

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT
- Ökosystemschutz, Biotopschutz -

Forschungsbericht 296 85 900
UBA-FB 000188



**Veränderungen der genetischen Vielfalt:
Molekulare und populations-
ökologische Charakterisierung
autochthoner und durch Besatz
beeinflusster Salmoniden-
Populationen (Bachforelle, Alpen-
Seesaibling) in Bayern**

von

**Dr. Ulrich Schliewen
Dr. Claudia Englbrecht
Dr. Kornelia Rassmann
Dipl.-Biol. Michael Miller
Dipl.-Biol. Lars Klein
Prof. Dr. Diethard Tautz**

Zoologisches Institut der Universität München

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Diese TEXTE-Veröffentlichung kann bezogen werden bei
Vorauszahlung von DM 20,-- (10,26 Euro)
durch Post- bzw. Banküberweisung,
Verrechnungsscheck oder Zahlkarte auf das

Konto Nummer 4327 65 - 104 bei der
Postbank Berlin (BLZ 10010010)
Fa. Werbung und Vertrieb,
Ahornstraße 1-2,
10787 Berlin

Parallel zur Überweisung richten Sie bitte
eine schriftliche Bestellung mit Nennung
der **Texte-Nummer** sowie des **Namens**
und der **Anschrift des Bestellers** an die
Firma Werbung und Vertrieb.

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr
für die Richtigkeit, die Genauigkeit und
Vollständigkeit der Angaben sowie für
die Beachtung privater Rechte Dritter.
Die in der Studie geäußerten Ansichten
und Meinungen müssen nicht mit denen des
Herausgebers übereinstimmen.

Herausgeber: Umweltbundesamt
Postfach 33 00 22
14191 Berlin
Tel.: 030/8903-0
Telex: 183 756
Telefax: 030/8903 2285
Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>

Redaktion: Fachgebiet II 1.3
Dr. Ulrike Doyle

Berlin, Juli 2001

BERICHTS-KENNBLETT

1. Berichtsnummer UBA-FB	2.	3.
4. Titel des Berichts Molekulare und populationsökologische Charakterisierung autochthoner und durch Besatz beeinflusster Salmoniden-Populationen (Bachforelle, Alpen-Seesaibling) in Bayern		
5. Autoren Dr. Ulrich Schliewen Dr. Claudia Englbrecht Dr. Kornelia Rassmann Dipl.-Biol. Lars Klein Dipl.-Biol. Michael Miller Prof. Dr. Diethard Tautz		8. Abschlußdatum Mai 2001
		9. Veröffentlichungsdatum
		10. UFOPLAN-Nr 296 85 900
		11. Seitenzahl 206
		12. Literaturangaben 233
		13. Tabellen und Diagramme 31
		14. Abbildungen 22
15. Zusätzlichen Angaben Appendix als CD-ROM beigelegt		
16. Kurzfassung Am Beispiel des Besatzes mit allochthonen Nutzfischen (Bachforelle <i>Salmo trutta</i> , Alpiner Seesaibling <i>Salvelinus umbla</i>) in natürliche Gewässer Bayerns wurde mit molekulargenetischen und ökologischen Methoden untersucht, ob und wie stark sich die Verbringung allochthonen Genmaterials auf die genetische Zusammensetzung autochthoner Populationen auswirkt. Dabei zeigte sich für die Bachforelle, daß mittlerer bis starker Besatz zu einer vergleichsweise geringfügigen Veränderung der genetischen Varianz von Populationen führt, daß aber dennoch diese geringfügige Veränderung der Varianz zu einem drastischen Verlust der lokalen populationsgenetischen Integrität der untersuchten Populationen führen kann. Dies zeigte sich im Vergleich besetzter und unbesetzter Populationen, die sich in ihren genetischen Eigenschaften signifikant unterscheiden: Während Bachforellen aus unbesetzten Populationen genetisch Populationen aus ihrem Fluß- bzw. Bachsystem zuzuordnen waren, war dies bei Individuen aus besetzten Populationen in besetzten Gebieten oft nicht mehr der Fall. Seesaiblingspopulationen aus verschiedenen Seen des Voralpenlandes waren dagegen trotz Besatz in ihrer populationsgenetischen Integrität weniger beeinflusst. Im Gegensatz zur Bachforelle ergaben sich aber aus den Untersuchungen am Seesaibling Hinweise darauf, daß Umweltverschlechterungen zur einer höheren Introgressionsrate allochthonen Genmaterials führen können. Der Vergleich der Bachforellendaten mit Daten zur lokalen Identität von Populationen der Mühlkoppen (<i>Cottus gobio</i>) ergab, daß sich Fische, die die gleichen Gewässer bewohnen dennoch drastisch in ihrer Besiedlungsgeschichte und damit in ihrer sogenannten phylogeographischen Identität unterscheiden können. Aus den Ergebnissen der Studie ergeben sich konkrete Überlegungen zum Schutz der untersuchten Fischpopulationen, die sich im Analogieschluss auf andere Arten übertragen lassen. 1. Für jeglichen effektiven Schutz vor allochthoner Introgression ist die Erfassung der lokalen Identitäten einzelner Tierarten eine unabdingbare Voraussetzung, die gewährleistet werden muss, um schutzwürdige Einheiten zu definieren. 2. Erst auf der Basis dieser Erkenntnisse können im Zusammenspiel mit allen Interessensgruppen machbare Einheiten für den Populationsschutz definiert werden. 3. Auf der Basis dieser lokalen gesellschaftlichen Übereinkunft, müssen Regelungen und Kontrolle zur Ausbringung artgleicher Neozoen in lokal angepassten Managementstrategien eingebracht werden. 4. Das Ausbringen artgleicher aber transgener „allochthoner“ Stämme sollte im Analogieschluss zur Ausbringung anderer artgleicher Neozoen getätigt werden, wobei das Vorsorgeprinzip Anwendung finden sollte, indem man ausschließlich fortpflanzungsunfähige Stämme verwendet.		
17. Schlagwörter Bachforelle, <i>Salmo trutta</i> , Alpen-Seesaibling <i>Salvelinus umbla</i> , Mühlkoppe, <i>Cottus gobio</i> , artgleiche Neozoen, Besatz, mitochondriale DNA, Mikrosatelliten-DNA, phylogeographische Integrität von Populationen, Index of Biotic Integrity (IBI), Evolutionary Significant Units (ESUs), Operational Conservation Units (OCUs),		
18. Preis	19.	20.

