Genetische Untersuchungen zur Diversität von Seeforellen im Bodensee-Obersee

Abschlussbericht

Im Auftrag der Internationalen Bevollmächtigtenkonferenz für die Bodensee-Fischerei (IBKF) AG Wanderfische













Interreg IV – Abschlussbericht

Genetische Untersuchungen zur Diversität von Seeforellen im Bodensee-Obersee

Im Auftrag der Internationalen Bevollmächtigtenkonferenz für die Bodensee-Fischerei (IBKF) AG Wanderfische

R. Jehle, H. Kindle, R. Kistler, M. Klein, M. Konrad (Projektkoordinator), M. Kugler, H. Löffler, M. Michel (Vorsitz), R. Rösch, N. Schotzko, M. Schubert, D. Thiel.

Autor:

Dr. Jasminca Behrmann-Godel, Universität Konstanz, Limnologisches Institut, Mainaustrasse 252, 78457 Konstanz

Projektarbeiten: Kinga Gerber, Jasminca Behrmann-Godel

Konstanz, den 10. Oktober 2014

Inhaltsverzeichnis

1	AUF	TRAC	G UND ZIELSETZUNG	4
2	EIN	LEITU	NG	5
	2.1	Ents	tehung des Bodensees und seine Besiedelung mit Fischen	5
	2.2	Phyl	ogeographie der Forelle Salmo trutta	7
	2.3	Besc	hreibung der Bodensee- Zuflüsse	9
	2.4	Zusa	mmenbruch der Seeforellenpopulation und anschließende Besatzmaßnahmen	9
	2.5	Wiss	enswertes über Forellen-Populationsstrukturen	10
	2.6	Mol	ekulare Marker	12
	2.7	MT-	DNA als molekularer Marker	12
	2.8	Mikı	osatelliten als molekulare Marker	13
3	ME	THOD	DEN	15
	3.1	Prob	ennahme	15
	3.2	Mol	ekulare Methoden	18
	3.2.	1	DNA-Extraktion	18
	3.2.	2	Quantifizierung der DNA	18
	3.2.	3	PCR-Protokoll zur Amplifikation der mtDNA	19
	3.2.	4	Sequenzieren	19
	3.2.	5	Amplifikation der Mikrosatelliten	20
	3.2.	6	Analyse der mtDNA Sequenzen	22
	3.2.	7	Analyse der Mikrosatelliten-Daten	23
4	ERG	iebni	SSE	26
	4.1	mtD	NA- Analyse	26
	4.1.	1	Einordnung der Haplotypen nach geographischen Gesichtspunkten	26
	4.2	Anal	yse der Populationsstruktur	31
	4.2.	1	Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE)	31
	4.2.	2	FST-Werte	33
	4.2.	3	Analyse mit STRUCTURE	35
5	SCH	LUSS	FOLGERUNGEN UND AUSBLICK	38
	5.1 Apalys	Gen	etische Differenzierung der Forellen zwischen verschiedenen Zuflüssen (Mikrosatelliten	38
	5.2		derbesiedelung des Bodensee mit Seeforellen (mtDNA Analysen)	30
	5.2	Horl	unft der Bodenseeforellen (mtDNA Analyse)	40
6	5.5 71 IC			44
7	203 1 ITF	ΓΑΤΙ	IRVERZEICHNIS	46
				.0

1 AUFTRAG UND ZIELSETZUNG

Die AG Wanderfische (AG WF) beauftragte die Universität Konstanz im Jahr 2013/14 in einer Forschungskooperation eine Studie zur genetischen Vielfalt und Populationsstruktur der Bodenseeforelle durchzuführen. Dazu wurde Probenmaterial, welches im Rahmen des Interreg IV Projektes durch Mitarbeiter des Büro Hydra sowie Mitarbeitern der AG WF gewonnen wurde für genetische Analysen zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen der Studie wurden Seeforellen aus sieben verschiedenen Zuflüssen zum Bodensee, Rotach, Argen, Leiblach, Bregenzerach, Alpenrhein, Goldach und Steinach auf ihre Populationsstruktur untersucht. Hintergrund der Fragestellung war die Feststellung, ob Seeforellen, die in verschiedene Laichgewässer aufsteigen, zu genetisch unterschiedlichen Laichpopulationen gehören oder, ob es eine genetisch einheitliche Population an Seeforellen im Bodensee gibt, welche sich zufällig auf die verschiedenen Laichgewässer verteilt. Zusätzlich sollte anhand genetischer Marker und im Vergleich mit Literaturdaten festgestellt werden, aus welchen eiszeitlichen Rückzugsgebieten die Seeforelle den Bodensee ursprünglich besiedelt hat. Außerdem sollte untersucht werden, ob evtl. Nachkommen von Besatzfischen gefunden werden können, welche nach dem Zusammenbruch der Seeforellenpopulation in den 1970/80ger Jahren aus zum größten Teil unbekannten Quellen in den See und seine Zuflüsse eingesetzt wurden.

2 EINLEITUNG

2.1 Entstehung des Bodensees und seine Besiedelung mit Fischen

Im Tertiär (vor 3 Mio. Jahren) wurde mit der Alpenfaltung die Entstehung des Bodensees vorbereitet. Dabei entwickelte sich durch die enormen Spannungen in der Erdkruste ein Vorlandbecken, das sich zunächst mit dem Abtragungsschutt des neu entstandenen Gebirges auffüllte. Im Pleistozän (vor 2,5 Mio. Jahren) wurden diese Sedimente zum Teil durch den Rheingletscher wieder abgetragen und dabei entstand das Bodenseebecken (IGKB 2004). Das Bodenseegebiet mit seinen Zuflüssen wandelte sich ständig, der Rhein war im späten Tertiär noch ein direkter Zufluss zur Donau und veränderte dann seinen Lauf nach Westen. Außerdem hatte der Bodensee unmittelbar nach dem Abschmelzen der Gletscher einen beträchtlich höheren Wasserstand (15 m höher als heute). Rund um das Bodenseebecken waren sogenannte Eisseen in den zentripetalen Tälern durch den sich zurückziehenden Gletscher aufgestaut (Gradmann 1964). Die größten Veränderungen waren vor ca. 14 000 Jahren abgeschlossen. Seitdem hat sich die Gestalt des Bodensees kaum verändert (Furrer 1991). Er ist mit einer Fläche von 571,5 km² der zweitgrößte voralpine See und weist eine mittlere Tiefe von 95 m und eine maximalen Tiefe von 254 m auf. Die Struktur wird als heterogen beschrieben, wobei flache und tiefe Bereiche abwechseln, mit unterschiedlichen steinigen, sandigen oder schlammigen Abschnitten (Fischer und Eckmann, 1997).

Während der letzten Eiszeit waren weite Teile von Nordeuropa sowie die Alpen und andere höher gelegene Regionen von weitläufigen Gletschern bedeckt (Abbildung1A aus Taberlet *et al.,* 1998). Auch weite eisfreie Bereiche waren durch den vorherrschenden Permafrost bis in größere Tiefen gefroren und verhinderten das Vorkommen von fließendem Wasser. Aus diesem Grund waren die meisten Fischarten (sowie auch viele terrestrische Arten) in Rückzugsgebiete (Glaziale Refugien) verdrängt. Die Hauptrückzugsgebiete für Mitteleuropäische Arten waren die Iberische Halbinsel, Italien und der Balkan (Abbildung1). In diesen Rückzugsgebieten waren die Arten lange Zeit voneinander getrennt und entwickelten sich zu genetisch unterscheidbaren sog. phylogeographischen Linien. Am Ende des Pleistozän wurde Mitteleuropa dann aus diesen Rückzugsgebieten besiedelt und im Zuge dieser Besiedelung konnte es dazu kommen, dass verschiedene phylogeografische Linien aufeinander trafen in sog. Sekundärkontakt- oder Hybrid-Zonen (Abbildung1B aus Schmitt 2007). Der Bodensee liegt mitten in einer solchen Kontakt- Zone und somit könnten Fischlinien aus verschiedenen glazialen Refugien gefunden werden.



Abbildung 1: A) Vergletscherung Mitteleuropas (graue Zonen) während der letzten Kaltzeit (vor 20 000 – 18 000 Jahren), gezeigt ist auch die südliche Grenze des Permafrost (TTTT) sowie glaziale Refugien (R1 – R3) Iberische Halbinsel, Italien und Balkan, Quelle Taberlet *et al.*, 1998) B) Glaziale Refugien und potentielle Kontakt- oder Hybrid Zonen (H1 – H5) zwischen verschiedenen glazialen Linien, Quelle: Schmitt 2007.

Bereits vorhandene Studien über verschiedene andere Fischarten eröffnen Einblicke in Möglichkeiten der nacheiszeitlichen Besiedelung des neu entstandenen Bodensees. Generell war eine Erstbesiedelung mit Fischen erst nach und evtl. während des Rückzug des Rheingletschers am Ende der letzten Eiszeit (Würm-Eiszeit) möglich. Hierbei ist zu erwarten, dass Fische über die beiden am nächsten gelegenen Fluss Systeme Rhein und Donau in den Bodensee gelangten, in welchen für viele Fischarten verschiedene phylogeographische Linien zu finden sind. So wurden z.B. für den Flussbarsch eine Donaulinie und eine Rheinlinie im Bodensee gefunden (Behrmann-Godel et al. 2004). Der Bodensee hat heute keine Verbindung mehr zum Donausystem (abgesehen von einer unterirdischen, für Fische nicht passierbaren, die Donauwasser über die Donauversickerung in die Radolfzeller Aach und somit in den Untersee führt). Auch die Verbindung zum Rhein ist für die meisten aufsteigenden Fischarten durch den Rheinwasserfall nicht möglich. Durch den sich zurückziehenden Gletscher am Ende der WürmEiszeit entstanden aber proglaziale Seen, die zu Beginn noch eine Verbindung zum Donausystem hatten (Keller & Krayss 2000), wodurch eine Besiedelung des Bodensees aus der Donau möglich wurde. Auch zum Rhein bestand nach dem Rückzug des Rheingletschers zu Beginn eine Verbindung über einen langen zentripetalen See, der sich bis über den Walen- und Zürichsee erstreckte und eine Verbindung zum Rhein schaffte (Wagner 1960).

Das Beispiel der Trüsche deutet auf eine Kolonisation des Sees durch einzelne Fische aus glazialen atlantischen Refugien, welche über den Rhein in den Bodensee gelangten hin (Barluenga et al. 2006). Auch für die Groppe sind Nachfahren Atlantischer und Danubischer Linien zu finden (Behrmann-Godel unveröffentlicht). Für die Seeforelle ist ein ähnliches Ergebnis zu erwarten. Die Besiedelung wird aus den beiden nächstgelegenen glazialen Refugien Rhein und Donau heraus vonstattengegangen sein.

2.2 Phylogeographie der Forelle Salmo trutta

Da es sich bei der Seeforelle um eine wandernde Form der Bachforelle handelt, kann hier auch der Bezug zur Bachforellenverteilung hergestellt werden. Über die Phylogeographie der Bachforelle ist wesentlich mehr bekannt, als über die wandernde Seeforelle. Basierend auf Sequenzunterschieden in der mtDNA-Kontroll-Region (310 bp) wurden in Europa fünf geographisch getrennte Haupthaplotypen-Linien der Bachforelle identifiziert: Atlantik- (AT), Donau- (DA), Mediterran- (ME), Adria- (AD) Stamm, und der in Norditalien vorkommende *marmoratus*- (MA) Stamm (Bernatchez et al. 1992) (Abbildung2). Studien mit einer größeren Anzahl an Basenpaaren (1250 bp, Giuffra et al. 1994) oder mit kombinierten Daten von der Kontroll-Region und RFLP-Analysen mitochondrialer Gene (Suárez et al. 2001) unterstützen die Einteilung der Haplotypenlinien.



Abbildung 2: Biogeographische Verteilung der mtDNA Haplotypen der Bachforelle in Europa, Farben geben die unterschiedlichen Linien an: Blau = Atlantisch, Rot = Danubisch, Gelb = Mediterran + Adriatisch, Grün = Mediterran, Violett = Marmoratus, Quelle: http://www.reiserat.de/reisen_europa/europa-07.png, verändert nach Suárez et al. 2001

Die Phylogeographie dieser Linien wurden von Bernatchez (2001) beschrieben. Er postulierte, dass die Linien lange Zeit allopatrisch blieben, ganz im Gegensatz zu dem stark ausgeprägten Wanderverhalten der Spezies. Die AT-Linie besiedelt das Atlantische Becken, von Marokko bis zum Weißen Meer, während die DA-Haplotypen in den Flüssen des Ponto-Kaspischen Gebiets dominieren. In Südeuropa wurde die MA-Linie in zahlreichen Flüssen in Italien, Slowenien und Kroatien beobachtet. Das Vorkommen der AD-Linie in östlich-mediterranen Gebieten führte zu der Annahme, dass die AD-Linie ursprünglich aus glazialen Refugien des Balkans und Anatoliens stammt. Die hohe Abundanz der ME-Linie in Flüssen, die in das westliche Mittelmeer münden, ließ darauf schließen, dass die ME-Haplotypen ursprünglich aus diesem Gebiet stammten (Cortey et al. 2004). Da sich das Bodenseegebiet an der Grenze von Haupt-Haplotypenlinien befindet, ist eine Untersuchung der Haplotypenzusammensetzung sehr interessant.

2.3 Beschreibung der Bodensee- Zuflüsse

Die sieben hier untersuchten Zuflüsse Rotach, Argen, Leiblach, Bregenzerach, Alpenrhein, Goldach und Steinach sind als bedeutende Seeforellengewässer bekannt (IGKB 2009), jedoch weisen sie alle mehr oder weniger erhebliche Aufstiegsstörungen durch Querbauten auf. Die gewässernahe Landnutzung wird bei allen Zuflüssen betrieben und resultiere in Eintrag von Feinsedimenten und Düngestoffen und es mangelt an Deckungsstrukturen für Jungfische (IGKB 2009). Die Aufstiegsstörungen werden detailliert im Endbericht des Interreg IV (Seeforelle: Arterhaltung in den Bodenseezuflüssen) beschrieben und diskutiert und sind dort detailliert nachzulesen.

