhuhn-Vorkommen in Vorarlberg lässt sich auf unterschiedlichen Ebenen bewerten, welche durch die verschiedenen Standardparameter dargestellt werden. Die Anzahl der Allele ( $A$ ) ist von der Größe der Stichprobe abhängig und deshalb nicht für Vergleiche unterschiedlicher Populationen geeignet. Sie ist jedoch in Verbindung mit der effektiven Anzahl der Allele ( $A_E$ ) ein Indikator für die Anwesenheit von Hauptallelen, welche auf einen Inzucht-Anstieg und genetischen Drift hindeuten (Frankham et al. 2002). Umso kleiner  $A_E$  im Vergleich zu  $A$  ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit von Hauptallelen, da seltene Allele weniger stark berücksichtigt werden. Dieses Phänomen zeigt sich sowohl an den Mikrosatelliten-Loci als auch im Vergleich der Subpopulationen. Dies könnte ein Hinweis auf das Vorhandensein von Hauptallelen bei den Auerhuhn-Vorkommen in Vorarlberg sein. Der Allelreichtum ( $A_R$ ) wurde für die kleinste Subpopulationsgröße berechnet, somit statistisch vereinheitlicht (Rarefaktion) und ist damit für den Vergleich verschiedener Populationen (unterschiedlicher Stichprobengröße) geeignet. Ein Vergleich mit anderen Studien ist jedoch nur möglich, wenn die gleichen Mikrosatelliten verwendet wurden und  $A_R$  ähnlich vereinheitlicht wurde. In den schon oben erwähnten Studien von Segelbacher et al. (2002, 2003, 2008) wurden immer dieselben zehn Mikrosatelliten verwendet (TUT1-TUT4, TUT10, BG4-BG6, BG15, BG18) (Segelbacher 2002; Segelbacher und Storch 2002; Segelbacher et al. 2003, 2008). Von diesen stimmen sechs mit den von uns verwendeten Mikrosatelliten überein (TUT1-TUT4, BG15, BG18). Die statistische Vereinheitlichung wurde mit demselben Programm durchgeführt. Die Werte des Allelreichtums liegen unter den in dieser Studie ermittelten Werten. Dies muss aber keine biologischen Hintergründe haben, sondern ist vermutlich mit der höheren Variabilität der von uns genutzten Mikrosatelliten zu begründen. Das Verhältnis von beobachteter Heterozygotie ( $H_0$ ) und erwarteter Heterozygotie ( $H_E$ ) spiegelt sich im Inzuchtgrad ( $F_{IS}$ ) wider. In einer „idealen“ Population ist  $H_E = H_0$  und damit der Inzuchtgrad gleich null. Ist  $H_0$  größer als  $H_E$ , so ergibt das einen negativen  $F_{IS}$ , der auf einen Überschuss an heterozygoten Individuen hindeutet. Ist es umgekehrt ( $H_E > H_0$ ), so ergibt dies einen positiven  $F_{IS}$ , der auf einen Überschuss an homozygoten Individuen hindeutet (Frankham et al. 2002). In den von uns beprobten Auerhuhn-Vorkommen zeigt nur eine Population (ALL – Allgäu) einen Überschuss an homozygoten Individuen und dieser ist nicht signifikant ( $F_{IS} = 0,04$ ); dies deutet darauf hin, dass Inzucht in den Auerhuhn-Vorkommen in Vorarlberg nicht von Bedeutung ist. Die vier a priori eingeteilten Subpopulationen weisen kaum Unterschiede in ihrer genetischen Diversität auf, nur eine Population (BRE – Bregenzer Wald) weist geringfügig höhere Werte auf als der Rest. Zusammenfassend ist zu sagen, dass weder Anzeichen für Inzucht noch für eine reduzierte

genetische Vielfalt in den beprobten Vorkommen gefunden werden konnten. Einzig der Hinweis auf Hauptallele, und damit genetischen Drift, bleibt durch stetiges Monitoring zu beobachten. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Studien zu Auerhuhnpopulationen in Europa, welche trotz der Vermutung, dass es sich um fragmentierte Vorkommen handelt, eine hohe genetische Diversität aufweisen (Segelbacher und Storch 2002; Segelbacher et al. 2003, 2008; National Institute for Research and Development in Forestry "Marin Drăcea": Brasov, Brasov, RO et al. 2021, Regnaut 2004).