REPORT COVER SHEET

1. Report UBA-FB	2.	3.
4. Report Title Molecular and population-ecologic characterisations of autochthonous and stocked salmonid populations (Brown Trout, Alpine Charr in Bavaria)		
5. Authors Dr. Ulrich Schliewen Dr. Claudia Englbrecht Dr. Kornelia Rassmann Dipl.-Biol. Lars Klein Dipl.-Biol. Michael Miller Prof. Dr. Diethard Tautz	8. Report Data May 2001 9. Publication Data 10. UFOPLAN-Ref.-Nr 296 85 900	
6. Performing Organisation Zoological Institute of the LMU-University Munich Department Prof. Tautz Luisenstraße 14 D – 80333 München	11. No. of Pages 206 12. No. of References 233	
7. Sponsoring agency Umweltbundesamt Postfach 330022 D – 14191 Berlin	13. No. of Tables and Diagramms 31 14. No. of Figures 22	
15. Supplementary Notes Appendix on CD-ROM included		
16. Abstract <p>We investigated populations of allochthonous fish species (Brown Trout, <i>Salmo trutta</i> and Alpine Charr, <i>Salvelinus umbla</i>) with molecular genetic and ecological methods to study potential effects of stocking with allochthonous but conspecific neoza on the genetic constitution of autochthonous populations. The results showed that medium to strong stocking leads to a comparatively low change of overall genetic characteristics of populations. However, these comparatively low changes resulted in a drastic loss of population-genetic integrity of the investigated populations. This result was shown by the comparison of stocked and unstocked populations, which differed significantly in their genetic identities: Individual trouts from unstocked populations were mostly assigned on the basis of their genotypes to the population where they were taken from. In contrast, trouts from stocked populations were often assigned to geographically unrelated populations. In contrast to the Brown Trout, populations of the Alpine Charr from different prealpine lakes appear to be rather uninfluenced despite of stocking. However, in contrast to the Brown trouts our results indicate strongly that habitat degradation in combination with stocking may lead to an increased rate of introgression of allochthonous genetic material. We also compared the Brown Trout phylogeographic data with those from the European Sculpin (<i>Cottus gobio</i>), a species that inhabits the same habitats as the Brown Trout. The comparison showed, that despite of their co-occurrence, these two species differ drastically in their history of colonisation. Therefore, even sympatric populations of trouts and sculpins differ in their phylogeographic identity. Our results lead to specific considerations in the context of protection of the investigated fish populations – considerations that may be used by analogy to develop considerations for other organisms, too. These considerations are: 1. To protect effectively against allochthonous introgression from conspecific neoza, there is a need of proper investigation of the local phylogeographic identities of animal populations in order to define significant conservation units. 2. Only on this basis operational conservation units for the protection of the respective animal populations can be defined in cooperation with all relevant groups of the society. 3. On the basis of a local consensus about operational conservation units regulations and control mechanisms for the stocking with conspecific neoza need to be established in the form of locally adapted management strategies. 4. The stocking with conspecific but transgenic („allochthonous“) strains should be done only in analogy to wild-type conspecific neoza. However, in this case the principle of caution should always be applied by using exclusively infertile strains.</p>		
17. Keywords Brown Trout, <i>Salmo trutta</i> , Alpine Charr, <i>Salvelinus umbla</i> , European Sculpin, <i>Cottus gobio</i> , conspecific neoza, stocking, mitochondrial DNA, phylogeographic integrity of populations, Index of Biotic Integrity (IBI), Evolutionary Significant Units (ESUs), Operational Conservation Units (OCUs), release of transgenic fish		
18. Price	19.	20.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Diagramm zum Ablauf des durchgeführten Vorhabens	12
Abb. 2: Ursprüngliche Verbreitung der Bachforelle in Europa, Afrika und Asien	20
Abb. 3: Bachforelle (<i>Salmo trutta</i>) aus der Großen Ohe (Nationalpark Bayerischer Wald)	21
Abb. 4: Alpiner Seesaibling (<i>Salvelinus umbla</i>) aus dem Starnbergersee	25
Abb. 5: Ursprüngliche Verbreitung von Seesaiblingen (<i>Salvelinus alpinus</i> und <i>S. umbla</i>) in Westeuropa	26
Abb. 6: Mühlkoppe (<i>Cottus gobio</i>) aus der Großen Ohe (Nationalpark Bayerischer Wald)	28
Abb. 7: Ursprüngliche Verbreitung von Mühlkoppe (<i>Cottus gobio</i> , <i>C. petiti</i> und <i>C. ferrugineus</i>) in Europa und Asien	29
Abb. 8: Karte Bayerns und Westösterreichs mit allen beprobten Bachforellenpopulationen	33/34
Abb. 9: (A) Darstellung aller Flußsysteme und Bachforellenprobenorte mit ihren Nummern, (B) die Probestellen in Bayern sind vergrößert aufgeführt	36
Abb. 10: Beprobte Seesaiblingsgewässer im bayerischen und österreichischem Voralpen- und Alpengebiet	37
Abb. 11: Beispiel einer Maximum-Arten-Linie	72
Abb. 12: Median-Joining Netzwerk der gefundenen Bachforellen-D-loop Haplotypen	111/112
Abb. 13: UPGMA-Dendrogramm aller beprobten Bachforellen- populationen und Zuchten, dessen Topologie aus den paarweisen theta-Werten berechnet wurde	117/118
Abb. 14: Ergebnisse der Analyse auf signifikante Unterschiede in Selbstklassifikation von Bachforellenindividuen zu einer Population aus ihrem eigenen Vorfluter aufgrund ihrer Mikrosatelliten-Genotypen in Abhängigkeit von ihrer Besatzeinflußwahrscheinlichkeit	121
Abb. 15: Visuelle Darstellung der partiellen Kanonischen Korrespondenzanalyse (PCCA), mit der getestet wurde, in welchem Maße Umweltparameter auf die Rückordnungswahrscheinlichkeit von Individuen wirken, wenn man die geographische Komponente herausrechnet	129
Abb. 16: Ergebnis der multifaktoriellen Analysis of Variance (ANOVA), die Zuordnungswahrscheinlichkeiten von Bachforellenindividuen zur ihrer eigenen Population oder einer aus dem gleichen lokalen Einzugsgebiet (INLOCSYS) in Abhängigkeit des geschätzten Besatzeinflusses (KORRSCORE) darstellt	131
Abb. 17: Verteilung der 6 detektierten Mühlkoppen-Haplotyp-Gruppen über Europa	135