Bereits im letzten Jahrhundert (Klunzinger 1881) wurde beobachtet, dass die Seeforelle zum Laichen bevorzugt in die stärker strömenden Zuflüsse aufsteigt, wobei jedoch die württembergischen Zuflüsse eine geringere Bedeutung als Laichhabitat hatten. Dies spiegelt vor allem die früh einsetzende Verbauung dieser Flüsse wider. Diese besitzen zwar geeignete Strukturen zur Fortpflanzung von Forellen in flussaufwärts gelegenen Gewässerabschnitten, diese sind jedoch durch Verbauungen von den Seeforellen nicht mehr erreichbar und die See nahen Abschnitte sind strukturell ungeeignet für eine natürliche Reproduktion (Rulé et al. 2005).

2.4 Zusammenbruch der Seeforellenpopulation und anschließende Besatzmaßnahmen

Der durch den Lebenszyklus der Seeforelle vorgegebene Wechsel zwischen dem Bodensee und seinen Zuflüssen macht diese Fischart für anthropogene Veränderungen besonders anfällig (Schulz 1995). Zahlreiche Veränderungen trugen zur drastischen Einschränkung der natürlichen Reproduktion und Dezimierung der Bestände bei: schlechtere Erreichbarkeit der Fortpflanzungshabitate durch Quer- und Längsverbauungen der Flüsse, Verschlechterung der Wasserqualität, veränderte Wasserführung und Austrocknung der Laichplätze als Folge von Grundwasserabsenkungen und starker Befischungsdruck im Bodensee und seinen Zuflüssen (Rulé et al. 2005). Als Folge davon brach ab Mitte des letzten Jahrhunderts der Seeforellenbestand im Bodensee zusammen. Daraufhin wurden zahlreiche Maßnahmen ergriffen, um diese Entwicklung aufzuhalten. Etliche Aufstiegshindernisse wurden beseitigt, Uferabschnitte wurden renaturiert und die Schonmaßnahmen im See wurden verschärft.

Gleichzeitig führte man besatzwirtschaftliche Maßnahmen zur Erhaltung des Fischbestandes durch. Anstrengungen gingen dahin, den See mit autochthonem Besatzmaterial zu versehen, was allerdings das Vorhandensein von geschlechtsreifen Fischen voraussetzt. Doch im Jahre 1983 konnten vor dem Reichenauer Kraftwerk gerade noch vier Weibchen und ein Männchen gefangen werden. Von diesen Fischen wurden rund 2000 Eier gestreift, die den Grundstock für weitere Besatzmaßnahmen bildeten. In den folgenden Jahren wurden weitere Eier und Jungfische aus anderen Zuflüssen mit in den Besatz einbezogen (Rulé et al. 2005). Zusätzlich erfolgte der Zukauf von Besatzmaterial aus dem Genfer See, dem Alpsee (Bayern) und verschiedenen anderen bayerischen Voralpenseen z.B. dem Walchensee und weiteren unbekannten Quellen. Dabei wurden leider genetische Kriterien (- kein Besatz von Fischen aus fremden Einzugsgebieten- Largiadèr & Hefti 2002) außer Acht gelassen. Es kann also nicht mehr genau nachvollzogen werden, woher die eingesetzten Fische ursprünglich stammten.

2.5 Wissenswertes über Forellen-Populationsstrukturen

Aufgrund der großen Beliebtheit als Angelfisch und in der Berufsfischerei wurde die Struktur von Forellenpopulationen in verschiedensten Gebieten bereits analysiert.

Durch Markierungsversuche im Bodensee entdeckte Schulz (1995), dass aus Nachkommen der Bachforellen auch wandernde Formen entstehen können und umgekehrt. Dieses Phänomen scheint nicht nur auf Forellen beschränkt zu sein, sondern es ist wohl auch bei anderen Salmoniden weit verbreitet, so zum Beispiel bei *Salvelinus alpinus* (Nordeng, 1983) und *Salmo salar* (Birt et al. 1991). Einige Studien konnten keine genetische Differenzierung zwischen den verschiedenen Lebensformen innerhalb eines Zuflusses nachweisen (Charles et al. 2005, Guyomard 1999, Hindar et al. 1991). Im Gegensatz dazu fanden Ferguson & Taggart (1991) genetische Differenzierungen zwischen sympatrisch lebenden Forellenpopulationen in Lough Melvin, Irland. Hier wurden drei verschiedene Morphotypen der Bachforellen in verschiedenen Zuflüssen zum See gefunden. Diese stellten separate genetische Linien dar, welche sich durch präzises Homing-Verhalten und reproduktive Isolation in separierte Populationen in den Zuflüssen auftrennen ließen. Auch innerhalb eines Wasserlaufes kann es zur Aufspaltung der genetischen Struktur kommen. Vor allem Migrationsbarrieren, wie unüberwindbare Wasserfälle können zu einer genetischen Differenzierung von residenten und wandernden Forellen führen. Dabei wird die Aufspaltung der Populationen vor allem dadurch aufrechterhalten, dass auf die Fortpflanzungsgruppe oberhalb des Wasserfalls ein hoher Selektionsdruck ausgeübt wird, den Standort nicht zu verlassen. Jeder Fisch, der die Migrationsbarriere hinter sich lässt, ist für die Population verloren (Jonsson 1982). Bei Untersuchungen von Forellen in einem Wasserlauf im Westen Norwegens wird vermutet, dass eine multiple Kolonisation von zwei genetisch unterschiedlichen Populationen dazu führte, dass residente und anadrome Forellen sich in zwei Gruppen aufspalteten (Skaala & Naevdal 1989).

Aber auch ohne topographische Fragmentation des Flusses kann es zu einer feinskaligen genetischen Struktur innerhalb eines Wasserlaufes kommen. Durch ausgeprägtes Homing-Verhalten und niedrige Migrationsraten wurde eine Populationsaufspaltung in einem Fluss in Zentral-Schweden entdeckt (Carlsson et al. 1999, Carlsson & Nilsson 2000).

Nicht nur natürliche Phänomene können zur Populationsaufspaltung führen, auch artifizieller Besatz spielt eine große Rolle bei der genetischen Zusammensetzung einer Population. Berrebi et al. (2000) zeigen, dass die Introgression von Zuchtfischen in natürliche Bestände zu einer Vermehrung von Allelen geführt hatten. Die genetischen Unterschiede in den einzelnen Stichproben waren abhängig davon, wie stark sich die Zuchtfische in der natürlichen Population etablierten. Die Populationsaufspaltung war nicht mehr zu beobachten, wenn alle Zuchtfische aus der Analyse entfernt wurden.

Die Introgression von Zuchtfischen in natürliche Bestände ist jedoch nicht für alle Lebenszyklusstrategien gleich. Es hat sich gezeigt, dass Einkreuzungen von Besatzforellen vor allem bei residenten Beständen einer Population zu finden sind. Es wird eine schlechtere Anpassung der Besatzfische an einen wandernden Lebenszyklus vermutet, bei dem wechselnde Habitatgegebenheiten zu höherem Selektionsdruck führen, ganz im Gegensatz zur stationären Lebensform, bei der die Habitatbedingungen eher stabil bleiben (Hansen et al. 2000, Ruzzante et al. 2004).

2.6 Molekulare Marker

Für genetische Analysen werden kleine Abschnitte der DNA, die repräsentativ für viel größere Bereiche des Genoms stehen, herangezogen. Molekulare Marker sind DNA Sequenzen, die als Indikatoren für eine genom-weite Variation stehen (Beebee und Rowe, 2005).

2.7 MT-DNA als molekularer Marker

Das mitochondriale Genom spielt eine wichtige Rolle als genetischer Marker in der Populationsund Evolutionsbiologie in den letzten drei Jahrzehnten und bietet Einblicke in Populationsstrukturen, Genfluss, Hybridisierung, Biogeographie und phylogenetische Beziehungen (Moritz 1987). Nicht ohne Grund ist ein Fragment des mitochondrialen Genoms, COX1, seit kurzem das standardisierte Werkzeug für die molekulare Taxonomie und dient zur Identifikation von Mitgliedern des Tierreichs (Ratnasingham & Herbert, 2007). Dabei spricht man von DNA Barcoding als Methode zur Artenbestimmung.

Das mitochondriale Genom wird generell maternal vererbt und man nimmt an, dass aufgrund der Haploidie keine Rekombination stattfindet (Galtier et al. 2009). Die Mutationsrate der mtDNA ist ca. 5-10 mal höher als die des Kerngenoms (Brown et al. 1979) und damit ergeben sich größere intraspezifische genetische Variationen. Die erhöhte Mutationsrate wird vor allem auf eine geringere Effektivität der DNA- Reparaturmechanismen zurückgeführt (Wilson et al. 1985).

Ein Teil des mitochondrialen Genoms besteht aus einer nicht kodierenden Sequenz, der Kontrollregion, oder auch "displacement Loop" (d-Loop) genannt, welche essentielle Informationen für die Initiation der Transkription und der DNA Replikation der mitochondrialen Gene beinhaltet. Nicht kodierende Bereiche sind variabler verglichen mit den konservierten kodierenden Genregionen, weil eine Selektion als Folge evolutiver Veränderungen in dieser Region überhaupt keine Auswirkung auf die Fitness des Individuums hat (Beebee und Rowe, 2005). Diese neutralen Mutationen akkumulieren mit der Zeit, so dass das Auseinanderlaufen der mtDNA Linien in etwa der Divergenz Zeit entsprechen müsste (clock-like) (Galtier et al. 2009). Deshalb zeigen mehrere Regionen des d-Loops ein hohes Maß an Variation zwischen Populationen derselben Art, hier akkumulieren Basensubstitutionen und Umordnungen des Genoms (Harrison 1989). Durch diese Eigenschaften ist der d-Loop besonders geeignet für langskalige Untersuchungen. So bietet der d-Loop die Möglichkeit, die Besiedelung eines bestimmten Gebietes nachzuvollziehen und kann auch zur phylogenetischen Rekonstruktion der Geschichte einer Art herangezogen werden. Es lässt sich ein phylogenetischer Baum erstellen, der geographische Bewegungen sichtbar macht und zum Ursprung der maternalen Linie zurückreicht (Galtier et al. 2009). Die variablen Regionen werden typischerweise von hochkonservierten Regionen (z.B. ribosomale DNA) umgrenzt, welche als Primeransatzstelle dienen können (Galtier et al. 2009). Aufgrund der einfachen Struktur und Organisation der mtDNA wurde dieses Genom schon in vielen Organismen sequenziert, zum Beispiel auch in *Salmo salar*. Die mtDNA lässt sich sehr einfach aus einem kleinen Stück Gewebe isolieren und mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifizieren (Harrison 1989), da es in vielfacher Ausführung in der Zelle vorhanden ist. Es existieren schon mehrere Studien über die d-Loop-Variabilität der Bachforelle in Europa (Bernachez 1992, Weiss et al. 2000).

2.8 Mikrosatelliten als molekulare Marker

Für die Ermittlung von Daten zur Populationsstruktur der Seeforelle wurden Mikrosatelliten als molekulare Marker verwendet. Mit der Entwicklung der PCR begriff man in den späten 80er Jahren, dass es sich bei den Mikrosatelliten um nützliche molekulare Marker handelt, mit denen feinskalige ökologische Fragestellungen wie die Populationsstruktur, das Migrationsverhalten oder das Verwandtschaftsverhältnis untersucht werden können (Jarne & Lagoda, 1996). Vor allem für Populationen, die einen genetischen Flaschenhals (bottleneck) erfahren haben, ist diese Analysenart sehr attraktiv (Wright & Bentzen, 1994).

Mikrosatelliten sind kurze, nicht kodierende DNA-Sequenzen mit Wiederholungen von 1-6 Nukleotiden, die in hoher Frequenz im gesamten nukleaeren Genom der meisten Taxa gefunden werden (Selkoe & Toonen, 2006). Man spricht auch von SSR (Simple Sequenz Repeats). Mikrosatelliten bestehen typischerweise aus 5-40 Wiederholungen, wobei auch längere Repetitionseinheiten möglich sein können. Der hohe Polymorphismus wird durch die unterschiedliche Anzahl an Wiederholungen erzeugt, es ergeben sich somit Längenunterschiede. Di-, tri- und tetranukleotid-Wiederholungen gehören zu den häufigsten Mikrosatelliten, die für genetische Untersuchungen verwendet werden. Mikrosatelliten sind von einer DNA-Sequenz, der sogenannten flankierenden Region umgeben, die zwischen Individuen derselben Art hoch konserviert sind (manchmal auch zwischen verschiedenen Arten) (Selkoe & Toonen, 2006) (Abbildung 3).

Allele1 GACTTTATATATATATATATACCTAT Allele2 GACTTTATATATATACCTAT Allele3 GACTTTATATATATATATATATATATATATACCTAT

Abbildung 3: Ein Mikrosatelliten-Locus mit drei unterschiedlichen Allelen, verschiedene Anzahl an Dinukleotid- Wiederholungen (TA)_n

Dadurch kann ein Mikrosatelliten-Locus durch Oligonukleotid-Primer, die spezifisch an die flankierende Region binden, in einer PCR amplifiziert werden. Im Gegensatz zur flankierenden Region mutieren Mikrosatelliten häufig durch Insertionen, Deletionen, Duplikationen oder durch fehlerhaftes Korrekturlesen bei der DNA- Replikation. Die Mutationsrate von Mikrosatelliten bewegt sich von 10⁻⁶ bis 10⁻² pro Generation und ist damit signifikant höher als die Basensubstitutionsrate (Schlötterer 2000). Sie wird unter anderem von der Länge des Mikrosatelliten beeinflusst und steigt mit zunehmender Anzahl von Wiederholungen, längere Sequenzen schaffen mehr Möglichkeiten für Replikatiosablese Fehler (Ellegren 2004). Da es sich bei Mikrosatelliten um nicht kodierende DNA-Sequenzen handelt, ergeben sich für den Organismus keine Fitnessnachteile bei einer Mutation. Durch diese Neutralität gegenüber natürlicher Selektion sollten sich Veränderungen der Mikrosatelliten mit einer relativ konstanten Rate über die Zeit hinweg ändern (Beebee & Rowe 2005).