### Populationsstruktur

Die Populationsstruktur wurde mittels drei Analyseverfahren überprüft. Als erstes mit der Analyse der molekularen Varianz. Hierbei zeigte sich, dass nur 6 % der Varianz durch Unterschiede zwischen den vier Subpopulationen erklärt werden konnten, dies lässt auf eine flache Populationsstruktur der Subpopulationen schließen. Im nächsten Schritt wurden die F-Statistik und die paarige  $F_{ST}$ -Werte analysiert. Sowohl der Fixierungsindex  $F_{ST} = 0,060$  als auch der Gesamt-Fixierungsindex  $F_{IT} = 0,036$  spiegeln die oben genannte Vermutung der flachen Populationsstruktur zwischen den Subpopulationen wider, auch wenn der  $F_{ST}$ -Wert als signifikant anzusehen ist. Hinzu kommt das  $N_m$  (Anzahl migrierender Individuen) einen Wert von 3,883 einnimmt, auch dieser Wert weist also darauf hin, dass es einen Austausch zwischen den Subpopulationen gibt, da er deutlich über 1 liegt. Werte  $<1$  würden auf räumlich getrennte Populationen hindeuten. Der negative Inzuchtkoeffizient  $F_{IS} = -0,026$  weist auf einen Überschuss an heterozygoten Individuen hin, dieser Wert ähnelt den oben genannten  $F_{IS}$ -Werten pro Subpopulation und weist darauf hin, dass Inzucht in Auerhuhn-Vorkommen Vorarlbergs irrelevant ist. Die paarigen  $F_{ST}$ -Werte zeigen für fünf von sechs Vergleichen signifikante Differenzierungen. Der höchste Wert und damit die stärkste Differenzierung zeigten die Populationen Allgäu (ALL) und Bürserberg (BUE) mit einem  $F_{ST}$ -Wert von 0,085. Die  $F_{ST}$ -Werte können Werte zwischen null (genetisch ident) und eins (genetisch verschieden) annehmen, wobei die Werte sowohl von den genutzten genetischen Markern als auch von der Anzahl der Untersuchten Individuen pro Subpopulation abhängig sind. Mit Mikrosatelliten werden häufig nur Werte zwischen 0,3 – 0,4 erreicht, wobei bereits Werte ab 0,15 eine starke genetische Differenzierung bedeuten. Niedrige  $F_{ST}$ -Werte sprechen für einen hohen Genfluss, denn je stärker der Genfluss desto geringer sind die Unterschiede zwischen den Populationen (Balkenhol et al. 2016). Auch diese Werte sprechen also für eine eher flache, aber existente, Populationsstruktur und einen eingeschränkten Genfluss zwischen den Subpopulationen. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der Daten-Analyse mittels STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) wider. Die wahrscheinlichste Anzahl der Cluster war  $K = 2$ , wobei sich jeweils die Vorkommen Vorarlberg – Süd (MON), Bürserberg (BUE) und die Vorkommen Bregenzer Wald (BRE) und Allgäu (ALL) als eine Subpopulation darstellten. Unter der Annahme, dass es genauso viele Cluster ( $K=4$ ) wie a priori eingeteilte Subpopulationen gibt, zeigt sich ein ähnliches Muster, in dem die Vorkommen Allgäu (ALL) und Bürserberg (BUE) eigene Cluster mit wenig Einfluss der anderen Vorkommen bilden, wohingegen die Vorkommen

Vorarlberg – Süd (MON) und Bregenzerwald (BRE) jeweils einen hohen Einfluss der anderen Cluster aufweisen (MON & BUE / ALL & BRE). Somit können die Auerhuhn-Vorkommen in Vorarlberg nach unserer Datengrundlage in eine südliche und eine nördliche Subpopulation eingeteilt werden, welche vermutlich durch ein Tal, das Montafon, getrennt werden. Ein genetischer Austausch zwischen den Vorkommen scheint vorhanden zu sein. Diesbezüglich scheinen vor allem die Vorkommen Vorarlberg – Süd (MON) und Bregenzerwald (BRE) von Bedeutung zu sein, da diese Hybridzonen darstellen könnten, da sie wie in Abb.2 zu sehen ist jeweils aus Individuen verschiedener Cluster zusammengesetzt sind. Diese Ergebnisse decken sich, wie die der genetischen Diversität, mit vorangegangenen Studien. Die Vermutung liegt nahe, dass auch in Vorarlberg ein Populationsrückgang aufgrund der anthropogenen Nutzung der Landschaft stattfindet. Dieser scheint sich jedoch, wie auch in anderen Studien, noch nicht in Form einer verringerten genetischen Vielfalt oder starken genetischen Differenzierungen der Subpopulationen niedergeschlagen zu haben (Segelbacher und Storch 2002; Segelbacher et al. 2003, 2008; National Institute for Research and Development in Forestry “Marin Drăcea”: Brasov, Brasov, RO et al. 2021). Ähnlich wie bei der Studie von Kunz et al. (2021) zu den Auerhuhnvorkommen im Schwarzwald ist die genetische Differenzierung (signifikanten  $F_{ST}$ -Werten zwischen den Subpopulationen) jedoch als erstes Warnzeichen für eine reduzierte funktionale Konnektivität zu sehen. Dies sollte Naturschutzstrategien induzieren, welche zum einen auf einen Erhalt der Populationen und zum anderen die Etablierung von Migrationskorridoren/Trittsteinen mit guter Habitateignung, zum Ziel hat (Kunz et al. 2021).