Abb. 18: "Median-joining network" aller Mühlkoppen-Haplotypen (H1-H46)	137/138
Abb. 19: (A) Maximum Likelihood, Neighbour-Joining und Maximum Parsimony Baum der häufigsten Mühlkoppen-Haplotypen in jedem Flußsystem	139
Abb. 20: Mögliche Verbreitungswege der Mühlkoppe im Pliozän, im Pleistozän und im Holozän	142
Abb. 21: "Median-Joining network" der 17 mitochondrialen Seesaiblings-Haplotypen, grau schattiert sind die Haplotypen aus dem Ammersee	151
Abb. 22: Dendrogramme auf der Basis paarweiser Populationsvergleiche auf der Grundlage der Mikrosatelliten-Diversität	155

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Populationsgenetisch beprobte bayerische und österreichische Bachforellengewässer und Zuchtstationen	31/32
Tabelle 2: Populationsgenetisch beprobte europäische Koppenpopulationen	34/35
Tabelle 3: Populationsgenetisch beprobte präalpinen Seesaiblingspopulationen	37
Tabelle 4: Grundlage für die Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, mit der allochthone Bachforellen in den befischten Gewässerabschnitt gelangt sein konnten	40
Tabelle 5: Klassifizierung der Gewässer nach Besatzeinflußwahrscheinlichkeit auf der Basis der Befragungen und Elektrobefischungen	40/41
Tabelle 6: Gemessene chemische Gewässerparameter und angewandte Meßmethoden	47
Tabelle 7: Mikrosatellitenloci, PCR-Primersequenzen und PCR-Annealing-Temperaturen für alle in der Studie verwendeten nukleären genetischen Marker	52
Tabelle 8: Mitochondriale Genabschnitte, die zur Amplifikation dieser Abschnitte verwendeten PCR-Primersequenzen, die dazugehörigen PCR-Annealing-Temperaturen	53
Tabelle 9: Schnittstellen der 4 untersuchten Restriktionsenzyme, die bei der Analyse der Bachforellenpopulationen verwendet wurden	54
Tabelle 10: Biotische Integritätsklassen sowie die generelle Beschreibung ihrer Eigenschaften gemäß dem IBI nach Karr (1981)	69
Tabelle 11: Potentielle Kriterien für die Evaluation der biotischen Integrität bayerischer Salmonidengewässer	75
Tabelle 12: Trophische Gilden, Ursprünglichkeit und Toleranz der Fischarten, die während dieser Studie gefunden worden sind	77
Tabelle 13: Zuordnung der Bewertungstabellen der Gewässergüte durch organismische Analysen und chemische Messungen	87
Tabelle 14: Gesamtgüteabschätzung aller für die Evaluation des Forellenbach-IBI's untersuchten Gewässer	89
Tabelle 15: Korrelation jedes IBI-Kriteriums mit der Gesamtgüteabschätzung, basierend auf Säuregüteklassifizierung, Saprobienindex und chemischen Stichprobenmessungen	89/90/91
Tabelle 16: Kriterien, die über die ökologische Güte von bayerischen Forellenbächen eine fundierte Aussage treffen	98
Tabelle 17: Korrelationsmatrix (Spearman's Korrelationskoeffizient ϕ) zwischen dem modifizierten IBI ohne Konditionsvariabilität (IBI ₆), mit Konditionsvariabilität (IBI ₇), Gewässergüte (Güte) und Gewässergüte mit Korrektur bei Schindelbach und Langenaubach (Güte ₂) ..	99
Tabelle 18: Güteklassen des Forellenbach-IBI's und ihre Bedeutung	101

Tabelle 19: IBI-Bewertung aller untersuchten Bäche und anderen Umweltdaten, die in die Gesamtanalyse miteingegangen sind	104/105
Tabelle 20: ND5/6 RFLP-Haplotypenverteilung der einzelnen Bachforellenpopulationen	108/109
Tabelle 21: Übersicht über die 13 im Rahmen der Studie detektierten Bachforellen-D-Loop-Haplotypen repräsentativer Tiere (555 Basenpaare) mit ihren 22 potentiell variablen Positionen	110
Tabelle 22a: Stichprobengröße (n), Fragmentlänge in Basenpaaren, Allelfrequenzen, Anzahl detektierter Allele (A), erwartete (H _{exp}) und beobachtete Heterozygotität (H _{obs}) der Mikrosatellitenloci MST 85 und 543AE in den untersuchten Bachforellenpopulationen	114
Tabelle 22b: Stichprobengröße (n), Fragmentlänge in Basenpaaren, Allelfrequenzen, Anzahl detektierter Allele (A), erwartete (H _{exp}) und beobachtete Heterozygotität (H _{obs}) der Mikrosatellitenloci SSA85, SFO8 und BS131 in den untersuchten Bachforellenpopulationen	115
Tabelle 23a: Ergebnisse der GeneClass-Selbstklassifikationsanalyse für natürliche Gewässer mit ausreichender Stichprobengröße	122
Tabelle 23b: Ergebnisse der GeneClass-Selbstklassifikationsanalyse für Zuchtstationen und natürliche Gewässer mit niedriger Stichprobengröße	123
Tabelle 24a: Ergebnisse der Kanonischen Korrespondenzanalyse: Einfluß des Gewässernetzes	125
Tabelle 24b: Ergebnisse der Kanonischen Korrespondenzanalyse: Einfluß der Umweltfaktoren und Analyse der Gesamtvarianz	126
Tabelle 25: Beprobte Mühlkoppengewässer mit Probennummern, die Flußsysteme, in denen sie liegen, Anzahl der Proben pro Gewässer (N) und Nummern der Haplotypen, die gefunden wurden	136
Tabelle 26: Nukleotid-Diversität von Mühlkopp-Haplotypen innerhalb von Flußsystemen	140
Tabelle 27: Übersicht über die 17 im Rahmen der Studie detektierten Seesaiblings-D-Loop-Haplotypen repräsentativer Tiere (225 Basenpaare) mit ihren 14 variablen Positionen	149
Tabelle 28: Anzahl der Seesaiblingsindividuen, die in jedem See untersucht wurden (N _{alle}) und mitochondriale Haplotypen, die innerhalb der Seen gefunden wurden	150
Tabelle 29: Anzahl der Allele pro Locus über alle Seesaiblings-Populationen, pro Locus pro Population, mittlere Anzahl der Allele pro Population (m) und Anzahl der untersuchten Tiere pro Population (N)	153
Tabelle 30: Beobachtete (H _o) und erwartete (H _e) Heterozygotien pro Locus und pro Seesaiblingspopulation und über alle Loci (H _m) mit den Signifikanzen (p) der Abweichung vom H-W Gleichgewicht	154
Tabelle 31: Zuordnung (Selbstklassifikation) einzelner Seesaiblingsindividuen zu der Population, aus der sie entnommen wurden (Baysean-Methode mit dem Programm GENECLASS)	156

