

Molekulargenetischer Nachweis gemischter Mutterschaften in Bruten der Tannenmeise *Parus ater*

Tim Schmoll, Wolfgang Winkel & Thomas Lubjuhn

Schmoll T, Winkel W & Lubjuhn T: Molecular genetic evidence for mixed maternity in broods of the Coal Tit *Parus ater*. *Vogelwarte* 46: 223 – 227.

Molecular genetic analysis of parentage revealed a low frequency of mixed maternity in broods of the Coal Tit, a socially monogamous passerine with a high frequency of extra-pair paternity. Mixed maternity was detected in four (= 0.8 %) out of 483 analysed broods. For ten (= 0.3 %) out of 3563 successfully genotyped offspring the attending putative (social) mother was excluded from genetic parentage. Given the very low frequency of mixed maternity, social reproductive success can conveniently be equated with genetic reproductive success for female Coal Tits in evolutionary studies. Attending putative fathers were excluded from genetic parentage in all cases, too, ruling out quasi-parasitism as a mechanistic explanation for mixed maternity. In one case, the pair members from an adjacent territory were unequivocally identified as the genetic parents of a single offspring (they were simultaneously attending their own brood). Possible mechanisms leading to mixed maternity broods in the Coal Tit may include nest/clutch take-over and intraspecific brood parasitism and their respective relevance is briefly discussed.

TS & TL: Institut für Evolutionsbiologie und Ökologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, An der Immenburg 1, D-53121 Bonn. E-Mail: tschmoll@evolution.uni-bonn.de, t.lubjuhn@uni-bonn.de

WW: Institut für Vogelforschung "Vogelwarte Helgoland", An der Vogelwarte 21, D-26386 Wilhelmshaven. E-Mail: w.winkel@arcor.de

1. Einleitung

Alternative Fortpflanzungsstrategien wie z. B. außerpaarliche Vaterschaften (z. B. Griffith et al. 2002; Lubjuhn 2005) oder innerartlicher Brutparasitismus (z. B. Yom-Tov 2001) sind bei vielen auf sozialer Ebene monogamen Vogelarten weit verbreitet. Bei innerartlichem Brutparasitismus legen Weibchen Eier in die Nester anderer Weibchen und parasitieren so die elterliche Brutpflege ihrer Artgenossen. Dies führt zu Bruten mit gemischten Mutterschaften und ist häufig mit Fitnessvorteilen für die Parasiten (Åhlund & Andersson 2001) und mit Fitnesskosten für die Wirte (Petrie & Møller 1991) verbunden. Weitere Ursachen für das Auftreten gemischter Mutterschaften schließen Quasiparasitismus (Nachkommen stammen zwar vom Männchen des Brutpflege betreibenden Paares ab, nicht aber vom Weibchen) und die Übernahme von Nistplätzen samt begonnenen Gelegen nach dem Tod oder Abwandern der Vorbesitzer ein.

Atypisch große Gelege, Unterschiede in der Eigröße und Eimorphologie innerhalb von Gelegen oder atypisch kurze Legeintervalle können auf gemischte Mutterschaften hinweisen. Um deren Auftreten zweifelsfrei nachweisen und die Häufigkeit verlässlich abschätzen zu können, sind allerdings molekulare Methoden des Mutterschaftsausschlusses unabdingbar (vgl. Grønstøl et al. 2006). Nur über molekulargenetische Verfahren lässt sich auch innerartlicher Brutparasitismus von Quasiparasitismus unterscheiden.

Umfangreiche molekulargenetische Elternschaftsanalysen an der sozial monogamen Tannenmeise haben gezeigt, dass außerhalb des Paarbundes gezeugte Nachkommen und damit Bruten mit gemischten Vaterschaften sehr häufig vorkommen (Lubjuhn et al. 1999; Dietrich et al. 2004). Im folgenden soll dargestellt werden, wie häufig bei der Tannenmeise gemischte Mutterschaften auftreten, und welche Mechanismen für das Auftreten gemischter Mutterschaften verantwortlich sein könnten.