Ein Vorteil von Mikrosatelliten als genetische Marker liegt darin, dass - wie bei der mtDNA - nur ein kleines Stück Gewebe für die DNA-Isolierung ausreicht. Das zu untersuchende Individuum muss nicht getötet werden. Durch eine PCR kann nach der Probenentnahme der gewünschte Mikrosatelliten-Locus amplifiziert werden (Selkoe & Toonen 2006). Bei der Populations-analyse macht man sich zunutze, dass es bei der Allel Zusammensetzung zweier genetisch getrennter Populationen Frequenzunterschiede gibt. Allele kommen unterschiedlich häufig bei Individuen aus zwei verschiedenen Populationen vor. Zusätzlich kann auch die Anzahl der verschiedenen Allele zwischen den Populationen variieren. Die Allel Zusammensetzung wird an die nächste Generation weitervererbt. Verpaaren sich die Individuen einer Population nur noch untereinander, kommt es zur Anhäufung oder zum Verlust bestimmter Allele. Aus der Anzahl und der Häufigkeit der verschiedenen Mikrosatelliten Allele können Aussagen über den Heterozygositätsgrad von Individuen, über die genetische Variabilität innerhalb von Populationen und über die genetische Differenzierung zwischen Populationen gemacht werden. Fälschlicherweise kann es zu einem Überschuss an Homozygoten kommen, wenn Mutationen in der Primer-Region der Mikrosatelliten auftreten. Dann werden bestimmte Allele nicht amplifiziert (Nullallele) und es kann zu unkorrekten Schlussfolgerungen in der Populationsstruktur kommen.

3 METHODEN

3.1 Probennahme

Für die genetischen Analysen zur Populationsstruktur (Mikrosatelliten Analysen) wurde die genetische Variabilität von 466 Individuen untersucht. Aus dem Laichfischfang wurden hierfür 351 Seeforellen aus den verschiedenen Zuflüssen beprobt. Zusätzlich wurden 32 Seeforellen vom Elternstamm "Seeforellen Goldach-Wildfang" (SGW) aus Romanshorn, 31 Bachforellen vom Elternstamm "Rheintal-Simmi"(SiWi), 22 Bachforellen aus der Nafla "Nafla Wild" (NaWi) und 30 Bachforellen vom Elternstamm "Liechtensteiner Binnenkanal" (LiBi) beprobt (Siehe Tabelle 1). Es wurden 9 Mikrosatellitenloci untersucht. Die SGW Seeforellen stammen ursprünglich aus Nonnenhorn und werden seit 2008 in Romanshorn gehalten. Dieser Gründerstamm wurde jährlich mit Nachkommen von Tieren, die aus Berufsfischerfängen vor der Mündung der Goldach stammen, ergänzt. Bei den hier untersuchten Fischen handelt es sich aber praktisch ausschließlich um Tiere, die den Gründertieren entsprechen (Markus Zellweger, mündl. Mitteilung). Die NaWi Bachforellen sind Wildfische, welche in der Nafla im Zuge der Laichfischerei gefangen und gestreift wurden (Nikolaus Schotzko, mündl. Mitteilung), die LiBi

Bachforellen wurden ursprünglich im Liechtensteiner Binnenkanal FL und dem Äulehag gefangen und werden seitdem gehalten (Roland Jehle, mündl. Mitteilung).

Alle mtDNA Untersuchungen zur Herkunft der Forellen (N=212) wurden an Forellenproben (Seeforellen und Bachforellen) durchgeführt, welche bei Befischungen für vorangehende Untersuchungen gesammelt wurden (Handlos, 2010) (Tabelle 1) Die Forellen für die Untersuchungen wurden in den Jahren 2007-2010 gefangen.

Für die genetischen Analysen wurden Flossenschnitte (Größe ca. 0,5 cm²) entnommen, in Ethanol p.a. konserviert und bei 4°C gelagert.

Zufluss	Fangort (siehe Abbildung4)	Ökotyp	mt- DNA	Misat
Rotach	5	SF	6	28
Rotach	5	BF	16	na
Argen	6 - 10	SF	na	12
Leiblach	11 - 15	SF	na	53
Leiblach	11 - 15	BF	11	na
Bregenzerach	16, 18 - 20	SF	na	66
Bregenzerach (VKW Kanal)	17	SF	na	38
Alpenrhein	21, 23 - 27	SF	na	52
Alpenrhein (Donat Ems)	22	SF	na	32
Alpenrhein (Liecht. Binnenk.)Elternstamm	4	BF	na	30
Alpenrhein (Simmi Wild) Elternstamm	2	BF	na	31
Alpenrhein (Nafla Wild)	3	BF	na	22
Goldach	28, 29	SF	20	39
Goldach	28, 29	BF	23	na
Steinach	30	SF	26	31
Steinach	30	BF	18	na
SGW Romanshorn Elternstamm	1	SF	na	32
Langenargen Elternstamm	-	SF	60	na
Bodensee		SF	32	na

Tabelle 1: Anzahl und Herkunft der Forellen für die genetischen Untersuchungen, SF = Seeforelle, BF = Bachforelle.

Abbildung 4 (folgende Seite): Karte der Bodenseeregion mit den Zuflüssen, aus welchen Seeforellen und Bachforellen untersucht wurden: Rotach, Argen, Leiblach, Bregenzerach, Alpenrhein, Goldach und Steinach. Quelle: Hydra



3.2 Molekulare Methoden

3.2.1 DNA-Extraktion

Die gesamte genomische DNA wurde mit einem modifizierten Salz-Extraktions-Protokoll nach Aljanabi und Martinez (1997) aus einem kleinen Stück (ca. 2 mm²) Flossengewebe isoliert. Nach Verdunsten des Ethanols wurde das Gewebestück in 440 μ l SEB, 90 μ l 10 % SDS und 16 μ l Proteinase K gegeben und kurz gevortext (gemischt). Der Ansatz wurde 2 Std bei 60 °C in einem Eppendorf Schüttler (400 rpm) inkubiert, um das Gewebe zu verdauen und so die DNA freizusetzen. Proteinhaltige Komponenten wurden durch Zugabe von 350 μ l 5 M NaCl und anschließendem Mischen für eine Minute entfernt. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt (30 min, 10300 rpm), um die Proteine und Gewebereste aus dem Ansatz zu entfernen. Dann wurden 600 μ l des Überstandes in ein steriles 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt und 600 μ l eiskaltes Isopropanol zugegeben; daraufhin wurde die DNA bei –20 °C über Nacht ausgefällt. Am folgenden Tag wurde die DNA durch Zentrifugieren (20 min bei 4 °C, 13.000 rpm) pelletiert und der Überstand verworfen. Um Isopropanol-Reste zu entfernen, wurde das Pellet mit 200 μ l

eiskaltem 70 % Ethanol p.a. (70 % v/v) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (10 min bei 4 °C, 13.000 rpm) wurde der Waschschritt wiederholt. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet bei 60 °C für 1-2 Std. getrocknet, bis das ganze Ethanol verdampft war. Schließlich wurde das Pellet teilweise in 100 μl bzw. 30 μl sterilem MilliQ H2O oder 30 μl TE-Puffer resuspendiert und bei -20 °C im Gefrierschrank für den weiteren Gebrauch gelagert.

3.2.2 Quantifizierung der DNA

Die Bestimmung der extrahierten DNA-Menge erfolgte durch Gelelektrophorese, auf 1 - 1,5 % Agarose-Gelen, die aus 1× TAE (Tris-acetate-EDTA) Puffer und 1,5 g Agarose gemacht wurden. Hierzu wurden 3 µl der extrahierten DNA mit 1 µl Ladepuffer auf das Agarose-Gel aufgetragen. Die Färbung der DNA erfolgte durch Ethidiumbromid, das direkt in das Gel gemischt wurde, sodass eine Färbung nach der Gelelektrophorese unnötig war. Zur Auftrennung der DNA ließ man alle Gele horizontal bei 100 V für ungefähr 40 Min laufen. Durch die Färbung mit Ethidiumbromid konnte die Auftrennung der DNA unter ultraviolettem Licht mittels eines Gel-Dokumentations-Systems (Gel iX Imager, INTAS UV-Systeme, Heidelberg, DL) sichtbar gemacht werden. Durch Vergleich der Bandenstärken der Proben mit einem standardisierten Marker (100 bp Leiter, Peqlab) konnte die DNA-Menge der Proben abgeschätzt werden.

3.2.3 PCR-Protokoll zur Amplifikation der mtDNA

Der d-Loop wurde mit den universellen Primern LProF und 12sR5 (Meyer et al., 1994) mit folgendem 20 μl PCR Ansatz amplifiziert: 0,5mM dNTP, 2 x Puffer S, jeweils 1 mM von jedem Primer, wurde jedoch später reduziert auf nur noch 0,25 mM von jedem Primer. Zum Abschluss wurde noch 0,2 U *Taq*-polymerase hinzugefügt. Zu diesem Master-Mix wurden 1 μl DNA-Verdünnung gegeben und mit dem Programm amplifiziert (Tabelle 2).

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale			
Denaturierung	94°C	4 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	52°C	30 sec	x 30
Extension	72°C	90 sec	
Finale Extension	72°C	8 min	

Tabelle 2: PCR Programm zur Amplifikation der mtDNA

Um die Amplifikation und die Qualität zu überprüfen, wurden je 3 μl der PCR-Produkte auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen.

3.2.4 Sequenzieren

Zur Vorbereitung auf das Sequenzieren müssen die amplifizierten DNA Stücke zuerst drei wichtige Arbeitsschritte durchlaufen: Die Aufreinigung, das Cycle Sequencing und die Fällung. Während der Aufreinigung wurde jeweils 5 μl des amplifizierten PCR Produkts mit 1 μl Exonuklease I (Exol) und 1 μl thermosensitive Alkaline Phosphatase (FastAP) versetzt, um es von störenden Zusätzen wie Primer und ungebundene Nukleotide zu befreien. Um eine optimale Enzymaktivität zu gewährleisten, wurden die Proben zuerst 15 Min auf 37 °C erhitzt, anschließend auf 80 °C erhöht, um die Enzyme wieder zu inaktivieren.

Beim Cycle Sequencing wird das Template in separaten Schritten entweder mit dem Forward Primer (LproF) oder dem Reverse Primer (12sr5) in einer Seqenzier-PCR amplifiziert. Dabei wurden 1 µl der aufgereinigten DNA mit jeweils 1,5 µl Big Dye Terminator Reaktion Mix und 0,5 µl des Primers versetzt und mit MiliQ Wasser auf 10 µl aufgefüllt. In dem Reaktion Mix befinden sich normale dNTPs und sogenannte Dideoxy-nucleotidtriphosphyte (ddNTPs), ihnen fehlt die 3'OH Gruppe, die benötigt wird für die Bildung des Phosphodiestherbindung zwischen zwei Nukleotiden. Wird ein ddNTP eingebaut, führt das zur Termination und es resultieren daraus DNA-Fragmente mit unterschiedlicher Länge, alle mit Fluoreszenzmarkierung.

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale			
Denaturierung	94°C	30 sec	
Denaturierung	94°C	10 sec	
Annealing	52°C	20 sec	x 27
Extension	60°C	4 min	

Tabelle 3: PCR-Programm der Sequenzier-PCR

Als letzter Schritt zur Vorbereitung auf das Sequenzieren (Tabelle 3) wurden die DNA-Fragmente unter-schiedlicher Länge noch von allen Substanzen gereinigt, welche zu störenden Hintergrund-signalen führen könnten. Hierzu wurde eine Natrium Acetat Fällung durchgeführt, wobei 1 μ l 3 M NaAc und 25 μ l 100 % Ethanol zu jeder Probe gegeben wurde. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben bei 4°C für 45 Minuten bei 3700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und als weiterer Waschschritt wurde 125 μ l 70 % Ethanol zugegeben. Nach erneutem Zentrifugationsschritt (4 °C, 15 Min, 3700 rpm) wurde der Überstand wieder verworfen und die Proben wurden bei 50 °C im Thermocycler getrocknet, bis alles Ethanol verdampft war. Das getrocknete Pellet wurde in 10 μ l HiDi Formamid gelöst.

Die Sequenzierung des mitochondrialen d-Loops wurde an einem ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt.

3.2.5 Amplifikation der Mikrosatelliten

Es erfolgte eine Genotypisierung durch neun Mikrosatelliten-Loci. Alle neun Mikrosatelliten Loci wurden in zwei Multiplex Ansätzen amplifiziert. Bei der Multiplex-PCR werden mehrere Primer zu dem gleichen PCR-Ansatz gegeben, um gleichzeitig mehrere Loci in einer PCR- Reaktion amplifizieren zu können. Es wurden zwei Mulitplex Ansätze gemacht, welche mit dem PCR Programm wie in Tabelle 4 ersichtlich amplifiziert wurden. Die Ansätze hatten folgende Locus Kombinationen: Multiplex Ansatz 1: Str15, Ssa197, CA050376, Brun14, Brun13, Multiplex Ansatz 2: Str73, CA048828, CA048302, CB515794 (Estoup et al., 1993; O'Reilly et al., 1996; Vasemägi et al., 2005; Heggenes & Roed, 2006).

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale			
Aktivierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	
Annealing	55°C	90 sec	x 35
Extension	72°C	30 sec	
Finale Extension	60°C	30 min	

Tabelle 4: PCR Programm zur Amplifikation der Mikrosatelliten

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem 1,5 % Agarosegel überprüft, als Referenz und zur Größenanalyse dienten 2 μ l von einem 100 bp Marker mit bekannten DNA-Größenfragmenten.

Als Vorbereitung zum Fragmentieren wurden die beiden Multiplex Ansätze für jeden Fisch zusammen in ein well der Platte gepoolt, 1:6 verdünnt und anschließend gefällt, um bei der Detektion störende Salze und Pufferkomponenten zu entfernen. Dabei wurden 2 µl Natrium-Acetat (3 M) und 10 µl ddH₂O zu jeder Probe gegeben und nach kurzem Mischen nochmals 50 µl 100 % Ethanol zugeführt. Anschließend wurde 20 Min bei 3700 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur weiteren Reinigung wurde 100 µl 70 % Ethanol zugegeben und daraufhin nochmals 10 Min bei 3700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschritt nochmals wiederholt. Um die Reste des Ethanols im Pellet zu entfernen, wurden die Proben noch bei 37 °C für 20 Min getrocknet. Nach der Zugabe von je 9,7 µl HiDi Formamid und 0,3 µl GeneScanTM-600LIZ (Size Standard, Applied Biosystems, Warringtion, GB) wurden die Proben abschließend 5 min bei 95 °C denaturiert. Um eine erneute Zusammenlagerung der Einzelstränge zu verhindern, wurden die Proben noch 10 Min auf Eis abgekühlt. Abschließend wurden die Proben im Sequenzierer (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) fragmentiert. Die eingesetzte Menge des Size Standards sowie die Menge des PRC-Produktes

wurden in verschiedenen Testläufen optimiert. Beim Fragmentieren diente ebenfalls ein Polymer in den Kapillaren zur Auftrennung der DNA-Fragmente. Die mit verschiedenen Farbstoffen markierten DNA-Fragmente werden durch einen Laser angeregt und erzeugen ein detektierbares Signal. Der zugegebene Größenstandart mit eigener Fluoreszenzmarkierung ermöglicht eine Größenzuordnung der DNA-Fragmente.