## 6. Schlussfolgerung

Mit Hilfe der analysierten Daten konnte ein erster Überblick über die genetische Situation der bestehenden Auerhuhn-Vorkommen in Vorarlberg gewonnen werden. Hieraus lässt sich eine hohe genetische Diversität der Vorkommen ableiten. Die signifikante Populationsstruktur weist auf einen verringerten Genfluss zwischen den Teilpopulationen hin. Sowohl die Strukturierung in STRUCTURE als auch die signifikanten  $F_{ST}$  unterstreichen dies. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass das Potential für Erhaltungsmaßnahmen noch gegeben ist. Hierbei sollte vor allem die Vernetzung der Vorkommen durch Korridore und Trittsteine im Vordergrund stehen. Denn innerhalb von Metapopulationssystemen ist die Migration zwischen den bestehenden Subpopulationen von hoher Bedeutung; so ist eine hohe genetische Variabilität möglich, auch wenn die Subpopulationsgrößen gering sind. Dies minimiert das Risiko des Aussterbens der Art (Kunz et al. 2021). Die Frage nach der lokalen Abundanz der Auerhuhn-Vorkommen und damit der Verteilung der Anzahl von Individuen über die Fläche konnte in dieser Untersuchung nicht beantwortet werden. Die hier erhobenen Daten können jedoch als Grundlage dienen. In weiteren Untersuchungen der Vorkommen könnte mittels nicht-invasiver genetischer Wiederfangmethoden („capture-recapture“) die Abundanz ermittelt werden (Mills et al. 2000; Jacob et al. 2010). Diese ist wichtig, da kleine Populationen im Allgemeinen gefährdet sind. Sie weisen ein hohes Risiko auf, einem Verlust der genetischen Diversität und damit Variation zu unterliegen, dies kann zu einem Risiko des Aussterbens der Art aufgrund von Spontanereignissen führen. Aufgrund dessen ist es wichtig frühzeitig Schutz- und Erhaltungsmaßnahmen zu initiieren, bevor eine Population kurz vor dem Aussterben steht (Storch 2007a). Hierzu ist ein regelmäßiges Monitoring der Vorkommen nötig, um sich ihres Zustandes bewusst zu sein. Hierbei sollten die genetische Differenzierung/Diversität und die Abundanz der Vorkommen, sowie bereits eingeleitete Managementmaßnahmen überprüft werden (Balkenhol et al. 2016). Für eine gute Vergleichbarkeit der genetischen Daten verschiedener Untersuchungszeiträume innerhalb der Auerhuhn-Vorkommen in Vorarlberg, sollte auf die Einhaltung eines standardisierten Protokolls geachtet werden, welches bei der Probennahme beginnt und sich über die Genotypisierung bis zu Datenauswertung erstreckt. Für wiederum eine gute Vergleichbarkeit der genetischen Daten verschiedener Untersuchungsgebiete innerhalb derselben Art, wäre es von Vorteil, wenn die verschiedenen Arbeitsgruppen mit denselben Mikrosatelliten arbeiten und so eine Datenbank für Referenzallel und Alleleintern entstehen könnte, ähnlich wie in der Studie von Andesner et al. (2021). In dieser werden jedoch nur acht der zwölf von uns verwendeten Mikrosatelliten betrachtet (Andesner et al. 2021). Auf diese Weise könnte der genetische Zustand einer Art in einem größeren Maßstab und länderübergreifend betrachtet werden.