2. Material und Methoden

Für detaillierte Untersuchungen zum Anpassungswert von Kopulationen außerhalb des Paarbundes (vgl. z. B. Dietrich et al. 2004; Schmoll et al. 2005) wurden in den Jahren 2000-2002 insgesamt 483 Nistkasten-Bruten der Tannenmeise in einem Nadelforst bei Lingen/Emsland (Niedersachsen, 52°27' N, 7°15' E, Details bei Altenkirch & Winkel 1991) untersucht und Blutproben von Nestlingen und den Brutpflege betreibenden Altvögeln für molekulargenetische Elternschaftsanalysen entnommen. Alle Freiland- und molekulargenetischen Methoden sind ausführlich an anderer Stelle beschrieben (Schmoll et al. 2003; Dietrich et al. 2004), so dass sie hier nur im Überblick dargestellt werden.

Im Alter von 10-14 Tagen wurde den Jungvögeln und den die Brut fütternden Altvögeln (im folgenden Putativeltern) eine geringe Menge Blut aus der Flügelvene entnommen (eine entsprechende tierschutzrechtliche Genehmigung der Bezirksregierung Weser-Ems lag vor; Az. 509f-42502-46) und

Tab. 1: Vier Fälle gemischter Mutterschaften in Erstbruten der Tannenmeise mit insgesamt zehn Nachkommen, für die sowohl die Putativmutter als auch der Putativvater von der genetischen Elternschaft ausgeschlossen wurde. BS = Band-Sharing-Koeffizient. – Four cases of mixed maternity in first broods of the Coal Tit involving ten offspring, for which the putative mother as well as the putative father were excluded from genetic parentage. BS = band-sharing coefficient.

Brut brood	Jahr year	Gelege- größe clutch size	Geschlüpfte Nachkommen offspring hatched	Analysierte Nachkommen offspring analysed	% Mutterschaft ausgeschlossen % maternity excluded	Individuum individual	Neue Banden ¹ new fragments ²	Ausgewertete Banden fragments analysed	BS mit Putativ- mutter BS putative mother	BS mit Putativ- vater BS putative father
214	2001	9	8	8	12,5 %	A997340	5	7	0,00	0,21
27	2002	11	11	11	18,2 %	U027697	8	9	0,09	0,00
–	–	–	–	–	–	U027698	14	17	0,06	0,15
75	2002	13	12	12	41,7 %	U027703	8	8	0,00	0,00
–	–	–	–	–	–	U027705	7	7	0,00	0,00
–	–	–	–	–	–	U027706	8	8	0,00	0,00
–	–	–	–	–	–	U027711	7	8	0,13	0,00
–	–	–	–	–	–	U027713	6	6	0,00	0,00
925	2002	10	8	7	28,6 %	U027557	10	12	0,00	0,14
–	–	–	–	–	–	U027562	13	17	0,06	0,18

¹Banden, die weder auf das DNA-Fingerprinting-Bandenmuster der Putativmutter noch des Putativvaters zurückführbar sind (vgl. Abb. 1)

²fragments, which can neither be attributed to the putative mother's nor to the putative father's DNA fingerprint banding pattern (see Abb. 1).

konserviert. Elternschaftsanalysen wurden mittels Multilocus-DNA-Fingerprinting durchgeführt, das den sicheren Ausschluss genetischer Elternschaften bei Tannenmeisen erlaubt (Lubjuhn et al. 1999; Dietrich et al. 2004). Vergleiche zwischen unterschiedlichen Multilocus-DNA-Fingerprint-Gelen wurden nach der in Schmoll et al. (2003) beschriebenen Methode durchgeführt.

Band-Sharing-Koeffizienten (BS) zwischen den Multilocus-DNA-Fingerprint-Bandenmustern zweier Individuen A und B wurden berechnet als $BS = 2 N_{AB} / (N_A + N_B)$ mit N_{AB} = Anzahl übereinstimmender Banden der Individuen A und B, N_A = Anzahl der Banden bei Individuum A und N_B = Anzahl der Banden bei Individuum B (Wetton et al. 1987).