3.2.6 Analyse der mtDNA Sequenzen

Die Qualität der sequenzierten Daten wurde in FINCHTV v1.4 per Auge kontrolliert und eventuelle Sequenzierfehler wurden korrigiert. Anschließend wurde in BIOEDIT v7.0.5.3 mit den Sequenzen ein Alignment erstellt. Dabei wurden die Vorwärts- und Rückwärtssequenzen aneinandergefügt. Es folgte ein Vergleich der Bodensee-Sequenzen aller Forellen untereinander, bei dem 11 verschiedene Haplotypen identifiziert wurden. Die 11 Bodenseehaplotypen wurden mit Sequenzen aus der Genbank Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) verglichen. Hierbei wurden zum Vergleich veröffentlichte, komplette Sequenzen herangezogen (Acession Numbers: DQ841189 - DQ841194 (Meraner et al. 2007), DQ297172, DQ381565-DQ381567 (Susnik et al. 2007), AY836327 – AY836365 (Cortey et al. 2009), AY185568 - AY185579 (Duftner et al. 2003), AF253541 - AF253559 (Suárez et al. 2001), AF273086 - AF273088, AF274574 - AF274580 (Cortey & Garcia, 2002), EF530476-EF530529 (Cortey et al. 2009). Aus allen Datenbanksequenzen wurden die Übereinstimmungen mit den Bodensee-Haplotypen ermittelt. 20 ausgesuchte Sequenzen aus der Datenbank aus verschiedenen Haplotypenlinien wurden verwendet um in MEGA v4.0 einen Maximum Parsimony Bootstrap Consensus Baum zur phylogenetischen Einordnung der Bodensee-Forellen zu erstellen. Die Sequenz Salmo salar wurde als Outgroup verwendet (Acession Number: U12143 (Hurst et al. 1999)).

Bei der Maximum parsimony (MP) tree searching Methode wird das Ergebnis mit der minimalsten Anzahl an evolutionären Veränderungen als wahrscheinlichster Baum angesehen, um die Daten zu repräsentieren. Als wichtigste Voraussetzung hierbei wird angenommen, dass gleiche Merkmale in verschiedenen Taxa durch die Vererbung der Charakteristika eines gemeinsamen Vorfahrens zustande kommen. Ziel hierbei ist es, die Anzahl von Substitutionen zu minimieren, die man für einen phylogenetischen Baum benötigt (Parsimony = minimalste Veränderung). Dabei sind nicht alle Positionen im Alignement gleich nützlich für die

Konstruktion des Baumes. Nicht variable Positionen, oder Substitutionen, die nur einmal vorkommen, werden ignoriert. Informative Positionen, die mindestens zweimal vorkommen werden für die Analyse verwendet. Der Algorithmus arbeitet direkt mit dem Sequenzalignment und bestimmt die kleinste Anzahl an Substitutionen. An jeder informativen Position wird ein möglicher Baum generiert (Hall 2001). Die Anzahl der Substitutionen wird als Punktzahl jedes Baumes angegeben, und der Baum mit der geringsten Punktzahl wird als wahrscheinlichster angenommen, die Daten zu repräsentieren (Holder & Lewis, 2003).

3.2.7 Analyse der Mikrosatelliten-Daten

Die Auswertung der Chromatogramme und die Erfassung der Fragmentgrößen erfolgte mit der Software GeneMapper v.3.7. (Applied Biosystems). Die Qualität des Datensatzes wurde mit dem Programm MicroChecker v.2.2.3. (Oosterhout et al. 2004) überprüft. Ein eventuell mögliches Auftreten von Nullallelen wurde ausgeschlossen. Aufgrund einer Mutation in der Primerbindungsregion werden Null-Allele häufig nicht amplifiziert und dadurch wird ein Individuum fälschlicherweise als homozygot kategorisiert (Selkoe & Toonen, 2006). Außerdem kann das Programm falsch detektierte Allele identifizieren, die durch Stutterpeaks entstehen können. Der Datensatz wird ebenfalls auf "large allele dropout" getestet, wobei nur Allele mit geringer Fragmentgröße detektiert werden, weil die größeren Allele nicht mehr amplifiziert werden. Fälschlicherweise kommt es dann zu einem Überschuss an Homozygoten Individuen und damit zu einer Abweichung vom HWE. Eventuell auftretende Stutterpeaks und das Phänomen des "lage allele dropout" wurden im vorliegenden Datensatz nicht entdeckt.

Die wichtigsten Faktoren der deskriptiven Statistik, erwartete Heterozygosität (HE) und beobachtete Heterozygosität (HO), wurden in ALEQUIN v3.11 (Excoffier et al. 2005) berechnet. Außerdem wurden die Abweichungen vom Hardy- Weinberg- Equilibrium innerhalb der einzelnen Standorte und in der Gesamtpopulation bestimmt.

Beim Hardy-Weinberg-Gleichgewicht geht man von einer idealen Population aus, in der keine Evolution stattfindet, keine Selektion den Genpool verändern kann und wobei Gendrift die Struktur der Population nicht verändert. Außerdem wird angenommen, dass alle Verpaarungen von Individuen mit unterschiedlichen Genotypen gleich wahrscheinlich und erfolgreich sind. In der idealen Population findet zudem keine Mutation statt und Migration als treibende Kraft für

Allelfrequenzunterschiede ist ausgeschlossen (Beebee und Rowe, 2005). Die Allelfrequenz und die Genotypfrequenz eines Genpools bleiben deshalb von Generation zu Generation konstant, da weder Auslese noch Inzucht wirksam sind.

Als Analyse der genetischen Variabilität zwischen den Standorten wurden zusätzlich F_{ST}-Werte in ARLEQUIN v3.11 berechnet, die auf Unterschieden in den Allelfrequenzen basieren. Die F-Statistik wurde 1951 von Sewall Wright entwickelt um Populationsstrukturen zu analysieren (Avise, 2004). Es wurden unterschiedliche fixation indices eingeführt, die Abweichungen vom Hardy-Weinberg Equilibrium auf drei verschiedenen Ebenen beschreiben:

Zur Analyse der Populationsstruktur wird vor allem der F_{ST} - Wert herangezogen, dieser ist definiert als:

$F_{ST} = (ht-hs)/ht$

hs: mittlere, erwartete Heterozygosität eines Locus über alle Teilpopulationen

ht: erwartete Heterozygosität der gesamten Population.

Fst- Werte befinden sich in dem Bereich von 0,0 (Subpopulationen sind genetisch identisch) bis 1,0 (Subpopulationen sind komplett getrennt, und für unterschiedliche Allele fixiert) (Beebee und Rowe, 2005).

Das Programm STRUCTURE v2.1 diente zur Abschätzung der Populationsstruktur. Die Struktur wird ermittelt aus genotypisierten multi-Locus Daten, indem eine Anzahl an Populationen oder Genotypclustern (K) im Voraus angenommen wird. Jede Population ist charakterisiert durch ein Set von Allelfrequenzen an jedem Locus, welches den spezifischen Genotyp dieser Population darstellt. Individuen werden nun aufgrund ihres Genotyps einer Population zugeordnet (oder mehreren Populationen, wenn der Genotyp eine Mischung andeutet). Die Gruppierung zu einer Population wird so vorgenommen, dass sich innerhalb einer Population die Loci im HWE befinden (Pritchard et al. 2000). Zum Schluss wird für jedes K eine a-priori-Wahrscheinlichkeit (posterior Probability (InP(D)) berechnet, welche die Übereinstimmung der Daten mit dem angenommenen K angibt (Prichard et al. 2000). Für die Berechnungen wurde das "admixture model" ohne vorherige Populationsinformation verwendet, wobei keine Korrelation der einzelnen Loci untereinander angenommen wurde. Damit wurde berücksichtigt, dass die Individuen eventuell genetisch verschiedene Vorfahren gehabt haben könnten, das bedeutet:

Ein Individuum kann einen Teil des Genoms von einem Vorfahren aus einer Population erhalten haben. Der Output gibt den Anteil des Individuums an der Population an. Um die wahrscheinlichste Anzahl der cluster K zu bestimmen, wurde STRUCTURE angewiesen, eine Serie von clustern K (1-10) für alle Seeforellen und K (1-5) für die Seeforellen und Bachforellen aus dem Alpenrhein zu testen. Für die Berechnung wurden 50 000 burn-ins und 100 000 Schritte vorgegeben. Für jedes K wurden fünf unabhängige Durchgänge berechnet, um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Der höchste LnP(D) Wert gibt allerdings nicht notwendigerweise auch die wahrscheinlichste Anzahl an Populationen K an, deshalb wurde K nach der Methode von Evanno et al. (2005) bestimmt. Diese Methode sucht nach einem Maximum des Anstiegs innerhalb der LnP(D) Verteilung (Delta K) bei den verschiedenen Durchläufen.

4 ERGEBNISSE

4.1 mtDNA- Analyse

4.1.1 Einordnung der Haplotypen nach geographischen Gesichtspunkten

Von 212 Forellen wurde jeweils ein 990 bp großes Stück am 5'-Ende des mitochondrialen d-Loops sequenziert. Die sequenzierten Bereiche wurden anschließend aligned und mit Sequenzen aus der Datenbank verglichen. Dabei wurden 11 verschiedene Haplotypen im Bodensee identifiziert, wobei 3 Haplotypen (HT6, HT7 und HT9) noch nicht in der Genbank Datenbank zu finden waren. Die Seguenzen der anderen 7 Haplotypen waren identisch zu bereits veröffentlichten Sequenzen. Zur Einordnung der Haplotypen nach geographischen Gesichtspunkten wurde aus den 11 Haplotypen des Bodensees zusammen mit 20 ausgewählten Sequenzen aus verschiedenen europäischen Haplotypenlinien aus der Genbank Datenbank ein Maximum Parsimony Bootstrap Consensus-Baum (MP-Baum) in MEGA v4.0 mit 500 Bootstrap Wiederholungen erstellt (Abbildung 5). Als Outgroup diente die Sequenz von Salmo salar aus der Datenbank. Der Großteil der Bodenseehaplotypen gruppierte sich zur Atlantischen Linie. Dabei gab es drei Ausnahmen: HT2 und HT3 wurden der Danubischen Linie zugeordnet und HT4 fand sich in der Marmomatus-Linie wieder. Der MP-Baum zeigt, dass sich die verschiedenen Haplotypenlinien sehr gut voneinander trennen: Adriatische Linie mit Bootstrap Support 83, Marmoratus-Linie mit 89, die Mediterrane Linie mit 98, die Danubische Linie mit 97 und die Atlantische Linie mit Bootstrap Support 50. Eine Besonderheit stellt außerdem die endemische Duero-Linie auf der Iberischen Halbinsel dar, die mit Bootstrap Support 77 vom restlichen Atlantischen Cluster getrennt ist, im Bodensee jedoch nicht vorkommt. Innerhalb der Atlantischen Gruppe spalten sich die Südatlantischen Haplotypen als eigene Untergruppe ab (SA4, SA5, ATcs24, ATcs35 (Suárez et al., 2001; Cortey et al., 2009)). Die restlichen Atlantischen Haplotypen unterscheiden sich meist nur in einer Nukleotidposition, wobei keine weitere Untergruppierung feststellbar ist.



Abbildung 5: Maximum Parsimony Bootstrap Consensus-Baum von 11 Bodensee-Haplotypen und 20 ausgesuchten Sequenzen aus der Datenbank; Zahlen auf Ästen: Bootstrap support aus 500 Replikaten, gezeigt wenn >50%; Maßstabsbalken: Anzahl der Substitutionen (average pathway method); Bodenseehaplotypen: HT1-HT11 durch Umrandung hervorgehoben Haplotypenhauptgruppen: Atlantisch (AT), Mediterran (ME), Adriatisch (AD), Danubisch (DA), Marmoratus (MA), Duero (DU); Outgroup: *Salmo salar*

Die drei Bodensee-Haplotypen HT8, HT10 und HT11 sind identisch mit Seguenzen von Forellen, die in Dänemark und Norwegen heimisch sind, jedoch in Spanien in Hatchery-Stocks gezüchtet werden (Carballedo Una) und sich deshalb vor allem in besetzten Gewässern wiederfinden (haplotyp2, haplotyp4, haploty3 (Cortey & Garcia 2002)). Die Haplotypen HT1, HT3, HT4 und HT5 entsprechen Sequenzen aus Tirol, Südtirol und Norditalien (At1e, Da1b, Ma2b, At1f (Meraner et al. 2007)). HT6, HT7 und HT9 gruppieren sich ebenfalls zum atlantischen Stamm, es finden sich aber keine entsprechenden Sequenzen in der Literatur zum Vergleich und zur geographischen Einordnung. Beim Vergleich der 11 Bodensee-Haplotypen fanden sich 16 variable Nukleotidpositionen (Tabelle 5). Die Zusammengehörigkeit der Atlantischen Haplotypen wird durch ein gemeinsames Motiv bei 249-251bp erkennbar. Der HT6 unterscheidet sich hier von allen anderen Atlantischen Haplotypen und ähnelt sehr stark dem Motiv der Danubischen Linie. Abgesehen von dem Motiv bei 249-251bp weist der HT6 in seiner restlichen Seguenz jedoch keine weiteren Gemeinsamkeiten zur Danubischen Linie auf, weshalb er auch weiterhin als Atlantischer Typ bezeichnet wird. Außerdem fallen noch zwei weitere Sequenzen heraus: HT2 und HT3, welche aufgrund der variablen Stelle bei 249-251 bp und den restlichen abweichenden Nukleotidpositionen der Danubischen Linie zugeordnet werden. HT4 weist ebenfalls an zahlreichen Stellen Abweichungen zum Nukleotidmuster des Atlantischen Clusters auf und wird der Marmoratus Linie zugeordnet.