## 7. Quellen

- Andesner P, Vallant S, Seeber T, et al (2021) A reference allelic ladder for Western Capercaillie (*Tetrao urogallus*) and Black Grouse (*Tetrao tetrix*) enables linking grouse genetic data across studies. *Conserv Genet Resour* 13:97–105. <https://doi.org/10.1007/s12686-020-01180-6>
- Balkenhol N, Biebach I, Bolliger J, et al (2016) *Naturschutzgenetik: ein Handbuch für die Praxis*, 1. Auflage. Haupt Verlag, Bern
- BirdLife International (2021) *Tetrao urogallus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2021: e.T22679487A16618833
- Bollmann K, Weibel P, Graf RF (2005) An analysis of central Alpine capercaillie spring habitat at the forest stand scale. *For Ecol Manag* 215:307–318. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.05.019>
- Coppes J, Kochs M, Ehrlacher J, et al (2015) The challenge of creating a large-scale capercaillie distribution map. *Newsl Grouse Group Grouse News* 50:21–23
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4:359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Ellmayer T (ed) (2005) *Entwicklung von Kriterien, Indikatoren und Schwellenwerten zur Beurteilung des Erhaltungszustands der Natura 2000-Schutzgüter. Band 1: Vogelarten des Anhangs I der Vogelschutzrichtlinie*
- europäisches Parlament der europäischen Union (2009) Richtlinie 2009/147/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über die Erhaltung der wildlebenden Vogelarten (kodifizierte Fassung)
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Frankham R, Briscoe DA, Ballou JD (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK ; New York
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *J Hered* 86:485–486. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627>
- Grünschachner-Berger V, Pfeifer M (2020) Von den “Orhanen” in Vorarlberg - Grundlagenstudie Auerhuhn Vorarlberg. *Vorarlberger Jagd - Mag Vorarlberger Jägerschaft* 6–9
- Grünschachner-Berger V, Pfeifer M, Kunz F, et al (2021) Neues von den “Orhanen” - Grundlagenstudie Auerhuhn in Vorarlberg am Laufen. *Vorarlberger Jagd - Mag Vorarlberger Jägerschaft* 16–17
- Jacob G, Debrunner R, Gugerli F, et al (2010) Field surveys of capercaillie (*Tetrao urogallus*) in the Swiss Alps underestimated local abundance of the species as revealed by genetic analyses of non-invasive samples. *Conserv Genet* 11:33–44. <https://doi.org/10.1007/s10592-008-9794-8>

- Kahn NW, St.John J, Quinn TW (1998) Chromosome-Specific Intron Size Differences in the Avian CHD Gene Provide an Efficient Method for Sex Identification in Birds. *The Auk* 115:1074–1078. <https://doi.org/10.2307/4089527>
- Kalinowski ST (2005) hp-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Mol Ecol Notes* 5:187–189. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00845.x>
- Keenan K, McGinnity P, Cross TF, et al (2013) diveRsity : An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods Ecol Evol* 4:782–788. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12067>
- Khan G, Kangro HO, Coates PJ, Heath RB (1991) Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *J Clin Pathol* 44:360. <https://doi.org/10.1136/jcp.44.5.360>
- Klaus S, Bergmann H-H (2020) Auerhühner & Co: heimliche Vögel in wilder Natur. AULA-Verlag, Wiebelsheim
- Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, et al (2015) CLUMPAK : a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol Ecol Resour* 15:1179–1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
- Kunz F, Kohnen A, Nopp-Mayr U, Coppes J (2021) Past, present, future: tracking and simulating genetic differentiation over time in a closed metapopulation system. *Conserv Genet* 22:355–368. <https://doi.org/10.1007/s10592-021-01342-5>
- Mills LS, Citta JJ, Lair KP, et al (2000) Estimating animal abundance using noninvasive DNA sampling: promise and pitfalls. *Ecol Appl* 10:283–294. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2000\)010\[0283:EAAUND\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[0283:EAAUND]2.0.CO;2)
- National Institute for Research and Development in Forestry “Marin Drăcea”: Brasov, Brasov, RO, Fedorca M, Ionescu O, et al (2021) Assessing the genetic structure of capercaillie (*Tetrao urogallus*) in Romania. *Ann For Res* 63:15–26. <https://doi.org/10.15287/afr.2020.2025>
- Pakkala T, Pellikka J, Lindén H (2003) Capercaillie - *Tetrao urogallus*- a good candidate for an umbrella species in taiga forests. *Wildl Biol* 9:309–316. <https://doi.org/10.2981/wlb.2003.019>
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Peakall R, Smouse PE (2006) genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155:945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered* 86:248–249. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573>
- Regnaut S (2004) Population genetics of Capercaillie (*Tetrao urogallus*) in the Jura and the Pyrenees: a non-invasive approach to avian conservation genetics. Université de Lausanne, Faculté de biologie et médecine