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Aufgabenstellung	7
1.2	Planung und Verlauf des Vorhabens (Abb. 1)	9
1.2.1	Lokalisierung verschieden stark besetzter Populationen und Probennahme	
1.2.2	Populationsökologische Charakterisierung der befischten Fließgewässer mit besonderer Berücksichtigung des Besatzeinflusses	
1.2.3	Analyse des Bachforellenmaterials auf Färbungsvariabilität	
1.2.4	Beibringung von Vergleichsmaterial aus Fischzuchten	
1.2.5	Etablierung der molekularen Markersysteme	
1.2.6	Populationsgenetische Analyse	
1.2.7	Verwendung der Daten für die Abschätzung von Schadenswahrscheinlichkeiten im Zusammenhang mit der Verdrängung von autochthonen Populationen durch Neozoen	
1.3	Stand der Forschung	13
1.3.1	Grundlagen	
1.3.1.1	Die Neozoen-Problematik auf innerartlicher Ebene	
1.3.1.2	Ursprung der genetischen Biodiversität	
1.3.1.3	Merkmale autochthoner genetischer Biodiversität und Integrität	
1.3.1.4	Introgressive Hybridisation und ihre Folgen	
1.3.1.5	Determinanten der Introgressionsintensität	
1.3.2	Die Bachforellenpopulationen (<i>Salmo trutta</i>) in Bayern als Modellsystem zur Untersuchung des Besatzeinflusses in Fließgewässern	
1.3.2.1	Zur systematischen Einordnung der Bachforelle	
1.3.2.2	Ursprüngliche genetische Diversität der Bachforelle in Europa und Bayern	
1.3.2.3	Der Einfluss von Besatzmaßnahmen auf Bachforellenpopulationen	
1.3.3	Der alpine Seesaibling (<i>Salvelinus umbla</i>) als Modellsystem zur Untersuchung des Besatzeinflusses in Seen	
1.3.3.1	Abriß der Biologie des Seesaiblings	
1.3.3.2	Genetische Diversität und Besatz von Seesaiblingen in Europa und Bayern	
1.3.4	Die Mühlkoppe (<i>Cottus gobio</i>) als unbeeinflusstes phylogeographisches Vergleichssystem zur Bachforelle	
1.3.4.1	Abriß der Biologie und Systematik der Mühlkoppe (<i>Cottus gobio</i> -Formenkreis)	
1.3.4.2	Genetische Diversität von Mühlkoppen in Europa und Bayern	
2	Material, Methoden, Ergebnisse der Vorarbeiten	31
2.1	Auswahl der untersuchten Fischpopulationen	31
2.1.1	Bachforelle (<i>Salmo trutta</i>)	
2.1.2	Koppe (<i>Cottus gobio</i>)	
2.1.3	Alpiner Seesaibling (<i>Salvelinus umbla</i>)	

2.2	Abschätzung der Besatzintensität der untersuchten Gewässer	38
2.2.1	Direkte Befragungen zum Besatzeinfluß	
2.2.2	Wahrscheinlichkeit des Einwanderns von allochthonen Teichflüchtlingen	
2.2.3	Einwanderungswahrscheinlichkeit aus anderen Gewässerabschnitten	
2.2.4	Vorkommen allochthoner Fischarten	
2.2.5	Ermittlung einer Gesamtwahrscheinlichkeit für den Besatzeinfluß	
2.3	Befischungen, Probenahme, Charakterisierung der Untersuchungsstellen ...	42
2.3.1	Elektrofischerei in Fließgewässern	
2.3.2	Fang der Seesaiblinge und Seenkoppen	
2.3.3	Zwischenhälterung und photographische Dokumentation	
2.3.4	Dichtebestimmung der Bachforellenpopulationen	
2.3.5	Fischbiomasse- und Individuenanzahlbestimmung	
2.3.6	Bestimmung der Bachforellen-Altersklassen und des Brutanteils	
2.3.7	Berechnung des Bachforellen-Konditionsfaktors	
2.3.8	Ermittlung des Einzugsgebietes und der Höhe des Befischungsgebietes über NN	
2.4	Fischunabhängige Evaluationsmethoden der untersuchten Fließgewässer ..	45
2.4.1	Chemische Untersuchungen	
2.4.1.1	Ökologische Grundlagen der chemischen Belastungsparameter	
2.4.1.2	Datenaufnahme der chemischen Parameter	
2.4.2	Saprobienindex	
2.4.2.1	Ökologische Grundlage zum Saprobienindex	
2.4.2.2	Makrozoobenthos-Datenaufnahme	
2.4.2.3	Berechnung des Saprobienindex'	
2.4.3	Biologischer Versauerungsbefund	
2.5	Molekulargenetische Analysemethoden	49
2.5.1	Eingesetzte Marker	
2.5.1.1	Mitochondrielle DNA	
2.5.1.2	Mikrosatelliten	
2.5.2	Labormethoden	
2.5.2.1	DNA-Extraktion	
2.5.2.1.1	Bachforellen und Seesaiblinge	
2.5.2.1.2	Mühlkoppen	
2.5.2.2	Amplifikation von DNA mit PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	
2.5.2.2.1	Amplifikation und Detektion von Mikrosatelliten	
2.5.2.2.2	Amplifizierung der Kontrollregion und des ND5/6 der mitochondrialen DNA	
2.5.2.3	Aufreinigung der mitochondrialen Fragmente und Sequenzierung	
2.5.2.4	RFLP-Analyse mitochondrialer Genabschnitte	
2.5.2.4.1	Das Prinzip der RFLP	
2.5.2.4.2	Analyse der Restriktionsfragmente	
2.5.2.5	Klonierung von Mikrosatelliten	
2.5.2.5.1	Isolierung und Restriktionsverdau genomischer DNA und Herstellung einer Genbank	
2.5.2.5.2	Ligation und Transformation der Fragmente	
2.5.2.5.3	Detektion der Mikrosatelliten-Klone mittels radioaktiv markierter Sonden	
2.5.2.5.4	Isolierung der M13mp19 und pZER0-2™ DNA und deren Sequenzierung	
2.5.2.6	Auswertung der Rohdaten der Mikrosatellitenanalyse	