Tabelle 5:	Sequ	Jenzunte	ersch	niede	der	mtDNA	von	Forellen	aus	dem	Bodensee	und	seinen
Zuflüssen;	HT1	wurde	als	Refer	renzs	equenz	verw	endet; /	Atlant	ische	Haplotype	n sin	d blau
hervorgeho	ben;	ein Pun	kt m	arkier	t ein	e Überei	nstim	mung de	er Seq	uenz z	ur Referenz	z	

Nucleotidposition[bp]	42	129	162	250	278	405	419	442	546	558	564	698	850	920	927	956
HT1	т	-	G	GAT	GC	СТ	Т	Т	Т	GG	С	Т	С	А	С	А
HT2	А		А	GAG		тс			С	AC	Т	С		G		С
HT3	А			GAG		тс			С	AC	Т	С		G		С
HT4	С	А			AT	тс	С		С			С	Т	G		С
HT5									С			С				С
HT6				AGG								С				С
HT7								А				С				
HT8												С				
НТ9												С			А	
HT10												С			А	
HT11												С				С

Durch ein Haplotypennetzwerk der Bodensee-Haplotypen wird die phylogenetische Beziehung der Sequenzen untereinander deutlich (Abbildung 6). Für einen besseren Überblick über das Verteilungsmuster der Haplotypen an den Standorten wurde der relative Anteil des Standorts an einem Haplotypen ebenfalls im Netzwerk dargestellt. Die zentrale Position nimmt der HT8 ein (67 Seeforellen, 10 Bachforellen), der vor allem bei den Forellen aus der Elterntierhaltung LA einen sehr großen Anteil ausmacht, aber auch bei den Bodensee Seeforellen stark vertreten ist. Wie bereits erwähnt handelt es sich dabei um eine Sequenz, die sehr oft in Zuchtstämmen zu finden ist. Um den HT8 herum gruppieren sich die anderen Atlantischen Haplotypen HT1, HT7, HT10, HT9 und HT 11. HT1 und HT7 kommen jeweils nur einmal vor. Bis auf Leiblach und LA Elterntiere ist der HT10 (9 Seeforellen, 9 Bachforellen) an allen anderen Zuflüssen vertreten, während der HT9 (2 Seeforellen, 4 Bachforellen) nur in Goldach und Steinach vorkommt. Der HT11 (21 Seeforellen, 3 Bachforellen) zeigt ebenfalls einen großen Anteil bei den LA Elterntieren, ist jedoch nicht in der Steinach und der Leiblach vertreten. Am zweithäufigsten ist der HT6 vorhanden (41 Seeforellen, 18 Bachforellen), welcher den größten Anteil der Fische in Goldach und Steinach ausmacht. Er kommt jedoch auch im See, beim LA Elternstamm und der Leiblach vor, war aber nicht in der Rotach zu finden. Dieser Haplotyp ist deutlich von den anderen getrennt und drei bis vier Mutationen entfernt von allen anderen Bodenseesequenzen. An allen Zuflüssen anzutreffen ist HT5 (15 Seeforellen, 9 Bachforellen), der als Bindeglied zwischen den Atlantischen Sequenzen des Bodensees und den anderen vorkommenden Linien fungiert. HT3 und HT2 gruppieren als Donautypen zusammen und sind ebenso wie HT4, der Marmoratus Linie zugehörend, deutlich durch 9 bzw. 10 Mutationsschritte von den Atlantischen Sequenzen abgegrenzt (Abbildung6 A). Jedoch machen sie, mit jeweils nur einer Seeforelle, einen sehr geringen Anteil der Haplotypen im Bodensee aus. Die Verteilung der Haplotypen ändert sich nicht maßgeblich bei getrennter Betrachtung der Ökotypen, bei den Seeforellen fehlt lediglich der HT1 (Abbildung 6 B). Alle Atlantischen Haplotypen kommen ebenso auch bei Bachforellen aus den drei Standorten Goldach, Steinach und Rotach vor, nur die Donau- und Marmoratus- Linie ist hier nicht vertreten, ebenso fehlt der HT7 (Abbildung6 C).



Abbildung 6: Haplotypnetzwerke der Bodensee-Haplotypen erstellt in TCS v1.2.1; A) Alle Fische, B) Seeforellen, C) Bachforellen; Größe der Kreise spiegelt Anzahl der Fische mit diesem Haplotyp wider (Skala; N= Anzahl Forellen); Verbindungslinie zwischen Kreisen gibt jeweils einen Nukleotidunterschied an; innerhalb der Kreise: relatives Verhältnis der Standorte pro Haplotyp

4.2 Analyse der Populationsstruktur

4.2.1 Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE)

Bei Berechnung der Heterozygositäten für alle Forellen aus allen Zuflüssen und Elterntierhaltungen gemeinsam betrachtet, ergaben sich für alle Loci bis auf Str 37 und Str 15 signifikante Abweichungen vom HWE (Signifikanzniveau von 0,05, Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis deutet bereits auf eine weitere Unterstrukturierung der Forellen hin.

Dahingegen waren bei Betrachtung der Heterozygositäten der Forellen aus den einzelnen Zuflüssen und Elterntierhaltungen getrennt nur noch wenige Loci (1 bis max. 3) nicht im Hardy Weinberg Gleichgewicht (Tabelle 6). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass diese Populationen aus zufälligen Verpaarungen einer großen lokalen Population stammen und es keine Anzeichen auf eine weitere Unterstrukturierung oder Inzucht gibt. Bei den Forellen der Elterntierhaltung Romanshorn allerdings waren bis auf zwei alle Loci nicht im HWE. Das könnte auf eine weitere Unterstruktur der Population hindeuten oder aber auf eine schmale genetische Basis der Gründertiere aufgrund weniger Anfangspaarungen zurückzuführen sein.

Tabelle 6: Genetische Variabilität der untersuchten Forellen (Na=Allelanzahl, HO=beobachtete, HE=erwartete Heterozygositäten, HWE p-val=Abweichung vom Hardy Weinberg Gleichgewicht (Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05), signifikante Werte hervorgehoben.

Herkunft	Genet Var.	Str73	Str15	CA048828	Ssa197	CA048302	CA050376	Brun14	Brun13	CB515794
Rot SF	Na	5	6	16	11	10	7	6	15	10
	но	0,57143	0,64286	0,82143	0,75	0,89286	0,82143	0,67857	0,71429	0,53571
	HE	0,55779	0,68896	0,92208	0,83961	0,76429	0,81039	0,76494	0,83766	0,68961
	HWE p-val	0,43114	0,44286	0,10356	0,63967	0,59886	0,25966	0,20857	<mark>0,00988</mark>	0,16657
Arg SF	Na	4	4	11	6	9	5	4	8	8
	но	0,75000	0,75000	0,75000	0,66667	0,75000	0,58333	0,66667	0,66667	1,00000
	HE	0,75000	0,73551	0,92754	0,84058	0,87319	0,77899	0,71377	0,69928	0,82971
	HWE p-val	0,66411	0,61243	0,16935	0,25398	0,13796	<mark>0,01700</mark>	1,00000	0,90181	0,38322
Lei SF	Na	5	8	13	10	9	9	7	17	12
	но	0,67925	0,73585	0,82692	0,62264	0,79245	0,79245	0,84906	0,71698	0,73585
	HE	0,68338	0,7867	0,90422	0,82642	0,81384	0,75274	0,75472	0,83899	0,82156
	HWE p-val	0,38993	0,81806	<mark>0,03142</mark>	0,00013	0,53026	0,18581	0,14399	0,15213	0,40721
Bra SF	Na	4	9	20	12	12	8	7	19	12
	НО	0,72727	0,78788	0,93939	0,68182	0,74242	0,64615	0,74242	0,72727	0,83333
	HE	0,62584	0,75607	0,92632	0,75839	0,81911	0,7715	0,72427	0,85716	0,82258
	HWE p-val	0,27363	0,25321	0,28375	0,09187	0,09951	0,06102	0,29628	0,00322	0,51455
Bra SF	Na	5	7	16	9	10	7	7	15	13
VKW Kanal	НО	0.73684	0.63158	0.89474	0.68421	0.92105	0.63158	0.65789	0.78947	0.78947
	HE	0.65684	0.73684	0.91965	0.81018	0.81228	0.77684	0.77404	0.83263	0.82281
	HWE p-val	0.75685	0.12729	0.31814	0.00886	0.21961	0.15432	0.1783	0.19395	0.23744
Al Rh SF	Na	4	8	19	15	11	8	5	15	12
	НО	0.69231	0.73077	0.90385	0.84615	0.88462	0.70588	0.63462	0.78846	0.78846
	HE	0.60474	0.76512	0.91841	0.84242	0.83645	0.80877	0.76400	0.83570	0.79798
	HWF n-val	0 16245	0.09694	0 14755	0 37685	0 27887	<0.00001	0.03689	0 24224	0 32838
Alpenrhein	Na	4	6	18	8	11	6	5	9	8
SE D Ems	но	0 53125	0 75000	0 96875	0 81250	0 71875	0 71875	0 56250	0 75000	0 78125
SI D LIIIS	HE	0,55125	0,73000	0,50075	0,01230	0,71075	0,71075	0,30230	0,73000	0,78125
	HWE n-val	0,57055	0,72007	< <u>0,02411</u>	0,70425	0,77551	0,70071	0,72317	0,04732	0,05163
Li Bi	Na	5	5	Q	10	0,03534 Q	6	6	13	0,03105
BE Eltern	НО	0 62069	0 66667	0 86207	0 93333	0 89655	0 76667	0 73333	0.86667	0 82759
DI LILEITI	HE	0,02005	0,00007	0,80207	0,55555	0,83033	0,70565	0,75555	0,80007	0,82755
	HWE p-val	0,04545	0,70700	0,00001	0,61075	0,03707	0,70505	0,70308	0,03432	0,00044
Si Wi	No	0,14011 A	5	12	8	6	8	7	13	7
BE Eltorn		4	0 02071	0 00222	0 7/10/	0 70068	0 02071	7 0 80645	13	/ 0.92971
Di Literii	не	0,70500	0,03071	0,00020	0,74134	0,70500	0,03071	0,00045	0,54055	0,03071
		0,30170	0,70075	0,67170	0,75270	0,72501	0,78555	0,75500		0,70750
		0,05196	0,05956	16	10	6	6	0,52010	10	0,10425
Nd WI		4 0.6100E	4	10	10	0	0 57142	4	10	9
BF Eileni		0,01905	0,08182	0,80952	0,70190	0,72727	0,57145	0,50000	0,03030	0,80952
		1 00000	0,75044	0,92507	0,60159	0,70110	0,05102	0,50025	0,00047	0,78105
CalSE		1,00000	0,78015	0,20910	0,00102	0,90778	0,40840	0,51399	0,05808	0,22057
GUISF	INd	Э 0.00744	D 0 74250	10	11	9	0	4	0	/
	HU	0,89744	0,74359	0,79487	0,82051	0,84015	0,04103	0,78947	0,01538	0,71795
		0,72028	0,08831	0,89843	0,84382	0,82251	0,09331	0,00912	0,04230	0,73094
CL - CE	HWE p-vai	0,00597	0,03347	0,05258	0,11234	0,67473	0,01762	0,33950	0,15799	0,18662
Ste SF	ina Lio	4	0	14	D 0.01202	10	5	5	ð 0.45461	/
	HU	0,/3333	0,67742	0,90000	0,61290	0,838/1	0,77419	0,838/1	0,45161	U,/666/
	HE	0,68757	0,68377	0,89831	0,81861	0,79059	0,75568	0,74828	0,56901	0,73785
	HWE p-val	0,09169	0,95703	0,53185	0,03216	0,45247	0,49701	0,78321	0,00497	0,513/3
SGW Rom	Na	3	5	14	5	9	6 0.000000	6 0.00555	10	8
SF Eltern	но	0,65625	0,63333	0,93548	0,90323	0,87500	0,93333	0,90625	0,78125	0,59375
	HL	0,51736	0,77232	0,87573	0,74881	0,69147	0,73446	0,79762	0,85119	0,63591
	HWE p-val	0,14947	0,00005	0,09639	<mark><0,00001</mark>	<mark><0,00001</mark>	0,03023	<mark><0,00001</mark>	<mark>0,00084</mark>	0,00014

4.2.2 FST-Werte

Ein Vergleich der paarweisen F_{ST}-Werte zwischen allen untersuchten Seeforellen zeigt fast überall signifikante Unterschiede (Tabelle 7). Übereinstimmungen zwischen Seeforellen aus verschiedenen Zuflüssen wurden nur zwischen Seeforellen aus der Argen mit Seeforellen aus allen anderen Zuflüssen, außer denen aus der Bregenzerach und den Elterntieren aus Romanshorn gefunden. Hier ist allerdings von einem Artefakt aufgrund der sehr geringen Stichprobengröße der Seeforellen aus der Argen (nur 12 Tiere siehe Tabelle 1) auszugehen, eine größere Stichprobenzahl aus der Argen sollte untersucht werden, um verlässliche Daten für die Populationsstruktur zu bekommen. Weitere Übereinstimmungen zwischen Seeforellen aus verschiedenen Zuflüssen wurden nur noch für die Seeforellen aus der Bregenzerach (beide Fangorte) mit den Seeforellen aus der Leiblach gefunden. Die Stichprobengröße aus der Bregenzerach (38 Tieren aus VKW Kanal und 66 weitere von Hydra gefangene) und der Leiblach mit 53 Tieren (Tabelle 1) ist groß genug um verlässliche Aussagen zu bekommen. Somit kann festgestellt werden, dass alle Seeforellen aus der Bregenzerach zu einer Population gehören, welche nicht weiter strukturiert ist und sich genetisch auch nicht von den Seeforellen der Leiblach unterscheiden lassen. Alle anderen Seeforellen in allen Zuflüssen gehören unterschiedlichen genetischen Linien an.

Vergleicht man die Seeforellen des Alpenrheins mit den Bachforellen aus den Alpenrhein-Zuflüssen Liechtensteiner Binnenkanal, Simmi und Nafla, miteinander so findet man überall signifikante Unterschiede (Tabelle 8). **Tabelle 7:** Paarweiser Vergleich der 9 Mikrosatelliten-Loci für alle Seeforellen aus den untersuchten Zuflüssen und der Elterntierhaltung Romanshorn Distance method: P< 0,05, 10000 Permutationen; berechnet in ARLEQUIN. Paarweise FST-Werte unter der Diagonalen, hervorgehoben sind signifikante Unterschiede nach Bonferroni Korrektur. P-values über der Diagonalen.