3. Ergebnisse

Im Rahmen der Elternschaftsanalysen wurden zehn Nachkommen aus vier verschiedenen Erstbruten identifiziert, deren DNA-Fingerprinting-Bandenmuster auffällig geringe Übereinstimmungen mit dem Bandenmuster sowohl der Putativmutter als auch des Putativvaters aufwiesen (siehe Tab. 1). Bei im Mittel (\pm Standardabweichung) $9,9 \pm 4,0$ auswertbaren Fragmenten in ihren Bandenmustern wiesen diese Nachkommen $8,6 \pm 2,9$ Fragmente auf, die weder der Putativmutter noch dem Putativvater zugeordnet werden konnten (so genannte neue Fragmente, vgl. Abb. 1 und Tab. 1). Diese Zahl liegt knapp doppelt so hoch wie die von Dietrich (2001) errechnete mittlere Zahl neuer Fragmente von Nachkommen, für die nur die genetische Vaterschaft ausgeschlossen wurde ($4,7 \pm 1,7$ bei $12,5 \pm 2,6$ auswertbaren Fragmenten). Eine Zufallsstichprobe für zehn dieser außerhalb des Paarbundes gezeugten Nachkommen wies einen signifikant geringeren Anteil neuer Fragmente an der Anzahl auswertbarer Fragmente auf als die zehn auffälligen Nachkommen (Generalisiertes Lineares Modell mit binomialer Fehlerstruktur: $\chi^2 = 35,7$, $df = 1$, $p < 0,001$). Die Band-Sharing-Koeffizienten der zehn auffälligen Nachkommen mit ihren Putativmüttern betragen im Mittel $0,03 \pm 0,05$, die Band-Sharing-Koeffizienten mit den Putativvätern $0,07 \pm 0,09$ (vgl. auch Tab. 1; beide Mittelwerte liegen im Bereich, der für unverwandte Tiere zu erwarten ist, vgl. Dietrich 2001). Aufgrund dieser Befunde wurde für diese zehn (= 0,3 %) der insgesamt 3563 erfolgreich genotypisierten Nachkommen die Putativmutter von der genetischen Mutterschaft ausgeschlossen. Damit wiesen vier (= 0,8 %) von insgesamt 483 beprobten Bruten gemischte Mutterschaften auf. Der Anteil der Nachkommen, für welche die genetische Mutterschaft der Putativmutter ausgeschlossen wurde, an der Zahl erfolgreich genotypisierter Nestlinge pro Brut variierte zwischen 12,5 % und 41,7 %. Für alle zehn auffälligen Nachkommen wurden aufgrund der molekulargenetischen Befunde auch die jeweiligen Putativväter von der genetischen Vaterschaft ausgeschlossen (vgl. Tab. 1).

In Brut 214 (vgl. Tab. 1) konnte der einzelne Nachkomme, für den die Putativeltern von der genetischen