- Regnaut S, Lucas FS, Fumagalli L (2006) DNA degradation in avian faecal samples and feasibility of non-invasive genetic studies of threatened capercaillie populations. *Conserv Genet* 7:449–453. <https://doi.org/10.1007/s10592-005-9023-7>
- Rousset F (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8:103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
- Segelbacher G (2002) Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples: TECHNICAL NOTE. *Mol Ecol Notes* 2:367–369. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00180.x-i2>
- Segelbacher G, Höglund J, Storch I (2003) From connectivity to isolation: genetic consequences of population fragmentation in capercaillie across Europe. *Mol Ecol* 12:1773–1780. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01873.x>
- Segelbacher G, Manel S, Tomiuk J (2008) Temporal and spatial analyses disclose consequences of habitat fragmentation on the genetic diversity in capercaillie (*Tetrao urogallus*): LANDSCAPE GENETICS OF CAPERCAILLIE. *Mol Ecol* 17:2356–2367. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03767.x>
- Segelbacher G, Storch I (2002) Capercaillie in the Alps: genetic evidence of metapopulation structure and population decline. *Mol Ecol* 11:1669–1677. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01565.x>
- Storch I (2007a) Grouse: status survey and conservation action plan 2006-2010. IUCN ; World Pheasant Association, Gland, Switzerland, Fordingbridge, UK
- Storch I (2007b) Conservation Status of Grouse Worldwide: An Update. *Wildl Biol* 13:5–12. [https://doi.org/10.2981/0909-6396\(2007\)13\[5:CSOGWA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2981/0909-6396(2007)13[5:CSOGWA]2.0.CO;2)
- Storch I, Segelbacher G (2000) Genetic correlates of spatial population structure in central European capercaillie *Tetrao urogallus* and black grouse *T. tetrix*: a project in progress. *Wildl Biol* 6:305–310. <https://doi.org/10.2981/wlb.2000.014>
- Suter W, Graf RF, Hess R (2002) Capercaillie (*Tetrao urogallus*) and Avian Biodiversity: Testing the Umbrella-Species Concept. *Conserv Biol* 16:778–788. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.01129.x>
- Taberlet P (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res* 24:3189–3194. <https://doi.org/10.1093/nar/24.16.3189>
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Waits LP, Luikart G, Taberlet P (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Mol Ecol* 10:249–256. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01185.x>
- Wang J (2017) The computer program STRUCTURE for assigning individuals to populations: easy to use but easier to misuse. *Mol Ecol Resour* 17:981–990. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12650>
- Zohmann M, Immitzer M, Wöss M, et al (2014) Modelling habitat use of *Tetrao urogallus* L. in Austria for conservation issues. *J Nat Conserv* 22:223–234. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2014.01.002>



## Anhang

### Genotypisierung

Tab. 7: Genotypen der verbliebenen 70 Individuen (welche den endgültigen Datensatz bilden) an 11 Mikrosatelliten – Loci (bp-basepairs), mit a priori Einteilung der Subpopulationen

Probe	Pop.	sTUD1	sTUT4	BG15	sTUD3	sTUT1	sTUD6	sTUT3	sTUD5	sTUT2	sTUD4	BG18
Tu034	1	154	160	126 138	135 143	87 93	134 134	164 176	99 99	140 148	144 148	87 89 202 202
Tu044	1	154	162	138 138	135 135	91 93	142 142	164 172	95 95	140 152	144 164	69 81 198 210
Tu045	1	154	160	134 138	135 139	91 93	138 142	164 166	95 99	138 138	144 164	0 0 198 210
Tu046	1	154	160	134 142	135 135	91 93	138 142	164 172	95 95	140 152	144 164	0 0 198 210
Tu049	1	154	160	138 138	135 135	91 91	138 142	164 172	95 99	140 144	144 164	57 69 198 210
Tu051	1	154	160	138 138	135 135	91 91	138 142	164 172	95 99	140 144	144 144	57 85 170 210
Tu063	1	160	162	138 138	135 135	91 93	142 142	164 176	95 99	140 152	144 164	57 57 198 198
Tu086	1	154	154	138 142	135 135	91 93	142 146	172 172	95 95	140 152	144 164	69 81 198 198
Tu105	1	154	154	138 138	135 135	91 91	138 138	164 172	95 99	140 146	144 160	57 57 198 198
Tu106	1	154	154	138 138	135 135	91 93	138 142	164 170	95 99	112 132	144 160	57 57 198 198
Tu107	1	154	154	130 142	0 0	91 91	138 142	148 164	95 95	138 138	144 160	65 81 198 214
Tu118	1	154	154	138 142	135 139	91 91	138 138	164 164	95 95	146 154	160 160	57 65 198 214
Tu121	1	154	154	138 138	135 135	91 91	138 138	164 168	95 99	138 140	160 160	57 57 198 198
Tu124	1	154	154	130 142	135 139	91 91	138 138	164 164	95 95	138 154	144 160	65 81 198 214
Tu125	1	154	154	138 138	135 135	91 91	138 138	164 172	95 99	140 146	144 160	57 69 198 210
Tu155	1	162	162	130 142	135 139	91 91	138 146	172 172	95 99	140 146	144 164	65 81 198 198
Tu082	2	154	154	138 138	131 139	91 91	138 138	172 172	95 99	130 138	144 164	61 87 210 210
Tu095	2	154	160	130 142	135 135	91 91	138 146	164 172	95 99	130 154	160 164	65 81 198 198
Tu099	2	154	160	134 142	135 139	91 97	134 138	164 170	95 99	138 152	144 164	57 57 198 210
Tu101	2	154	160	134 142	131 139	91 91	134 138	164 166	95 99	130 138	148 164	57 87 210 210
Tu133	2	154	154	142 142	139 143	91 91	138 138	164 164	95 99	138 140	144 164	65 87 198 210
Tu134	2	154	154	130 142	135 143	91 91	138 138	164 164	95 99	138 140	144 164	65 87 198 210