	Rot SF	Arg SF	Lei SF	Bra SF	Bra SF VKW Kanal	Al Rh SF	Al Rh SF DEms	Gol SF	Ste SF	SGW Rom Eltern
Rot SF	-	0,00079	<0,00001	0,0005	0,00168	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001
Arg SF	<mark>0,03213</mark>	-	0,07286	0,00109	0,07999	0,00238	0,06613	0,00822	0,13325	0,0001
Lei SF	<mark>0,01838</mark>	0,01115	-	<0,00001	0,01663	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,0001	<0,00001
Bra SF	<mark>0,01268</mark>	<mark>0,02294</mark>	<mark>0,01883</mark>	-	0,00604	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001
Bra SF VKW Kanal	<mark>0,01661</mark>	0,01229	0,00777	0,00825	-	<0,00001	0,0003	<0,00001	<0,00001	<0,00001
AI Rh SF	<mark>0,01616</mark>	0,02193	<mark>0,01819</mark>	<mark>0,01240</mark>	<mark>0,01624</mark>	-	0,0003	<0,00001	<0,00001	<0,00001
AI Rh SF DEms	<mark>0,02759</mark>	0,01306	<mark>0,03130</mark>	<mark>0,02879</mark>	<mark>0,02062</mark>	<mark>0,01515</mark>	-	<0,00001	0,00347	<0,00001
Gol SF	<mark>0,04944</mark>	0,01924	<mark>0,01769</mark>	<mark>0,04842</mark>	<mark>0,03756</mark>	<mark>0,03231</mark>	<mark>0,03582</mark>	-	<0,00001	<0,00001
Ste SF	<mark>0,02996</mark>	0,00881	<mark>0,01682</mark>	<mark>0,02893</mark>	<mark>0,01838</mark>	<mark>0,02798</mark>	<mark>0,01462</mark>	<mark>0,01858</mark>	-	<0,00001
SGW Rom Eltern	<mark>0,03453</mark>	<mark>0,05631</mark>	<mark>0,02500</mark>	<mark>0,04251</mark>	<mark>0,02695</mark>	<mark>0,04426</mark>	<mark>0,05735</mark>	<mark>0,06819</mark>	<mark>0,04997</mark>	-

Tabelle 8: Paarweiser Vergleich der 9 Mikrosatelliten-Loci für Seeforellen aus dem Alpenrhein und Bachforellen aus den Zuflüssen Liechtensteiner Binnenkanal, Simmi und Nafla. Distance method: P< 0,05, 10000 Permutationen; berechnet in ARLEQUIN. Paarweise FST-Werte unter der Diagonalen, hervorgehoben sind signifikante Unterschiede nach Bonferroni Korrektur. P-values über der Diagonalen.

	Al Rh SF	Al Rh SF DEms	Li Bi	Si Wi	Na Wi
AI Rh SF	-	0,0001	<0,00001	<0,00001	<0,00001
AI Rh SF DEms	<mark>0.01515</mark>	-	<0,00001	<0,00001	<0,00001
Li Bi	<mark>0.05123</mark>	<mark>0.09117</mark>	-	<0,00001	<0,00001
Si Wi	<mark>0.03564</mark>	<mark>0.04641</mark>	<mark>0.06112</mark>	-	<0,00001
Na Wi	<mark>0.03502</mark>	<mark>0.06787</mark>	<mark>0.06619</mark>	<mark>0.05577</mark>	-

4.2.3 Analyse mit STRUCTURE

Die Analyse der Mikrosatelliten-Daten aller Seeforellen mit dem Programm STRUCTURE zeigte den höchsten LnP(D) – Wert bei einem K = 10 an (LnP(D) = -12480,2). Allerdings waren bei etlichen anderen LnP(D) ähnlich hohe Werte zu finden. Die Ermittlung der wahrscheinlichsten Anzahl an Genotypclustern K nach der Methode von Evanno et al. (2005) ergab die wahrscheinlichste Anzahl von K = 2 Clustern (Tabelle 9). Bei dieser Einteilung werden allerdings nur die Seeforellen der Deutsch/Österreichischen Seite (Rotach, Leiblach, Bregenzerach und Alpenrhein) gegen die Schweizer Seite (Goldach und Steinach) und die Romanshorn Elternfische abgetrennt. Bei näherer Betrachtung der Evanno-Tabelle (Tabelle 9) fällt allerdings auf, dass die Delta K-Werte für ein K=6 auch eine Erhöhung der Delta K Verteilung zeigen. Hier werden die Forellenpopulationen wesentlich besser gegeneinander abgetrennt dargestellt (Abbildung 8).

К	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	5	-13070,240	0,219100	NA	NA	NA
2	5	-12980,740	6,132100	89,50000	132,09000	21,54064
3	4	-12759,150	28,775600	221,59000	228,76000	7,94978
4	5	-12766,320	62,197900	-7,17000	32,77000	0,52687
5	5	-12806,260	154,582000	-39,94000	109,04000	0,70538
6	5	-12737,160	83,604900	69,10000	222,22000	2,65798
7	5	-12890,280	166,738000	-153,12000	130,60000	0,78327
8	5	-12912,800	199,176000	-22,52000	184,78000	0,92772
9	5	-12750,540	329,108000	162,26000	108,08000	0,32840
10	5	-12480,200	52,702400	270,34000	NA	NA

Tabelle 9: Evanno-Tabelle zur Ermittlung der wahrscheinlichsten Cluster K für alle Seeforellen

Auch wenn die Ermittlung der Anzahl der Cluster K nicht ganz eindeutig verlief, ist auf jeden Fall festzuhalten, dass eine Populationsstruktur gefunden wurde. In den Structure bar plots ist diese Struktur deutlich zu erkennen und die unterschiedlichen Genotypen ordneten sich grob den verschiedenen Zuflüssen bzw. der Elterntierhaltung Romanshorn zu (Abbildung8).



Abbildung 8: Structure bar plot zur Veranschaulichung der Populationsstruktur der Seeforellen für K = 6 angenommene Genotypcluster oder Populationen, symbolisiert durch 6 unterschiedliche Farben. Die senkrechten farbigen Balken symbolisieren die einzelnen Individuen, welche nach ihrer Herkunft gruppiert wurden (siehe x-Achse). Die unterschiedlichen Farbsegmente innerhalb der Balken stellen die Zugehörigkeit in Form von a-posteriori-Wahrscheinlichkeiten (posterior probabilities) zum jeweiligen Genotypcluster dar.

Beim Vergleich der Seeforellen des Alpenrhein mit den Bachforellen LiBi, SiWi und NaWi war der höchste LnP(D) – Wert bei einem K = 4 an (LnP(D) = -5449,28). Nach der Evanno Methode wurde die höchste Wahrscheinlichkeit der Anzahl Cluster K für ein K = 2 angegeben. Dies trennt sehr gut die Seeforellen gegen die Bachforellen ab. Doch auch in der Evanno-Tabelle findet sich eine zweite deutliche Erhögung der Delta K-Werte für ein K = 4. Dies trennt gut die Seeforellen gegen die Forellen aus den Elterntierhaltungen ab (Abbildung 9).

К	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	5	-5808,56	0,4393	NA	NA	NA
2	5	-5649,54	2,5948	159,02	95 <i>,</i> 76	36,9045
3	5	-5586,28	23,7809	63,26	73,74	3,1008
4	5	-5449,28	15,7562	137,00	213,26	13,5350
5	5	-5525,54	30,3236	-76,26	NA	NA

Tabelle 10: Evanno-Tabelle zur Ermittlung der wahrscheinlichsten Cluster K für Seeforellen aus dem Alpenrhein und Bachforellen LiBi, SiWi und NaWi.

Zur Übersicht werden beide Structure bar plots für ein K = 2 und ein K = 4 dargestellt (Abbildung 9). Man erkennt gut, dass sich die Seeforellen aus den beiden Befischungen im Alpenrhein sehr ähnlich sind, sich aber sehr deutlich von den Bachforellen unterscheiden. Die Bachforellen aus den dem Liechtensteiner Binnenkanal, der Simmi und der Nafla unterscheiden sich allerdings

auch sehr deutlich voneinander in ihrer genetischen Struktur während die Forellen innerhalb einer Gruppe ein sehr einheitliches genetisches Profil aufweisen.



Abbildung 9: Structure bar plots zur Veranschaulichung der Populationsstruktur der Seeforellen aus dem Alpenrhein und den Bachforellen LiBi, SiWi und NaWi. Obere Abbildung für K = 2, untere für K = 4 angenommene Genotypcluster oder Populationen, symbolisiert durch 2 bzw. 4 unterschiedliche Farben. Die senkrechten farbigen Balken symbolisieren die einzelnen Individuen, welche nach ihrer Herkunft gruppiert wurden (siehe x-Achse). Die unterschiedlichen Farbsegmente innerhalb der Balken stellen die Zugehörigkeit in Form von a-posteriori-Wahrscheinlichkeiten (posterior probabilities) zum jeweiligen Genotyp-cluster dar (2 mögliche oben, 4 unten). Gleiche Farben in den beiden verschiedenen Plots symbolisieren nicht den gleichen Genotypcluster.

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Ziel dieser Studie war es, die Besiedlungsgeschichte der Seeforelle im Bodensee zu untersuchen und festzustellen, ob sich die Forellenpopulationen, die in die verschiedenen Zuflüsse aufsteigen genetisch voneinander unterscheiden lassen. Im Folgenden soll auf diese Fragestellungen im Einzelnen eingegangen werden.

5.1 Genetische Differenzierung der Forellen zwischen verschiedenen Zuflüssen (Mikrosatelliten Analysen)

Einen ersten Hinweis auf eine eventuelle Strukturierung der Seeforellenpopulation des Bodensees in Laichpopulationen, welche in verschiedene Zuflüsse aufsteigen, geben die Abweichungen vom Hardy Weinberg Gleichgewicht (HWE). Bei der gemeinsamen Betrachtung aller Forellen, sind 7 von 9 Loci signifikant abweichend vom HWE. Dieses Ergebnis lässt bereits eine Strukturierung der Gesamtpopulation erwarten. Berechnet man dagegen die Abweichung vom HWE für die Forellen der einzelnen Zuflüsse getrennt, sind nur noch einzelne Loci abweichend vom HWE (Tabelle 6).

Homing-Verhalten zu spezifischen Laichhabitaten ist ein häufiges Phänomen bei Forellen, das zur Aufspaltung von Populationen führen kann (Ferguson und Taggart, 1991; Knutsen et al. 2001). Um eine eventuelle Aufspaltung der Bodenseeforellen in Laichpopulationen der verschiedenen Zuflüsse näher zu untersuchen, wurden Analysen mit Arlequin und Structure durchgeführt. Bei der Betrachtung aller Seeforellen im Untersuchungsgebiet deuten die paarweisen F_{ST}-Werte der Mikrosatelliten (berechnet mit Arlequin) eine starke Differenzierung der Forellenpopulation an, die meisten Zuflüsse unterschieden sich signifikant voneinander in ihrer genetischen Zusammensetzung (Tabelle 7). Dieses Ergebnis deutet stark auf ein Homing-Verhalten der Seeforellen zu den jeweiligen Zuflüssen hin, was eine Rückkehr zum Geburtsgewässer nahelegt. Das bedeutet, dass die Seeforellen innerhalb eines Zufluss eine einheitliche Population bilden, die als eine für dieses Gewässer spezifische Laichpopulation betrachtet werden kann.

Die Ergebnisse werden weiter unterstützt durch die Structure Analyse, in welcher verschiedene Genotypcluster in den einzelnen Zuflüssen zu erkennen sind (Abbildung 8). Die Auftrennung der

verschiedenen Seeforellen in verschiedene genetische Populationen auf Deutsch /Österreichischer Seite (Rotach, Argen, Leiblach, Bregenzerach) ist dabei nicht so groß, wie die zwischen Deutsch/Österreichischer und Schweizer Seite (Goldach und Steinach). Man findet meist höhere paarweise F_{ST}-Werte zwischen den Deutsch/Österreichischen und den Schweizer Zuflüssen als zwischen den Zuflüssen auf der "gleichen Seeseite" (Tabelle 7).

Interessant ist auch der Vergleich der Seeforellen im Alpenrhein zu den Bachforellen aus dem Liechtensteiner Binnenkanal, der Simmi und der Nafla, hier ist ein noch größerer Unterschied zwischen den Genotypen zu erkennen (Tabelle 8, Abbildung 9). Dieses Ergebnis legt nahe, dass sich die beiden Ökotypen Seeforelle und Bachforelle genetisch voneinander differenzieren. Da die Bachforellen alle ursprünglich aus Zuflüssen des Alpenrheins stammen, könnte dies bedeuten, dass sich die Bachforellen und die Seeforellen in denselben Zuflüssen unterscheiden und somit nicht miteinander verpaaren. Hinweise auf solche genetische Unterschiede zwischen den Ökotypen aus dem gleichen Zufluss wurden bereits 2010 in einer Masterarbeit an der Universität Konstanz gefunden. Hier wurden Seeforellen und Bachforellen aus dem gleichen Zufluss (für Goldach und Steinach) untersucht und es wurden genetische Unterschiede zwischen den Seeforellen und Bachforellen in der Goldach gefunden, allerdings nicht in der Steinach. Hier wären weiterführende Untersuchungen nötig, welche auch die Bachforellen aus den weiteren Zuflüssen, vor allem dem Alpenrhein Hauptstrom mit einschließen. Zuletzt ist noch zu erwähnen, dass sich die Seeforellen aller Zuflüsse stark von den Gründertieren des Elternstamms aus Romanshorn unterscheiden (Tabelle 7). Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich die genetische Untersuchung auf Gründertiere beschränkt und keine repräsentative Aussage auf den gesamten Elternstamm zulässt. Da aktuell keine Proben von Seeforellen aus den Gewässern, die mit Nachkommen aus diesem Elternstamm besetzt wurden (z. B. Aach Arbon, Aach Romanshorn) zur Verfügung stehen und die genetische Struktur von in diesen Gewässern vermehrt auftretenden Aufsteigern unbekannt ist, muss im Moment offen bleiben, welchen Beitrag der Besatz von Nachkommen aus dem Elternstamm Romanshorn zum Erhalt bzw. zum Aufbau der Laichpopulation in diesen Gewässern beiträgt.

5.2 Wiederbesiedelung des Bodensee mit Seeforellen (mtDNA Analysen)

Während des Pleistozäns (vor ca. 20 000 - 18 000 Jahren) wurde der Bodensee von einem Gletscher geformt. Erst dann war er überhaupt zugänglich für eine Besiedelung mit Lebewesen. Das Bodenseegebiet liegt an der Grenze der verschiedenen Seeforellenstammgebiete wie der Donau, dem mediterranen Raum, dem Marmoratus-Stamm in Nord-Italien und dem Atlantik (Bernatchez et al. 1992). Dies könnte zu der Vermutung führen, dass die genetische Variabilität im Bodensee hoch ist. Trotz der Erwartung, im See viele verschiedene Haplotypen zu finden, wurden im Bodensee nur 11 verschiedene Haplotypen gefunden wovon der Hauptteil Atlantische Haplotypen waren. Dies stellt eine relativ geringe Diversität an mtDNA Haplotypen dar. Es existieren im Bodensee noch weitere Fischarten, die ebenfalls nur eine relativ geringe genetische Diversität aufweisen, wie zum Beispiel der Flussbarsch mit 10 Haplotypen (Behrmann-Godel et al. 2004). Es wird vermutet, dass viele dieser Arten mit geringer Diversität in Zentral- und West-Europa während der Hochzeit der letzten Eiszeit in weit entfernt gelegene Refugien verdrängt wurden. Bei der Wiederbesiedelung nach dem Ende der letzten Eiszeit gelang es aber nur wenigen Linien, die eisfrei gewordenen Bereiche neu zu besiedeln (Barluenga et al. 2006).