Elternschaft ausgeschlossen wurden, zweifelsfrei einem Brutpaar als genetischer Nachkomme zugeordnet werden, das in einem nahe gelegenen Nistkasten (Entfernung ca. 100 m) eine Brut aufzog. Ein visueller Abgleich der genetischen Fingerabdrücke zeigte, dass sich das Bandenmuster dieses Nestlings vollständig aus den Bandenmustern der Partner des benachbarten Brutpaares zusammensetzen ließ. Seine Band-Sharing-Koeffizienten mit den mutmaßlichen genetischen Eltern betragen 0,44 mit der Mutter und 0,46 mit dem Vater (beide Werte liegen im Bereich, der für verwandte Tiere 1. Grades zu erwarten ist, vgl. Dietrich 2001). Die aufgrund bekannter Legebeginne und bekannter Vollgelegegrößen errechneten Legeperioden beider beteiligter Weibchen überlappten (Putativmutter: 22. - 30. April, genetische Mutter: 29. April - 5. Mai). Für die anderen neun Nestlinge mit ausgeschlossenen Mutterschaften konnten keine genetischen Eltern identifiziert werden.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten gemischte Mutterschaften in 0,8% von 483 Brutten der Tannenmeise nachgewiesen werden und für 0,3% der insgesamt 3563 erfolgreich genotypisierten Nachkommen wurde die Brutpflege betreibende Putativmutter von der genetischen Mutterschaft ausgeschlossen. Damit sind Brutten mit gemischter Mutterschaft ein vergleichsweise seltenes Phänomen. Für die Weibchen der Tannenmeise kann daher in evolutionsbiologischen Untersuchungen sozialer Fortpflanzungserfolg mit genetischem Fortpflanzungserfolg gleichgesetzt werden. Dies steht in ausgeprägtem Gegensatz zu den Befunden bei Männchen, für die dies aufgrund der sehr hohen außerpaarlichen Vaterschaftsraten nicht gilt (Lubjuhn et al. 1999; Dietrich et al. 2004).

Obwohl Nistkastenpopulationen häufig für molekulargenetische Untersuchungen genutzt werden, sind gemischte Mutterschaften bei anderen Meisen bisher nur sehr selten beschrieben worden. Kempnaers et al. (1995) fanden z. B. keine Hinweise für das Auftreten von innerartlichem Brutparasitismus bei Blau- und Kohlmeisen (*Cyanistes caeruleus* und *Parus major*): Molekulargenetische Elternschaftsanalysen bei Blau- und Kohlmeisen erlaubten, das Auftreten gemischter Mutterschaften auszuschließen und eine experimentelle Parasitierung der Brutten beider Arten rief keine Zurückweisung von künstlichen Eiern durch die Nestsitzerinnen hervor (Kempnaers et al. 1995). Dies spricht gegen eine verbreitete, fest im Verhaltensrepertoire der beiden Arten verankerte alternative Fortpflanzungsstrategie. Allerdings berichten Vedder et al. (2007) von insgesamt zehn Eiern der Blaumeise aus sechs verschiedenen Brutten, die durch engmaschige Kontrollen während der Legeperiode und durch abweichende Morphologie als parasitisch identifiziert wurden (ein molekularer Nachweis gelang allerdings nicht). Vedder et al.