Tu135	2	154	160	130	142	0	0	91	91	138	146	164	164	95	99	138	140	144	164	65	87	198	210
Tu136	2	154	160	130	142	135	135	91	91	138	146	164	164	95	99	152	154	144	160	65	87	198	198
Tu137	2	154	154	130	138	131	135	91	91	138	146	164	172	95	99	130	138	144	164	61	87	198	210
Tu138	2	154	158	130	142	135	135	91	91	134	134	172	192	95	107	130	138	148	164	65	81	198	198
Tu143	2	154	154	138	138	0	0	91	91	138	138	0	0	99	103	0	0	144	164	61	87	170	210
Tu015	3	154	160	138	138	135	139	91	95	138	138	164	170	95	99	146	154	148	164	57	81	198	202
Tu017	3	154	162	142	142	139	143	93	97	138	142	170	172	95	95	146	156	144	164	57	81	202	210
Tu024	3	160	162	138	142	135	143	91	93	138	138	164	166	99	103	146	152	144	148	81	87	198	202
Tu025	3	154	160	138	142	135	135	91	91	138	138	164	164	99	99	132	146	148	164	57	81	198	202
Tu030	3	154	160	138	142	135	135	91	91	138	138	114	164	99	99	0	0	148	164	57	85	170	202
Tu038	3	160	162	142	142	143	143	91	91	138	138	164	172	99	107	130	130	148	160	57	81	198	202
Tu053	3	154	156	138	142	143	143	91	97	138	138	172	176	99	99	130	152	144	164	81	81	194	198
Tu055	3	162	164	138	142	135	135	91	93	138	138	170	170	95	95	140	148	160	164	57	81	198	198
Tu057	3	154	154	138	142	139	143	91	97	138	138	172	176	99	99	130	132	144	144	57	81	194	206
Tu069	3	154	154	138	142	139	143	97	97	138	138	172	176	99	99	130	132	144	148	81	81	194	198
Tu070	3	154	160	130	142	135	143	91	93	134	134	164	172	99	107	130	138	144	164	65	65	198	202
Tu100	3	154	154	134	142	135	139	91	93	138	142	164	172	95	99	142	156	148	160	57	87	198	206
Tu154	3	160	162	134	142	135	135	93	93	134	138	170	172	95	99	132	140	148	160	57	65	198	198
Tu158	3	154	154	134	138	0	0	95	95	138	138	144	176	99	103	132	152	144	148	57	81	0	0
Tu307	3	154	162	138	138	135	135	91	93	138	138	172	172	95	99	130	132	144	148	75	87	202	202
Tu317	3	154	154	138	138	135	135	91	91	138	138	172	172	99	99	140	146	144	144	57	57	198	198
Tu322	3	154	162	138	142	131	143	91	93	138	146	170	170	95	95	140	144	160	160	57	87	198	210
Tu325	3	154	154	138	142	0	0	91	95	138	142	164	170	95	99	154	154	148	148	0	0	198	206
Tu326	3	154	154	138	142	139	143	91	95	138	138	164	168	95	99	154	154	148	164	81	81	198	206
Tu001	4	162	162	138	138	139	143	79	91	134	138	172	172	95	99	130	140	144	148	65	81	198	210
Tu009	4	154	162	138	142	143	143	91	93	130	142	172	172	95	95	132	144	144	148	57	87	202	202
Tu010	4	158	162	138	138	135	139	87	91	134	134	166	172	95	99	140	144	144	160	65	87	198	210
Tu011	4	160	162	138	142	139	143	91	91	134	138	170	170	95	103	144	146	144	164	57	87	198	210
Tu058	4	154	156	138	138	139	139	91	93	138	138	164	172	95	99	144	146	148	164	81	85	194	198
Tu059	4	154	162	138	142	135	143	91	93	138	138	164	172	95	95	140	144	144	164	57	87	202	202