Bei der Seeforelle ging eventuell ein großer Teil der genetischen Diversität durch fehlende glaziale Refugien verloren. Nur die überlebenden Haplotypen konnten die neu entstandenen Gewässer besiedeln. Eine weitere Möglichkeit, welche die geringe genetische Variabilität erklären könnte, ist der Zusammenbruch der Seeforellenpopulation um 1970. Hier könnte es zu einem Flaschenhals-Effekt gekommen sein, bei dem, ausgehend von einer höheren genetischen Variabilität, nur sehr wenige Haplotypen überlebt haben, die sich später ausbreiten konnten.

Grundsätzlich könnte es auch sein, dass nur einige wenige Haplotypen den Bodensee aus glazialen Refugien heraus besiedelt haben und die beobachteten 11 Haplotypen erst im See entstanden sind. Um allerdings eine Variabilität mit bis zu 14 Mutationsschritten zwischen Haplotypen entstehen zu lassen (siehe Abbildung 6), reicht die Zeitspanne seit der Entstehung des Bodensees nicht aus. Diese Möglichkeit kommt also nicht in Betracht.

5.3 Herkunft der Bodenseeforellen (mtDNA Analyse)

Für den Flussbarsch wurde gezeigt, dass Donau Haplotypen den Bodensee nach der Eiszeit aus der Donau heraus besiedelt haben. Der sich zurückziehende Gletscher hatte zu Beginn noch eine Verbindung zur Donau, über die eine Besiedelung stattfinden konnte (Behrmann-Godel et al. 2004). Zwar gehört der Großteil der im Bodensee gefundenen Haplotypen der Forellen der Atlantik Linie an, jedoch wurden auch zwei Donau Haplotypen gefunden. Durch die ehemalige Verbindung von Donau und Rhein herrscht oftmals auch in der Donau eine erstaunlich hohe Frequenz an Atlantischen Haplotypen (Tautz et al. 2001), so dass ein Vorkommen der Atlantischen Typen im See auch über eine Besiedelung aus der Donau möglich wäre. Da die beiden gefundenen Donau Haplotypen jedoch nur in jeweils einer Seeforelle gefunden wurden, nicht aber bei den Bachforellen scheint es wahrscheinlicher, dass sie durch Besatz mit Seeforellen kurz nach dem Zusammenbruch der Seeforellenpopulation in den See gelangen konnten. Ähnliches gilt wahrscheinlich für den Marmoratus Haplotyp, der ebenfalls in nur einer Seeforelle gefunden wurde. Die Atlantischen Haplotypen könnten neben der Donau auch auf dem Weg über die am Ende der letzten Eiszeit vorhandene Verbindung zum Rhein über den Zürich- und Walensee in den Bodensee gelangt sein (Wagner, 1960).

Eine dritte Erklärungsmöglichkeit für das Vorkommen von Atlantischen Seeforellen im Bodensee bietet der Besatz. Zum ersten Mal wurde der Atlantische Besatz-Haplotyp (AT1) in der Pionierarbeit über Bachforellen mit mtDNA Analyse von Bernatchez 1992 beschrieben, wobei jedoch nur eine weitaus kürzere Sequenz betrachtet wurde und deshalb keine Aufspaltung in weitere Haplotypen möglich war. Später hat auch Apostolidis et al. (1997) fünf Fische aus dem Fluss Garonne in Frankreich analysiert und dabei einen zwei Mutationsschritte entfernten, ähnlichen AT1 Haplotyp entdeckt. Weiss et al. (2000) beschreibt fünf neue AT1 Haplotypen bei 76 portugiesischen Bachforellen, wobei jeder Haplotyp zwei oder drei Mutationsschritte von dem üblichen Nord-Atlantik-Haplotyp entfernt ist. Durch die Arbeit von Garcia et al. 2002 wurde der Haplotyp AT1 schließlich durch eine längere Sequenz in neun Subtypen unterteilt. Fünf dieser Subtypen kommen natürlicherweise in Nord-West-Europa vor (Dänemark, Norwegen) und fast alle wurden in spanischen Aufzuchtanstalten mit deutschem Ursprung gefunden (Duftner et al. 2003). Es handelt sich bei drei der im Bodensee gefundenen Haplotypen (HT8, HT10, HT11) um Sequenzen, die dem mtDNA Profil von diesen Zuchtforellen zugeordnet werden können. Damit liegt die Vermutung sehr nahe, dass einige mtDNA Haplotypen der Seeforellen

durch Besatz mit typischen Zuchtlinien aus Dänemark/Norwegen in den See gelangt sind. Es könnte sein, dass eingesetzte Bachforellen zu wandernden Seeforellen wurden und auf diesem Weg ihr genetisches mtDNA Profil in die Seeforellenpopulation gelangte. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass es wiederholt zu Hybridisierungen zwischen See- und Bachforellen gekommen ist und sich die Genotypen vermischten. Da die mtDNA ausschließlich in der mütterlichen Linie vererbt werden kann, müssten sich anfänglich Seeforellen Milchner mit Bachforellen Rognern verpaart haben. Wenn weibliche Nachkommen aus diesen Verpaarungen oder deren weibliche Nachkommen aus späteren Verpaarungen zu wandernden Seeforellen wurden, könnte es zur Einbringung der oben genannten Haplotypen aus Dänisch/Norwegischen Zuchtlinien in die Seeforellenpopulation gekommen sein.

Da nachweislich 1970 Forellen in den Bodensee eingesetzt wurden (Ruhlé et al. 2005), ist es am wahrscheinlichsten, dass die HT8, HT10, HT11 aus Fischzuchten stammen. Interessanter Weise zeigen vor allem die LA Elterntiere eine hohe Frequenz der Dänisch/Norwegischen Haplotypen (Abbildung 6). Die in sehr geringer Zahl vorkommenden abweichenden Haplotypen aus der Donau- (HT2, HT3) und der Marmoratus Linie (HT4) stammen höchstwahrscheinlich ebenfalls aus dem Besatz mit Seeforellen nach dem Zusammenbruch der autochthonen Bodenseepopulationen. Dabei wurde nicht auf die Herkunft der eingesetzten Fische geachtet und es könnten auch Fische aus Gewässern eingesetzt worden sein, in denen auch Donau- und Marmoratus Haplotypen vorkommen.

Durch den Besatz ist nicht auszuschließen, dass es Introgressions-Ereignisse gegeben hat. Largiadèr & Scholl (1996) untersuchten eine autochthone Forellenpopulation mit Mediterranen Haplotypen im Doubs, einem Zufluss der oberen Rhone. Diese natürliche Population wurde intensiv mit Atlantischen Haplotypen besetzt und ein gewisser Anteil des genetischen Profils der Atlantischen Forellen wurde in die natürliche Population integriert. Für eine Entstehung neuer Haplotypen im Bodensee sind die wenigen Jahre seit dem uns bekannten Besatz jedenfalls bei weitem nicht ausreichend.

Es ist jedoch interessant, dass der häufigste Haplotyp HT6 zwei Mutationen von dem weit verbreiteten Haplotyp aus Fischzuchtanlagen (HT11) entfernt liegt. Es gibt bisher keine vergleichbare Sequenz in der NCBI Datenbank. Er besitzt ein Motiv an der Stelle 250 bp (Tabelle 5), welches ausschließlich bei Donau Haplotypen gefunden wurde und diese von den

Atlantischen Haplotypen unterscheidet. Es könnte sein, dass es sich bei dem HT6 um einen seltenen Haplotyp aus anderen bisher nicht so intensiv untersuchten Gewässern handelt, der nach dem Zusammenbruch der Seeforellenpopulation in den Bodensee eingesetzt wurde. Hierbei ist vor allem zu beachten, dass ein Großteil der Schweizer Seeforellen aus den Zuflüssen Goldach und Steinach diesem Haplotyp zuzuordnen sind. Es könnte sich um eine Atlantische Haplotyp Linie aus dem Genfersee handeln, die vorher noch nicht analysiert wurde. Hier wäre eine Vergleich mit Forellen aus dem Genfersee sicherlich interessant. Außerdem stammten einige Besatz-Seeforellen auch aus größeren Seen in Bayern (persönl. Gespräch mit Fredi Fehr). Hier wurde 2001 von Tautz et al. festgestellt, dass es in den bayerischen Gewässern wohl eine sekundäre Kontaktzone von Atlantischer- und Donau Linie gibt. Es wurden bis dahin unbekannte Atlantische Haplotypen gefunden, die im benachbarten Österreich nicht auftauchen. Dabei könnte der noch unbekannte HT6 aus dieser Kontaktzone in den Bodensee eingebracht worden sein. Aber beim Vergleich mit den in der Studie von Tautz et al. (2001) analysierten Bachforellensequenzen ergab sich keinerlei Übereinstimmung zu dem HT6 des Bodensees. Deshalb ist die Herkunft des HT6 aus der sekundären Kontaktzone in Bayern eher unwahrscheinlich. Um die Herkunft des HT6 genauer zu klären, müsste ein Vergleich mit den Sequenzen der Seeforellen österreichischer und bayrischer Voralpenseen durchgeführt werden. Außerdem ist eine gute Recherche zum Ursprung der Besatzfische in den 1970 er und 1980 er Jahren unbedingt notwendig.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es sich bei dem HT6 um eine bisher unentdeckte Linie handelt, die aus der Donau stammt oder im Bodensee entstanden ist und somit einen "ursprünglichen Bodenseetyp" darstellt. Dieser Haplotyp überdauerte eventuell den Zusammenbruch und wurde dann zur Nachzucht und zum Aufbau einer neuen Seeforellenpopulation verwendet. Dabei hätte er sich regional sehr gut an die Umweltbedingungen anpassen, und sich gegenüber Besatzforellen aus anderen Gewässern durchsetzen können. Wenn es sich um einen ursprünglichen Typ handeln würde, müsste er in allen Zuflüssen und dem See zu finden sein. Zwar findet sich der HT6 auch in allen bisher untersuchten Zuflüssen außer der Rotach, macht aber vor allem einen Großteil der Schweizer Forellen aus und beschränkt sich damit Großteils auf eine Seeseite. Allerdings ist hier die

unterschiedliche Stichprobenanzahl der verschiedenen Standorte zu berücksichtigen, die das Ergebnis verfälschen könnten. Außerdem müsste der HT6 sonst auf den Besiedelungsrouten des Bodensees, also in Rhein oder Donau zu finden sein. Es treten aber keinerlei Ähnlichkeiten zu bereits analysierten Sequenzen aus den beiden Gewässern auf. Bei einer eventuellen Entstehung des HT6 im See aus Vorstufen müssten auch Haplotypen mit weniger als drei Mutationsschritten zum HT11 als Zwischenformen auftreten. Letztendlich ist die Zeitspanne zu kurz, um einen neuen Haplotyp mit drei Mutationsschritten im See entstehen zu lassen. Zur Klärung der Stellung des HT6 im Bodensee müssten weitere Sequenzen aus den eventuellen

Besatzgewässern wie zum Beispiel dem Genfersee analysiert werden, um Vergleiche anstellen und so präzisere Einordnungen vornehmen zu können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen des Interreg IV Projektes wurden 351 Seeforellen aus den Zuflüssen Rotach, Argen, Leiblach, Bregenzerach, Alpenrhein, Goldach und Steinach untersucht, welche im Rahmen der Laichfischerei gefangen wurden. Zusätzlich wurden 32 Seeforellen aus dem Elternstamm Romanshorn, 31 Bachforellen vom Elternstamm aus der Simmi, 39 Bachforellen vom Elternstamm aus dem Liechtensteiner Binnenkanal und 22 Bachforellen aus der Nafla untersucht. Die Populationsstruktur wurde durch die Analyse an 9 Mikrosatellitenloci untersucht. Die Herkunft der Seeforellen und die nacheiszeitliche Besiedlungsgeschichte des Bodensees wurde durch Sequenzanalysen der mtDNA untersucht, wobei Daten aus Voruntersuchungen (Masterarbeit an der Universität Konstanz) und aus der Literatur herangezogen wurden.

Der Vergleich zwischen den Seeforellen, welche in die verschiedenen Zuflüsse aufsteigen, zeigte eine eindeutige Strukturierung. Die Zuflüsse Rotach, Alpenrhein, Goldach und Steinach wiesen jeweils eine spezifische Seeforellenpopulation auf, die sich genetisch eindeutig von jenen der anderen untersuchten Zuflüsse (außer Argen siehe unten) unterschieden. Seeforellen aus den beiden Zuflüssen Leiblach und Bregenzerach dagegen unterschieden sich genetisch nicht voneinander und gehören demnach zu einer einheitlichen Population. Diese Population unterschied sich allerdings von allen anderen aus den oben genannten Zuflüssen und ist

demnach auch als eigenständige Seeforellenpopulation anzusehen. Der Probenumfang aus der Argen war mit 12 Seeforellen zu gering, um verlässliche Aussagen treffen zu können. Es wurden jedenfalls viele genetische Übereinstimmungen mit verschiedenen anderen Zuflüssen gefunden. Die Seeforellen aus den Zuflüssen der Deutsch/Österreichischen Seite (Rotach, Leiblach und Bregenzerach) wiesen genetisch eine größere Ähnlichkeit zueinander auf, als zu den Seeforellen aus den Schweizer Zuflüssen (Goldach und Steinach). Die Gründertiere des Seeforellen-Elternstamms Romanshorn unterschieden sich genetisch deutlich von den Seeforellen aller untersuchten Zuflüsse. Ob sie als eigene Population anzusehen sind oder ob die genetische Struktur auf einen Zuchteffekt zurückzuführen ist, muss mangels aktueller Daten aus den Besatzgewässern momentan offen bleiben. Die Bachforellen aus den Alpenrhein-Zuflüssen Liechtensteiner Binnenkanal, Simmi und Nafla waren genetisch sehr verschieden von den Seeforellen aus dem Alpenrhein, zudem unterschieden sie sich auch untereinander stark. Somit müssen die Bachforellen in den drei Zuflüssen als genetisch unterschiedliche und auch von den Seeforellen unterschiedliche Populationen angesehen werden.