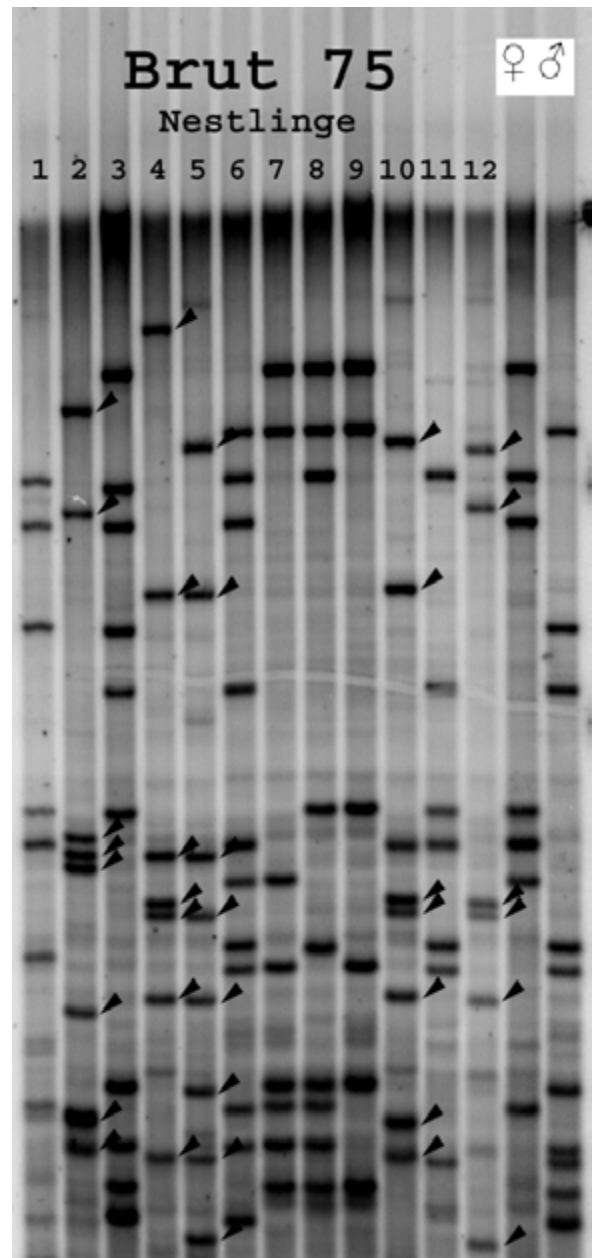


Abb. 1: Genetische Fingerabdrücke für eine Tannenmeisenbrut mit gemischter Mutterschaft (vgl. Tab. 1, Brut 75). Die Bandenmuster der Nestlinge 2, 4, 5, 10 und 12 weisen eine sehr hohe Anzahl so genannter neuer Fragmente auf (markiert durch Pfeile), die weder auf die Putativmutter noch auf den Putativvater zurückführbar sind. Für diese Nestlinge wurden beide Putativeltern von der genetischen Elternschaft ausgeschlossen. – *Multilocus DNA fingerprints for a Coal Tit brood with mixed maternity (see table 1, brood 75). Nestlings 2, 4, 5, 10 and 12 show a very high number of so-called new fragments (indicated by arrows), which can be attributed neither to the putative mother nor to the putative father. Both putative parents were excluded from genetic parentage for these nestlings.*

(2007) mutmaßen, dass hier starke innerartliche Konkurrenz um Nisthöhlen bei einer außergewöhnlich hohen Populationsdichte zu brutparasitischem Verhalten von bestimmten Weibchen im Rahmen einer "best-of-a-bad-job"-Strategie geführt hat. Winkel et al. (2002) berichten von einer Blaumeisen-Brut mit 19 Eiern und 17 geschlüpften Nachkommen, für die über Multilocus-DNA-Fingerprinting die Beteiligung von zwei genetischen Müttern nachgewiesen wurde (für sechs Nachkommen wurde die Putativmutter von der genetischen Mutterschaft ausgeschlossen). Des Weiteren berichten Verboven & Mateman (1997) für die Kohlmeise von insgesamt vier Nachkommen aus zwei verschiedenen Brutten, für die die genetische Mutterschaft im Rahmen molekulargenetischer Elternschaftsanalysen ausgeschlossen wurde. Im einen Fall wurden drei solcher Nachkommen als das Resultat einer Übernahme des Nistkastens bewertet, im anderen Fall könnte es sich um innerartlichen Brutparasitismus gehandelt haben.

Welche Ursachen könnten dem Auftreten gemischter Mutterschaften bei der Tannenmeise zu Grunde liegen? Da neben den Putativmüttern auch die Putativväter für alle zehn auffälligen Nachkommen von der genetischen Elternschaft ausgeschlossen wurden, scheidet Quasiparasitismus (Nachkommen stammen zwar vom Männchen des Brutpflege betreibenden Paares ab, nicht aber vom Weibchen) oder ein Fall monoterritorialer, sozialer Bigynie als Erklärungen aus. Bei einer Brut (Brut 75, Tab. 1) deutet eine scheinbare, drei Tage umfassende "Legepause" in der Legesequenz auf die Übernahme eines Nistkastens samt begonnenem Gelege hin. Wir halten solche Übernahmen von Nistkästen nach Tod oder Abwandern der Vorbesitzerin für die wahrscheinlichste Erklärung gemischter Mutterschaften bei der Tannenmeise. So gibt es alljährlich Feststellungen, dass Weibchen der Tannenmeise während der Legeperiode von Kohlmeisen in ihrem Nistkasten getötet werden (Glutz von Blotzheim & Bauer 1993 und W. Winkel, eigene Beobachtungen), so dass Nistkästen mit bereits begonnenen Gelegen auch von Tannenmeisen neu besiedelt werden könnten. Die Vorstellung einer Übernahme von Kästen wird auch durch die Feststellung von Brutten gestützt, in denen Nestlinge der Tannenmeise zusammen mit Nestlingen anderer Meisenarten von Altvögeln anderer Arten aufgezogen werden (W. Winkel, eigene Beobachtungen, vgl. auch Glutz von Blotzheim & Bauer 1993). Außerdem wäre denkbar, dass Störungen an der eigenen Höhle zur Folge haben, dass einzelne Eier in Nester von in der Nähe befindlichen Nistkästen "verlegt" werden, weil die Eiablage aus physiologischen Gründen in etwa 24-stündigen Intervallen erfolgen muss.