2.6	Populationsgenetische Analysen	56
2.6.1	Test auf Hardy-Weinberg Gleichgewicht	
2.6.2	Test auf freie Rekombination zwischen Markern	
2.6.3	F-Statistik	
2.6.4	Varianzanalyse	
2.6.5	Selbstklassifikationsanalysen („Assignment“-Tests)	
2.6.6	„Multiple comparison post tests“	
2.7	Phylogenetische Analysen	59
2.7.1	„Median-joining network“	
2.7.2	Stammbaumanalysen	
2.7.2.1	„Neighbour-Joining“	
2.7.2.2	„Maximum Parsimony“	
2.7.2.3	„Maximum Likelihood“	
2.7.3	Abschätzen der „Molekularen Uhr“ mit dem „ <i>Likelihood ratio test</i> “	
2.7.4	Berechnung der molekularen Diversität	
2.8	Statistische Methoden	62
2.8.1	Statistische Standardmethoden	
2.8.2	Kanonische Korrespondenz-Analyse (CCA)	
2.8.2.1	Hintergrund	
2.8.2.2	Anwendung der CCA auf die erhobenen genetischen Daten	
2.8.2.2.1	Aufbereitung der Daten	
2.8.2.2.2	Gesamtanalyse mit CANOCO	
3	Ergebnisse	65
3.1	Erarbeitung eines biotischen Integritätsindex (IBI) für Forellenbäche	65
3.1.1	Indices zur Bestimmung der Gewässergüte	
3.1.2	Der Biotische Integritätsindex (IBI) nach Karr	
3.1.2.1	Beschreibung der Kriterien des IBI's nach Karr (1981)	
3.1.2.1.1	Kriterien der Artenzahl- und Zusammensetzung (Ebene 1)	
3.1.2.1.2	Kriterien, die andere ökologische Faktoren berücksichtigen (Ebene 2)	
3.1.2.2	Bewertung der Kriterien für die Bildung von Integritätsklassen nach Karr	
3.1.2.3	Bisherige Modifikationen der IBI-Kriterien	
3.1.2.3.1	Kritik an und Modifikationen von Karr's Kriterien der Artenzahl- und Zusammensetzung	
3.1.2.3.2	Kritik an und Modifikation von Karr's Kriterien, die ökologische Faktoren aufnehmen	
3.1.2.3.3	Berücksichtigung des Einzugsgebiets durch „Maximum-Linien“	
3.1.3	Modifikation von Karr's IBI zur Applikation an Mittelgebirgsforellenbächen	
3.1.3.1	Voruntersuchungen	
3.1.3.2	Eine erweiterte Liste von Kriterien für den Forellenbach-IBI	
3.1.3.3	Ökologische Grundlagen und Klassierung der erweiterten Kriterienliste	
3.1.3.3.1	Kriterium <i>Anzahl autochthoner Arten</i>	
3.1.3.3.2	Kriterium <i>Anteil der für die Forellenregion untypischen und euryöken Arten</i>	
3.1.3.3.3	Kriterium <i>Vorkommen von Cottus gobio und Lampetra planeri</i>	
3.1.3.3.4	Kriterium <i>Anteil an Individuen euryöker Arten</i>	
3.1.3.3.5	Kriterium <i>Anteil der Gesamtindividuen als Generalisten</i>	
3.1.3.3.6	Kriterium <i>Altersklassenaufbau der Bachforelle</i>	