Die Analyse der mtDNA ergab, dass die Seeforellen des Bodensees vorwiegend Atlantische Haplotypen aufwiesen, es wurden aber auch drei Individuen mit Danubischen bzw. einem Marmoratus Haplotyp gefunden. Das könnte darauf hindeuten, dass die Seeforellen nach der letzten Eiszeit den Bodensee aus zwei verschiedenen Rückzugsgebieten besiedelt haben und im Bodensee in Sekundärkontakt gekommen sind. Dieser Umstand ist auch für eine Reihe anderer Fischarten im Bodensee nachgewiesen worden. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass die Danubischen Haplotypen aus dem Besatz mit Seeforellen mit zum Teil unbekannter Herkunft stammen, der nach dem Zusammenbruch der Seeforellenpopulation Ende der 1980 er Jahre in großem Umfang erfolgte. Hier müssten vertiefte Nachforschungen betrieben werden, um die Quellen der Besatzfische so genau wie möglich nachvollziehen zu können. Es wurden im Zuge der Analysen weitere eindeutige Spuren dieser Besatzgeschichte gefunden. Etliche Seeforellen hatten einen für Dänisch/Norwegische Zuchtlinien von Bachforellen typischen Haplotyp. Dieser kann nur auf dem Weg über Hybridisierungen zwischen Seeforellen und aus diesen Zuchtlinien abstammenden Bachforellen in die Seeforellenpopulation gelangt sein. Wie und wann dies geschehen ist, kann allerdings nicht nachvollzogen werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aljanabi, S. M. and Martinez, I. **1997**. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res 25:* 4692-3
- Apostolidis, A. P., Triantaphyllidis, C., Kouvatsi, A. and Economidis, P. S. **1997.** Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L. (Greek brown trout) populations. *Molecular Ecology* 6: 531- 542
- Avise, J., C. **2004.** Molecular Markers, Natural History, and Evolution. *Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA*
- Barluenga, M., Sanetra, M. and Meyer, A. 2006. Genetic admixture of burbot (Teleostei: Lotalota) in Lake Constance from two European glacial refugia. Molecular Ecology 15: 3583-3600
- Beebee, T. and Rowe, G. **2008**. An Introduction to Molecular Ecology. *Oxford University Press, New York*
- Behrmann-Godel, J., Gerlach, G., and Eckmann, R. 2004. Postglacial colonization shows evidence for sympatric population splitting of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) in Lake Constance. *Molecular Ecology* 13: 491-497
- Bernatchez, L. **2001.** The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution 55 (2)*: 351-379
- Bernatchez, L., Guyomard, R. and Bonhomme, F. **1992.** DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology* 1: 161-173
- Berrebi. P., Poteaux, C., Fissier, M., Cattaneo-Berrebi, G. 2000. Stocking impact and allozyme diversity in brown trout from Mediterranean southern France. *Journal of Fish Biology Vol.* 56 (4): 949 – 960
- Birt, T., P., Green, J., M., Davidson, W., S. **1991.** Mitochondrial DNA Variation Reveals Genetically Distinct Sympatric Populations of Anadromous and Nonanadromous Atlantic Salmon, *Salmo salar. Science Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48(4):* 577–582
- Brown, W., M., George, M., Wilson, A., C. **1979.** Rapid evolution of animal mitochondrial DNA.Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 76 (4): 1967-1971
- Carlsson, J., Olsén, K., H., Nilsson, J., Overli, O, Stabell, O., B. **1999.** Microsatellites reveal finescale genetic structure in stream-living brow trout. *Journal of Fish Biology 55*: 1290-1303

- Carlsson, J. and Nilsson, J. **2000.** Population genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) within a northern boreal fores stream. *Hereditas* 132: 173-181
- Charles, K., Guyomard, R., Hoyheim, B., Ombredane, D., Baglienière, J. **2005.** Lack of genetic differentiation between anadromous and resident sympatric brown trout (*Salmo trutta*) in a Normandy population. *Aquat. Living Resour.* **18**: 65-69

Cortey, M., Pla, C., García- Marín, J-L. **2004.** Historical biogeoraphy of Mediterranean trout. *Molecular Phylogenetics and Evolution 33*: 831-844

Cortey, M. and García- Marín, J-L. **2002.** Evidence for phylogeographically informative sequence variation in the mitochondrial control region of Atlantic brown trout. *Journal of Fish Biology 60*: 1058-1063

- Cortey, M., Vera, M., Pla, C., García-Marín, J. **2009**. Northern and Southern expansions of Atlantic brown trout (*Salmo trutta*) populations during the Pleistocene. *Biological Journal of the Linnean Society* 97: 904–917
- Ellegren, H. **2004**. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature ReviewsGenetics 5:* 435-45
- Estoup, A., Presna, P., Krieg, F., Vaiman, D. & Guyomard R. **1993.** (CT)n and (GT)n microsatellites : a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity* 71: 488-496
- Evanno G., Regnaut, S., Goudet, J. **2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-1620
- Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. **2005**. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online 1:*47-50
- Ferguson, A., and Taggart, J., B. **1991.** Genetic differentiation among the sympatric brown trout (*Salmo trutta*) populations of Lough Melvin, Ireland. *Biol. Journ. Of the Linnean Society 43:* 221-237
- Fischer, P. and Eckmann, R. **1997**. Seasonal changes in fish abundance, biomass and species richness in the littoral zone of a large European lake, Lake Constance, Germany. *Archiv für Hydrobiologie 139 (4):* 433-448
- Furrer, G. **1991.** 25000 Jahre Gletschergeschichte.-Neujahresblatt Naturforschende Gesellschaft Zürich
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., Hurst, G., D., D. **2009.** Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology, Vol. 18 (22):* 4541-4550

Giuffra, E., Bernatchez, L. and Guyomard, R. **1994.** Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from northern Italy. *Molecular Ecology 3*: 161-171

Gradmann, R. 1964. Süddeutschland II, Hermann Gentner Verlag Darmstadt: S. 273

- Guyomard, R. **1999.** Genetic diversity and the management of natural population of brown trout. In: Banlinière, J., L., and Maisse, G. eds. Biology and ecology of the brown trout and sea trout. London: *Springer and Chichester: Prakis Publications*: S. 205-223
- Hall, B., G. **2001.** Phylogenetic Trees Made Easy, A How-To Manual for Molecular Biologists. *Sinauer Associates, Massachusetts, USA*
- Handlos, F. **2010.** Analyse der Populationsstrukturen von See- und Bachforelle (*Salmo trutta*) im Bodensee und Zuflüssen. Masterarbeit, Universität Konstanz
- Hansen, M., M., Ruzzante, D., E., Nielsen, E., E., Mensberg, K.-L. **2000**. Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Molecular Ecology 9*: 583-594
- Harrison, R.G. **1989.** Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *TREE vol.4 (1)*: 6-11
- Heggenes, J., Røed, K., H. **2006**. Do dams increase genetic diversity in brown trout (Salmo trutta)? Microgeographic differentiation in a fragmented river. *Ecology of Freshwater Fish 15*: 366–375
- Hindar, K., Jonsson, B., Ryman, N., and Stahl, G. **1991.** Genetic relationships among landlocked, resident, and anadromous Brown Trout, *Salmo trutta* L. *Heredity 66:* 83 91
- Holder, M. and Lewis, P., O. **2003**. Phylogeny estimation: Traditional and Bayesian approaches. *Nature Reviews, Genetics Vol.4*: 275-284
- Hurst, C.,D., Barlett, S.,E., Davidson, W.,S., Bruce, I., J. **1999**. The complete mitochondrial DNA sequence of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Gene* 239:237–242
- IGKB: Internationale Gewässerschutzkommission für den Bodensee. **2004.** Bilanz Kapitel 1. <u>www.hydra-institute.de/igkb/Bilanz%20Kapitel%201.pdf</u>
- IGKB: Internationale Gewässerschutzkommission für den Bodensee. **2009:** Grundlagenbericht für nationale Maßnahmenprogramme, Lebensraum für die Bodensee-Seeforellewww.rp.baden-wuerttemberg.de/servlet/PB/show/1295050/rpt-wrrl-seeforgrundl-bericht.pdf

- Jarne, P. and Lagoda, P.J.L. **1996.** Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE* vol. 11 (10): 424-429
- Jonsson, B. **1982.** Diadromous and resident trout *Salmo trutta*: is there difference due to genetics? *OIKOS 38:* 297-300
- Keller, O., Krayss, E. **2000.** Die Hydrographie des Bodenseeraums in Vergangenheit und Gegenwart. *Berichte der St. Gallischen. Naturwissenschaftlichen Gesellschaft 89*: 39-56
- Klunzinger, C. B., **1881**. Die Fische in Württemberg, faunistisch-biologisch betrachtet, und die Fischereiverhältnisse daselbst. *Jahreshefte des Vereins für vaterländische Naturkunde in Württemberg 37:* 172–304
- Knutsen, H., Knutsen, J., A., Jorde, P., E. **2001.** Genetic evidence for mixed origin of recolonized sea trout populations. *Heredity 87:* 207-214
- Largiadèr, C., R. and Hefti, D. **2002.** Genetische Aspekte des Schutzes und der nachhaltigenBewirtschaftung von Fischarten. *BUWAL. Mitteilungen zur Fischerei Nr. 73*: 114 pp
- Largiadèr, C., R. and Scholl, A. **1996**. Genetic introgression between native and introduced brown trout (*Salmo trutta L*) populations in the Rhône River basin *Molecular Ecology* 5: 417-426
- Meraner, A., Baric, S., Pelster, B., Dalla Via, J. **2007.** Trout (*Salmo trutta*) mitochondrial DNA polymorphism in the centre of the marble trout distribution area. *Hydrobiologia 579*: 337-349
- Meyer, A., Morrissey, J.M., Schartl, M. **1994.** Recurrent origin of a sexually selected trait in *Xiphophorus* fishes inferred from a molecular phylogeny. *Nature 368*: 539-542
- Moritz, C. **1987.** Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology Notes Vol. 3 (4)*: 401-411
- Nordeng, H. **1983.** Solution to the "Char Problem" based on Arcitc Char (*Salvelinus alpinus*) in Norway. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **40** (9): 1372–1387
- Oosterhout, C., Hutchinson, W., F., Wills, D., M., and Shipley, P. **2004**. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes Vol. 4, 3*: 535 538
- O'Reilley, P.T., Hamilton, L.C., McConnell, S.K. and Wright, J.M. **1996.** Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranuchleotide microsatellites. *Can. J. Fish. Aquatic Science Vol.53*: 2292- 2298

- Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P. **2000.** Inference of Population Structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945- 959
- Ratnasingham, S. and Herbert, P., D., N. **2007.** Barcoding BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes* **7:** 355–364
- Rulé, C., Ackermann, G., Berg R., Kindle T., Kistler R., Klein M., Konrad M., Löffler H., Michel M., Wagner B. 2005. Die Seeforelle im Bodensee und seinen Zuflüssen: Biologie und Management. Österreichs Fischerei 58: 230-262
- Ruzzante, D., E., Hansen, M., M., Meldrup, D., Ebert, K., M. **2004.** Stocking impact and migration pattern in an anadromous brown trout (Salmo trutta) complex: where have all the stocked spawning sea trout gone? *Molecular Ecology 13*: 1433-1445
- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA . Chromosoma 109: 365–371
- Schmitt, T. **2007**. Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology 4*:11.
- Schulz, U. **1995**. Untersuchungen zur Ökologie der Seeforelle (*Salmo trutta* f. *lacustris*) im Bodensee. *Konstanzer Dissertationen Bd. 456*. *Hartung- Gorre, Konstanz*.116 pp
- Selkoe, K.A. and Toonen, R.J. **2006.** Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters 9*: 615-629
- Skaala, O.and Naevdal, G. **1989.** Genetic differentiation between freshwater resident and anadromous brown trout, *Salmo trutta*, within watercourses. *Journal of Fish Biology 34:* 597-605
- Suárez, J., Bautista, J. M., Almodóvar, A.& Machordom, A. **2001.** Evolution of the mitochondrial control region in Palaearctic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian Peninsula. *Heredity 87*: 198-206
- Susnik, S., Snoj, A., Wilson, I. F., Mrdak, D., Weiss, S. **2007.** Historical demoraphy of brown trout (*Salmo trutta*) in the Adriatic drainage including the putative *S. letnica* endemic to Lake Ohrid. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 63-76
- Taberlet, P., L. Fumagalli, A.-G. Wust-Saucy, and J.-F. Cosson. **1998**. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7:453-464.
- Tautz, D., Schliewen, U., Englbrecht, C., Rassmann, K., Klein, L.und Miller, M. 2001. Molekulare und populationsökologische Charakterisierung autochthoner und durch Besatz beeinflusster Salmoniden Populationen (Bachforelle, Alpenseesaibling) in Bayern, Forschungsbericht 29685900, Umweltbundesamt, Berlin

- Vasemägi, A., Nilsson, J., Primmer, C.R. **2005.** Seventy-five EST-linked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellite markers and their cross-amplification in five salmonid species. *Molecular Ecology Notes* 5: 282-288
- Wagner, G. **1960**. Einführung in die Erd- und Landschaftsgeschichte mit besonderer Berücksichtigung Süddeutschlands, Öhringen.
- Weiss, S., Schlötterer, C., Waidbacher, H. and Jungwirth, M. **2001.** Haplotype (mtDNA) diversity of brown trout *Salmo trutta* in tributaries of the Austrian Danube: massive introgression of Atlantivc basin fish- by man or nature? *Molecular Ecology 10*: 1241- 1246
- Weiss, S., Antunes, A., Schlötterer, C., Alexandrino, P. **2000.** Mitochondrial haplotype diversity among Portuguese brown trout *Salmo trutta* L. populations: relevance to the post Pleistocene recolonization of northern Europe. *Molecular Ecology 9*: 691-698
- Wilson, A., C., Cann, R., L., Carri, S., M., George, M., Gyllensten, U., B., Helm- Bychowski, K., M., Higuchi, R., G., Palumbil, S., R., Prager, E., M., Sage, R., D., Stoneking, M. **1985.** Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological journal of the Linnean Sociey* 26: 375-400
- Wright, J., M. and Betzen, P. **1994.** Microsatellites: genetic markers for the future. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4: 384-388