Bei Brut 214 (Tab. 1) konnten die Partner eines Brutpaares, das etwa zeitgleich in der Nähe eine eigene Brut aufzog, als die genetischen Eltern eines einzelnen Nachkommen identifiziert werden (in allen anderen Fällen

konnten die genetischen Eltern der Nachkommen mit ausgeschlossener Mutterschaft nicht nachgewiesen werden). Da die Legeperioden beider Weibchen überlappen, könnte hier u. U. auch ein Fall von innerartlichem Brutparasitismus im Sinne einer gemischten Fortpflanzungsstrategie vorliegen. Nicht völlig auszuschließen als Ursache für gemischte Mutterschaften ist schließlich auch eine Verbringung von Eiern durch menschliche Hand (Störungen durch Besucher).

Für zwei der untersuchten Fälle bestanden bereits im Vorfeld der genetischen Analyse Hinweise auf mögliche gemischte Mutterschaften: Eine Gelegegröße von 13 Eiern wie bei Brut 75 ist ungewöhnlich und liegt am oberen Rand der natürlichen Variation für die Tannenmeise (Glutz von Blotzheim & Bauer 1993). Bei Brut 925 fielen bei Gelegekontrollen zwei diskrete Ei-Typen auf, die sich in der Sprengelung sichtbar unterschieden. In den beiden anderen Fällen (Bruten 214 und 27) gab es jedoch a priori keine solchen Hinweise, was die Notwendigkeit molekularer Verfahren wie genetischer Elternschaftsanalysen oder Protein-Fingerprinting (Andersson & Åhlund 2001) zum verlässlichen Nachweis gemischter Mutterschaften unterstreicht (vgl. Grønstøl et al. 2006).

Dank: Wir danken Ommo Hüppop, Wolfgang Fiedler und einem anonymen Gutachter für eine kritische Durchsicht dieses Beitrags.

5. Zusammenfassung

Mittels molekulargenetischer Elternschaftsanalyse wurde eine niedrige Rate gemischter Mutterschaften in Brutten der sozial monogamen Tannenmeise nachgewiesen, einer Art, die sich durch hohe Fremdpatenschaftsraten auszeichnet. Gemischte Mutterschaften wurden in vier (= 0,8 %) von 483 Brutten entdeckt und nur für zehn (= 0,3 %) von 3563 erfolgreich genotypisierten Nachkommen wurde die Putativmutter von der genetischen Mutterschaft ausgeschlossen. In Anbetracht dieser sehr niedrigen Rate kann in evolutionsbiologischen Studien der soziale Fortpflanzungserfolg mit dem genetischen Fortpflanzungserfolg für Weibchen der Tannenmeise ohne weiteres gleichgesetzt werden. Die Putativväter wurden ebenfalls in allen Fällen von der genetischen Elternschaft ausgeschlossen, was Quasiparasitismus als Erklärung für gemischte Mutterschaften ausschließt. In einem Fall konnten die Partner eines Brutpaares, das zeitgleich in der Nähe eine eigene Brut aufzog, zweifelsfrei als die genetischen Eltern eines einzelnen Nachkommen identifiziert werden. Mögliche Ursachen für das Auftreten gemischter Mutterschaften bei der Tannenmeise schließen die Übernahme von Nistkästen samt begonnenen Gelegen nach dem Tod oder Abwandern der Vorbesitzer und innerartlichen Brutparasitismus ein.