3.1.3.3.7	Kriterium <i>Anteil der (Bachforellen-)Brut an der Gesamtpopulation</i>	
3.1.3.3.8	Kriterium <i>Höhe der Kondition</i>	
3.1.3.3.9	Kriterium <i>Variabilität der Kondition</i>	
3.1.3.3.10	Kriterien <i>Individuenanzahl</i> und <i>Fischbiomasse</i>	
3.1.4	Ermittlung einer IBI-unabhängigen Gesamtgewässergüte der untersuchten Gewässer auf Grundlage der organismischen und chemischen Daten	
3.1.4.1	Analyse und Bewertung einzelner Kriterien für einen Forellenbach-IBI entsprechend der Ergebnisse der Befischungen	
3.1.4.1.1	Kriterium <i>Anzahl autochthonen Arten</i>	
3.1.4.1.2	Kriterium <i>Anteil der euryöken und für die Forellenregion untypischen Arten</i>	
3.1.4.1.3	Kriterium <i>Vorkommen der intoleranten Arten <i>Cottus gobio</i> und <i>Lampetra planeri</i></i>	
3.1.4.1.4	Kriterium <i>Anteil der Individuen euryöker Arten</i>	
3.1.4.1.5	Kriterium <i>Anteil der Generalisten (Individuen)</i>	
3.1.4.1.6	Kriterien <i>Altersklassenaufbau</i> und <i>Brutanteil</i>	
3.1.4.1.7	Kriterium <i>Konditionsmittelwert</i>	
3.1.4.1.8	Kriterium <i>Variabilität der Kondition</i>	
3.1.4.1.9	Kriterium <i>Biomasse</i>	
3.1.4.1.10	Kriterium <i>Gesamtindividuenanzahl</i>	
3.1.5	Erstellung und Charakterisierung eines Forellenbach-IBIs mit 7 Kriterien	
3.1.5.1	Abschließende Charakterisierung des Forellenbach-IBI's	
3.1.5.2	Gesamtbewertung des Forellenbach-Index	
3.1.5.3	Eigenschaften des Forellenbach-IBI's	
3.1.5.4	Evaluation des Forellenbach-IBI's	
3.1.5.5	Anwendbarkeit des erarbeiteten IBI auf das vorliegende Projekt	
3.1.5.6	Potential des Forellenbach-IBI über das vorliegende Projekt hinaus	
3.1.6	Zusammenfassung der nicht-genetischen Daten zur Bewertung aller in die Gesamtanalyse eingegangenen Bäche	
3.1.7	Zusammenfassung Ergebnisse zum Forellenbach-IBI	
3.2	Genetische Biodiversität und Besatzeinfluß auf Bachforellenpopulationen ..	107
3.2.1	Mitochondriale Diversität	
3.2.1.1	Charakterisierung der ND5/6 RFLP Bandenmuster	
3.2.1.2	Phylogenetische Verwandtschaft der RFLP-Haplotypen	
3.2.1.3	Phylogenetische Verwandtschaft der D-Loop Haplotypen	
3.2.1.4	Geographische Verteilung der RFLP Haplotypen	
3.2.2	Diversität auf Mikrosatelliten-Ebene	
3.2.2.1	Paarweise Populationsvergleiche	
3.2.2.2	Ergebnisse der Selbstklassifikationsanalyse	
3.2.2.3	Ergebnisse der Kanonischen Korrespondenzanalyse zur Quantifizierung des Einflusses von Gewässernetz, Umweltfaktoren und Besatz auf die typisierte mitochondriale und nukleäre genetische Diversität der Bachforelle	
3.2.2.3.1	Einflusses des Gewässernetzes auf die beobachtete genetische Varianz	
3.2.2.3.2	Einflusses der Umweltdaten unter Berücksichtigung des Einflusses des Gewässernetzes	
3.2.2.4	Ergebnisse einer multifaktoriellen Regressionsanalyse zur Überprüfung eines linearen Zusammenhangs zwischen Umweltparametern und phylogenetischer Integrität	
3.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	
3.3	Phylogeographie der Koppe (<i>Cottus gobio</i>) als Vergleichssystem	134
3.3.1	Sequenzvariation	
3.3.2	„Median-joining network“ Analyse und geographische Verteilung der Haplotypen	
3.3.3	Weitere Stammbaumanalysen	
3.3.4	Abschätzung molekularer Diversität	

3.3.5	Phylogeographische Interpretation der Ergebnisse	
3.3.5.1	Altersabschätzung der Gruppen	
3.3.5.2	Hypothese zur Verbreitungsgeschichte der Mühlkoppe	
3.3.6	Eignung des Systems Mühlkoppe als unbeeinflusstes Vergleichssystem für die von Besatz beeinflusste Bachforelle in Bayern	
3.3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	
3.4	Phyllogeographie und Besatzeinfluß beim alpinen Seesaibling (<i>Salvelinus umbla</i>)	148
3.4.1	Teilweise Rekonstruktion der Besatzgeschichte der untersuchten Seen	
3.4.2	Deskriptive genetische Daten	
3.4.2.1	Mitochondriale Diversität	
3.4.2.2	Phylogenetische Analyse der mitochondrialen Haplotypen	
3.4.2.2.1	„Median-joining network“ Analyse	
3.4.2.2.2	Phylogeographische Interpretation der mitochondrialen Ergebnisse	
3.4.2.3	Diversität auf Mikrosatellitenebene	
3.4.2.3.1	Paarweise Populationsvergleiche mittels Varianzanalyse	
3.4.2.3.2	Selbstklassifikationsanalysen	
3.4.3	Phylogeographische Interpretation und Diskussion der Mikrosatellitenergebnisse	
3.4.4	Vergleich der Ergebnisse aus der Mikrosatelliten- und mt-DNA-Analyse	
3.4.5	Der Einfluß von Besatzmaßnahmen auf die phylogeographische Integrität	
3.4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse für den Seesaibling	
4	Diskussion der erzielten Ergebnisse	162
4.1	Möglichkeiten und Grenzen der Abschätzbarkeit negativer Folgen des Besatzeinflusses	162
4.1.1	Der obere Donauraum als natürliche Introgressionszone für atlantische Linien	
4.1.2	Existenz und Verlust kleinräumiger phylogeographischer Integrität durch Besatz	
4.1.3	Möglichkeiten und Grenzen der Abschätzbarkeit des Verlusts	
4.2	Beschleunigen Umweltveränderungen die Introgression allochthonen genetischen Besatzmaterials ?	166
4.3	Lassen sich aus den gewonnenen Erkenntnissen Rückschlüsse auf die negativen Folgen des Einbringens transgener Salmoniden ableiten ?	167
4.4	Sind artübergreifende Rückschlüsse über negative Folgen anthropogen bedingter Introgression allochthonen Genmaterials aus den gewonnenen Erkenntnissen möglich?	168