Tu089	4	154	164	138	142	135	135	91	93	138	138	144	172	95	107	140	148	148	164	57	81	194	202
Tu090	4	154	162	138	138	139	139	91	93	134	138	172	174	99	111	130	140	148	168	65	81	198	202
Tu091	4	162	164	130	138	131	143	91	93	138	138	170	172	99	99	140	150	160	160	57	81	194	198
Tu093	4	154	154	138	142	135	143	91	97	134	138	172	172	99	99	138	146	144	160	57	87	198	210
Tu108	4	154	162	138	142	135	143	87	91	134	142	144	172	95	95	138	146	144	148	85	87	194	210
Tu109	4	154	154	138	142	143	143	91	91	134	134	172	172	95	107	130	146	148	148	87	91	194	206
Tu110	4	162	162	138	142	135	135	83	91	134	138	144	176	95	95	126	144	148	152	81	85	194	198
Tu111	4	160	162	126	142	135	139	87	91	134	134	144	166	95	99	140	140	144	160	65	87	198	198
Tu113	4	154	154	138	142	139	143	87	91	134	138	164	172	95	99	140	144	148	160	65	87	198	202
Tu115	4	154	154	134	138	135	135	79	91	138	138	152	168	111	111	96	96	120	160	57	65	162	206
Tu311	4	154	162	138	138	135	139	91	97	138	138	166	170	95	95	138	150	164	164	57	65	202	202
Tu312	4	154	160	138	138	135	139	91	91	138	138	170	178	95	95	132	150	164	164	57	57	198	202
Tu146	N/A	154	162	138	142	135	143	91	91	138	142	164	172	95	99	144	146	144	144	57	87	202	202
Tu162	N/A	154	160	138	138	135	135	91	91	138	142	164	172	95	99	148	154	144	164	57	69	198	210
Tu164	N/A	154	162	138	138	135	135	91	91	130	138	164	164	99	99	138	150	164	164	57	57	198	210
Tu318	N/A	154	154	130	142	135	139	91	91	138	146	164	172	99	99	130	154	144	160	81	87	198	198
Tu320	N/A	154	160	138	142	135	135	93	97	138	138	170	172	95	99	148	148	144	144	69	81	198	210
Tu324	N/A	154	156	134	138	0	0	0	0	138	142	170	172	95	99	132	138	144	164	57	57	198	210

## Artunterscheidung

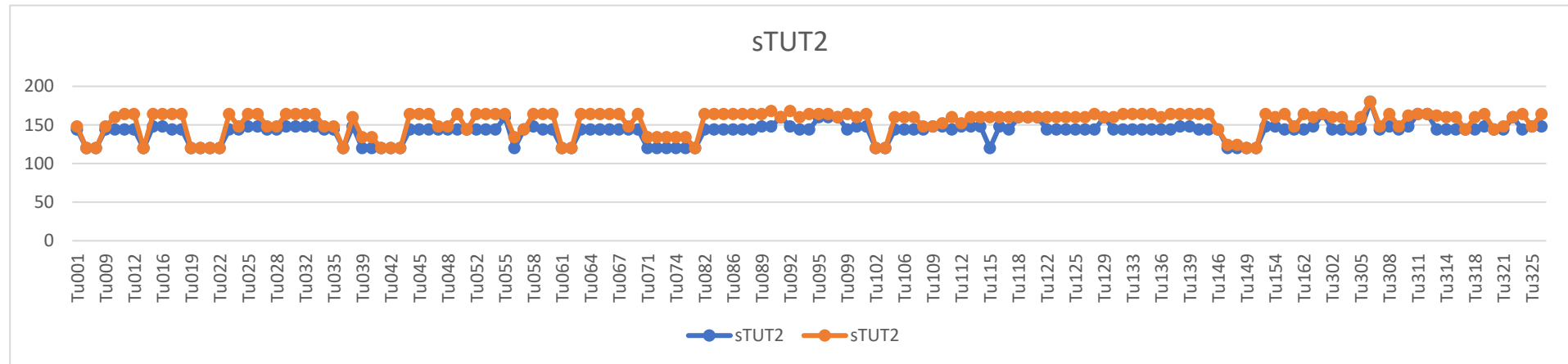


Abb. 3: Ausreißer des Mikrosatelliten-Locus sTUT2 (N=156)

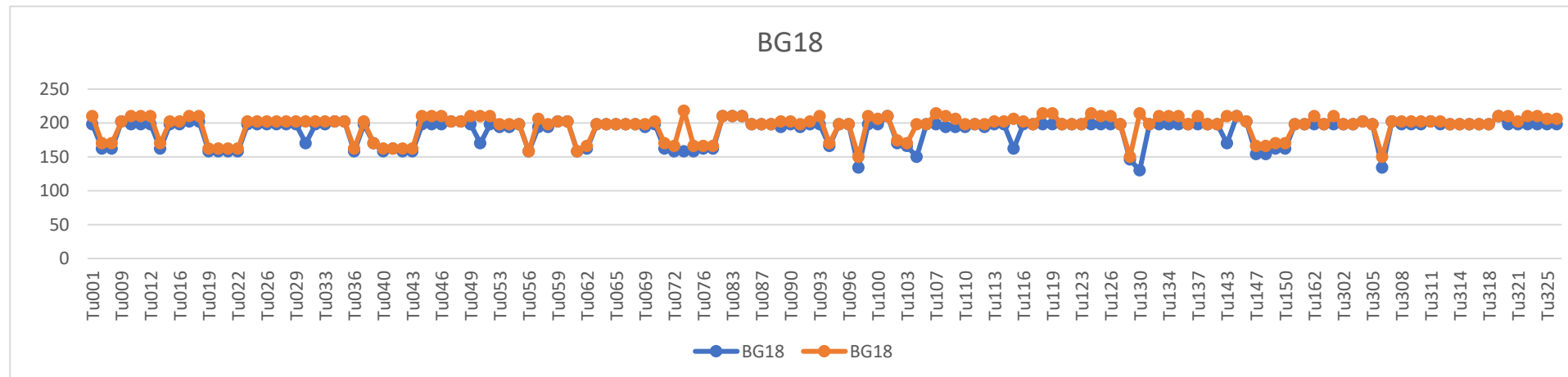


Abb. 4: Ausreißer des Mikrosatelliten-Locus BG18 (N=156)