6. Literatur

- Åhlund M & Andersson M 2001: Brood parasitism - Female ducks can double their reproduction. *Nature* 414: 600-601.
- Altenkirch W & Winkel W 1991: Versuche zur Bekämpfung der Lärchenminiermotte (*Coleophora laricella*) mit Hilfe insektenfressender Singvögel. *Waldhygiene* 18: 233-255.
- Andersson M & Åhlund M 2001: Protein fingerprinting: A new technique reveals extensive conspecific brood parasitism. *Ecology* 82: 1433-1442.
- Dietrich V 2001: Zum Auftreten alternativer Fortpflanzungsstrategien in einer Lingener Population der Tannenmeise (*Parus ater*). Diplomarbeit TU Braunschweig: 82 Seiten.
- Dietrich V, Schmoll T, Winkel W, Epplen JT & Lubjuhn T 2004: Pair identity - an important factor concerning variation in extra-pair paternity in the coal tit (*Parus ater*). *Behaviour* 141: 817-835.
- Glutz von Blotzheim UN & Bauer KM 1993: Handbuch der Vögel Mitteleuropas, 13/I, Passeriformes (Teil 4). Wiesbaden: Aula.
- Griffith SC, Owens IPF & Thuman KA 2002: Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Mol. Ecol.* 11: 2195-2212.
- Grønstøl G, Blomqvist D & Wagner RH 2006: The importance of genetic evidence for identifying intra-specific brood parasitism. *J. Avian Biol.* 37: 197-199.
- Kempenaers B, Pinxten R & Eens M 1995: Intraspecific brood parasitism in two tit *Parus* species: occurrence and responses to experimental parasitism. *J. Avian Biol.* 26: 114-120.
- Lubjuhn T 2005: Fremdgehen mit Folgen? - Kosten und Nutzen von Fremdkolonien bei Vögeln. *Vogelwarte* 43: 3-13.
- Lubjuhn T, Gerken T, Brün J & Epplen JT 1999: High frequency of extra-pair paternity in the Coal Tit. *J. Avian Biol.* 30: 229-233.
- Petrie M & Møller AP 1991: Laying eggs in other nests - Intraspecific brood parasitism in birds. *Trends Ecol. Evol.* 6: 315-320.
- Schmoll T, Dietrich V, Winkel W, Epplen JT, Schurr F & Lubjuhn T 2005: Paternal genetic effects on offspring fitness are context dependent within the extrapair mating system of a socially monogamous passerine. *Evolution* 59: 645-657.
- Schmoll T, Janzon V, Epplen JT & Lubjuhn T 2003: Extra-pair sires as identified by means of standardized across-gel comparisons in multilocus DNA fingerprints. *Electrophoresis* 24: 2758-2763.
- Vedder O, Kingma SA, von Engelhardt N, Korsten P, Groothuis TGG & Komdeur J 2007: Conspecific brood parasitism and egg quality in blue tits *Cyanistes caeruleus*. *J. Avian Biol.* 38: 625-629.
- Verboven N & Mateman AC 1997: Low frequency of extra-pair fertilizations in the Great Tit *Parus major* revealed by DNA fingerprinting. *J. Avian Biol.* 28: 231-239.
- Wetton JH, Carter RE, Parkin DT & Walters D 1987: Demographic study of a wild House Sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature* 327: 147-149.
- Winkel W, Winkel D & Lubjuhn T 2002: Blaumeisenpaar (*Parus caeruleus*) zieht in einer Brut 17 Nestlinge auf. *Vogelwarte* 41: 269-271.
- Yom-Tov Y 2001: An updated list and some comments on the occurrence of intraspecific nest parasitism in birds. *Ibis* 143: 133-143.