5	Empfehlungen	169
5.1	Regelungsbedarf für das Aussetzen von artgleichen Neozoen und transgenen Tierarten	169
5.2	Konkrete Empfehlungen am Beispiel der untersuchten Organismen	171
5.2.1	Weitergehende Maßnahmen zur artspezifischer Definition von „ESUs“ (Evolutionary Significant Units) für die Bachforelle und den alpinen Seesaiblings	
5.2.2	Erarbeitung einer modernen gesellschaftlichen Übereinkunft zur Schutzwürdigkeit lokaler Salmonidenpopulationen („OCU´s“: Operational Conservation Units) und zur gesetzlichen Regelung allochthoner Introgression	
5.2.3	Erarbeitung lokal angepasster Kontroll- und Managementstrategien zur Besatzpolitik	
5.2.4	Entwicklung, Propagierung und Verwendung nicht fortpflanzungsfähiger transgener Salmonidenstämme	
6	Kurzfassung des Schlussberichtes	175
7	Summary	183
8	Zusammenarbeit mit anderen Stellen / Danksagung	191
9	Literaturverzeichnis	193
10	Erläuterungen der Abkürzungen	206
11	Anhang 1-11 siehe CD-ROM (Die CD kann unter der Nummer UBA-FB 000188 aus der Bibliothek des Umweltbundesamtes, Postfach 33 00 22, 14191 Berlin, Fax: 030/89 03 - 21 54, ausgeliehen werden.)	
Anhang 1:	Die zusammengefassten Ergebnisse der Befragungen zur Besatzgeschichte der untersuchten Bachforellengewässer	
Anhang 2:	Matrix der Gewässerknotenverbindungen, die den Zusammenhang zwischen allen untersuchten Bachforellengewässer widerspiegelt, so wie er in die Kanonische Korrespondenzanalyse eingegeben ist	
Anhang 3:	Übersicht der variablen Position der sequenzierten mitochondrialen Bachforellen-Haplotypen	
Anhang 4:	Alignment der 48 Bachforellensequenzen des sequenzierten mitochondrialen D-Loop-Fragments von 555 bp Länge	
Anhang 5:	Die individuellen Mikrosatelliten-Genotypen aller untersuchten Bachforellenindividuen	
Anhang 6:	Auflistung aller paarweisen theta-Werte für die Bachforellen-Populationsvergleiche	
Anhang 7:	Individuelle Selbstklassifikationsergebnisse mit GENECLASS aller untersuchten Bachforellenindividuen	
Anhang 8:	Gesamtsequenzen aller sequenzierten mitochondrialen Mühlkopfen-Haplotypen (D-Loop)	
Anhang 9:	Gesamtsequenzen aller sequenzierten mitochondrialen präalpinen Seesaiblings-haplotypen im Vergleich zu Sequenzen des Seesaiblings aus Norwegen und Nordamerika, ebenso wie des Bachsaiblings aus Nordamerika	
Anhang 10:	Typisierte Seesaiblings-Mikrosatelliten-Genotypen mit den dazugehörigen Allel-frequenzen pro Locus	
Anhang 11:	Theta-Werte für die paarweisen Populationsvergleiche aller Seesaiblingspopulationen entsprechend der Mikrosatellitenanalyse	

1 Einleitung

1.1 Aufgabenstellung

Da sowohl ethische als auch praktische Erwägungen die Erhaltung genetischer Variation in natürlichen Tier- und Pflanzenpopulationen rechtfertigen (z.B. FAO/UNEP 1981, Ryman 1991), muß es sowohl aus der Sicht fischereilichen als auch naturschützerischen Managements das oberste Ziel sein, die genetischen Ressourcen soweit zu erhalten, daß vermeidbarer und unumkehrbarer Verlust von genetischer Diversität nicht eintritt (Riggs 1990; Ryman 1991). Dies besonders, weil wir tatsächlich gar nichts über den wirtschaftlichen, ökologischen und evolutionären Wert der meisten Gene oder Populationen wissen. Auf dieser Basis liegt es in der Verantwortlichkeit des jeweiligen Ressourcenmanagements, die genetische Integrität aller Wildtierpopulationen soweit wie möglich zu erhalten, und auf der Basis entsprechender Untersuchungen wirksame Mittel zur Durchsetzung dieses Ziel aufzuzeigen und anzuwenden (Ryman 1991).

Mit der Entwicklung von hochvariablen DNA-Markern hat sich allerdings erst in den letzten Jahren die Möglichkeit ergeben, objektive Kriterien für den natürlichen Differenzierungsgrad von Populationen und Spezies zu schaffen. Nur auf dieser Basis ist es überhaupt möglich, den Grad der genetischen Einzigartigkeit und damit Schutzwürdigkeit von Populationen abzuschätzen. Viele Studien an ausgewählten Organismen haben bereits gezeigt, daß sich mit modernen genetischen Markern evolutiv gewachsene Populationsstrukturen verhältnismäßig sicher rekonstruieren lassen, die mit anderen Methoden unentdeckt geblieben wären. Dennoch ist bis zum heutigen Zeitpunkt wenig über den Grad und die Bedeutung lokaler genetischer Differenzierung vor allem mitteleuropäischer Populationen bekannt. Es fehlt damit auch an objektiven Einschätzungen darüber, welchem potentiellen Verlust und welchem Schaden wir durch den Einfluß von artgleichem neozooischem Genmaterial gegenüberstehen. Dieser Mangel an objektiver Einschätzungsfähigkeit bekommt ein besonders kritisches Gewicht durch die rezent entstandene Möglichkeit, daß artgleiche aber gentechnisch veränderte Individuen über introgressive Hybridisierung die autochthone genetische Identität natürlicher Populationen verändern. Diese theoretisch denkbaren negativen Effekte können weit über den Verlust lokaler genetischer Differenzierung hinausgehen.

Angesichts der technischen Möglichkeiten auf der einen Seite und des hohen Klärungsbedarfs auf der anderen Seite, muß es ein wichtiges angewandtes Forschungsziel sein, an ausgewählten Modellorganismen Abschätzungen darüber zu erlangen, ob und wie schnell sich Konsequenzen genetischer Hybridisierung in natürlichen Populationen manifestieren.

Die Ergebnisse unseres in den letzten Jahren erarbeiteten Salmonidenprojekts sollten in diesem Zusammenhang einen Beitrag zu dieser Fragestellung leisten, der besonders auf die deutsche Situation zugeschnitten ist. An zwei wirtschaftlich bedeutenden Fischarten sollten die genetischen Konsequenzen bereits langanhaltenden Einflusses von artgleichen Neozoen in Deutschland auf natürliche Populationen untersucht werden und mit einem unbeeinflussten Fischsystem verglichen werden.