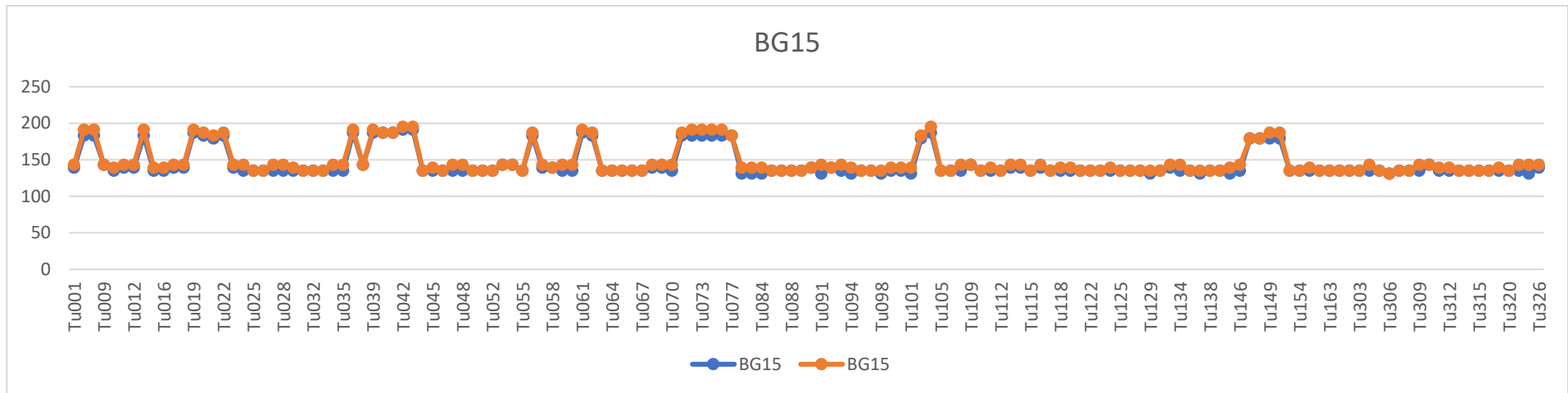


Abb. 5: Ausreißer des Mikrosatelliten-Locus BG15 (N=156)

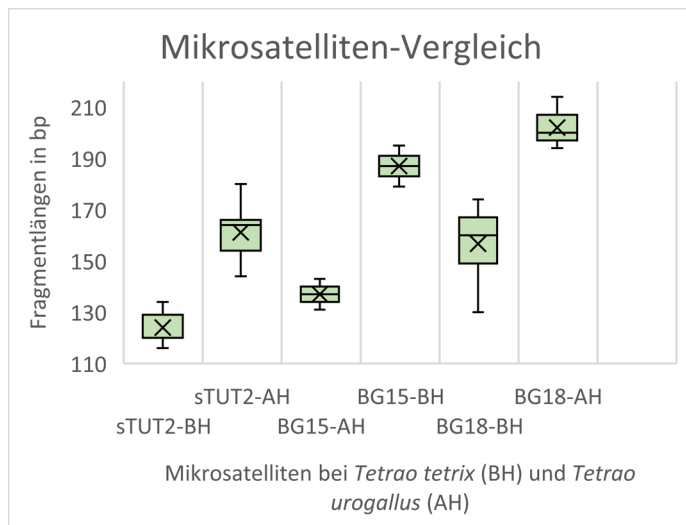


Abb. 6: Vergleich der Mikrosatelliten an allen 3 Loci und Artbestimmung nach Andesner et al. 2021

## Analyse der Populationsstruktur

Tab. 7: Ergebnisse der AMOVA. Auf drei Nachkommastellen gerundet

<b>Variationsquelle</b>	<b>Summe der Quadrate</b>	<b>Varianzkomponenten</b>	<b>Variation in Prozent</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Fixationsindex</b>
Zwischen Subpopulationen	31,92	0,23	6	0,001	0,060
Zwischen Individuen von Subpopulationen	206,74	0	0	0,841	-0,026
Zwischen Individuen	232,13	3,63	94	0,091	0,036
Gesamt	470,79	3,86			