Dieser Ansatz ergab sich, weil durch den Besatz mit allochthonem Material die ursprünglichen Bestände besonders der einheimischen Salmoniden bereits stark mit neozooischem Erbmaterial verfremdet wurden, ohne daß zum Grad der Verfremdung eine Quantifizierung vorliegen würde. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Bachforelle (*Salmo trutta*): Am Beispiel relativ unbeeinflusster, sowie durch Besatz stark veränderter Bachforellenpopulationen im süddeutschen Raum sollte der Einfluß der neozooischen Elemente auf die genetische Diversität bestimmt werden. Um den Besatzeinfluss gegenüber anderen natürlich vorliegenden oder anthropogen veränderten Umweltparametern abgrenzen zu können, sollten die für diese Untersuchung beprobten Gewässerabschnitte gleichzeitig ökologisch mit einem modifizierten „Index of Biological Integrity“ (IBI) charakterisiert werden. Aus Vergleichsgründen sollten ursprünglich einige völlig naturbelassene Bachforellenpopulationen aus einem skandinavischen oder südost-europäischen Land untersucht werden. Dieses Unterfangen stellte sich aber als zu schwierig heraus, weil sich keine eindeutig unbesetzten Bachforellenpopulationen in diesen Ländern identifizieren ließen. Als Vergleichssystem wurde deshalb die mit den Bachforellen zusammen zu beprobende, aber wegen ihrer wirtschaftlich Unwichtigkeit nie oder kaum besetzte Mühlkoppe (*Cottus gobio*) herangezogen.

Zur Bestimmung der genetischen Diversität sollten moderne molekulare Marker, mitochondriale DNA-Sequenzen und sogenannte Mikrosatelliten, verwendet werden. Letztere deshalb, weil sie wegen ihrer Trennschärfe, der Unzweideutigkeit bei der Allelzuordnung und der Reproduzierbarkeit entscheidende Vorteile gegenüber früher benutzten Markern (Enzyme, „Minisatelliten“, RAPD-Marker) besitzen. In einem zweiten Schritt sollten in die Studie auch die in ihrer ursprünglichen Identität bedrohten Alpen-Seesaiblinge (*Salvelinus umbla*) und Donau-Huchen (*Hucho hucho*) in analoger Weise einbezogen werden. Wegen mangelnder Möglichkeiten, den Donauhuchen populationsgenetisch zu beproben, weil nicht alle molekularen Bachforellenmarker für den Donauhuchen funktionierten, und auch weil durch die Miteinbeziehung der Mühlkoppe bereits ein zweites Vergleichssystem zur Verfügung stand, wurde die Bearbeitung der letzteren Art im Rahmen des vorliegenden Projekts verworfen.

Die Ergebnisse der Studie stellen einen Modellfall für das Problemfeld der Verdrängung von autochthonen Populationen durch Neozoen dar. Die Studie ist so angelegt, daß die angewandte Methodik generalisierbar ist und in ähnlicher Weise für andere Modellobjekte eingesetzt werden kann. Die gewonnenen Daten werden es erlauben Schadensszenarien zu entwickeln und Schadenswahrscheinlichkeiten abzuschätzen. Gleichzeitig dient die Studie als Basis für eine Inventarisierung einheimischer Salmonidenpopulationen, auf deren Grundlage die Überwachung des Einflusses von Neozoen, einschließlich transgener Fische möglich ist.

1.2 Planung und Verlauf des Vorhabens (Abb. 1)

1.2.1 Lokalisierung verschieden stark besetzter Populationen und Probennahme

Ursprünglich sollten etwa 20 bis 30 Populationen der Bachforelle mit je 30 bis 50 Individuen, 5 bis 6 Populationen des alpinen Seesaiblings mit 20 bis 30 Individuen, und 3 Populationen des Huchens mit 20 bis 30 Individuen in die Analyse eingehen. Aus statistischen Gründen und wegen der schlechten Verfügbarkeit des Huchens wurde in Absprache mit dem Auftraggeber das Programm jedoch so verändert und beträchtliche erweitert, daß insgesamt knapp 52 Populationen der Bachforelle mit insgesamt fast 1450 Individuen, 10 Populationen des alpinen Seesaiblings mit ca. 300 Individuen und ca. 400 Individuen der Mühlkoppe aus 46 Populationen bearbeitet wurden.

1.2.2 Populationsökologische Charakterisierung der befischten Fließgewässer mit besonderer Berücksichtigung des Besatzeinflusses

Zu diesem Zweck sollten in einem einfachen Verfahren für alle befischten Bäche ein modifizierter „Index of Biotic Integrity“ (Karr et al. 1986) erstellt werden. Ursprünglich wurde angenommen, daß dieses Verfahren leicht auf Forellenbäche angewendet werden könnte. Es stellte sich jedoch heraus, daß eine Modifizierung von Karr's Index nicht ohne eine Validierung mit befischungsunabhängigen Daten möglich ist. Dieser beträchtliche Mehraufwand wurde unternommen, so daß ein über das vorliegende Projektziel hinaus wichtiger Beitrag zur Evaluierung kleiner Fließgewässer geleistet werden konnte. Der erstellte „Forellenbachindex“ konnte dann in die Gesamtanalyse des Besatzeinflusses eingebracht werden. Ursprünglich sollte er nicht nur dazu dienen, den direkten Einfluß konspezifisch-neozooischer Elemente auf die genetische Diversität der Ursprungspopulation zu messen, sondern auch den Einfluß anderer Neozoen (z.B. Regenbogenforelle, Bachsaibling, Aal im Donauinzug) auf den Gesamtzustand der autochthonen Populationen zu messen. Wegen der extrem geringen Dichte dieser Fischarten in

den beprobten Gewässern wurde dieser Aspekt zugunsten der wichtigeren intra-spezifischen Introgressionsfrage verändert in das Gesamtkonzept des Vorhabens eingebracht.

1.2.3 Analyse des Bachforellenmaterials auf Färbungsvariabilität

Von allen beprobten Forellen wurden Photos erstellt, eingescannt und auf CD gebrannt. Anschließend wurde wichtige Färbungsmerkmale am Computerbildschirm mit der Software Photoshop ausgezählt und beschrieben. Wegen der extremen genetischen Datenfülle und aufwendigen Analyse, und vor allem, weil sich trotz anfänglich guter Erfolgsaussichten für das Teilvorhaben dieses als wenig vielversprechend zeigte (die Bepunktung und Färbung der Bachforellen war zu stark größenabhängig), wurde es zurückgestellt.

1.2.4 Beibringung von Vergleichsmaterial aus Fischzuchten

Für die Phase der Etablierung der genetischen Methoden wurden Nachzuchttiere der Bachforelle und des Seesaiblings aus der Fischerversuchsanlage Wielenbach verwendet. In die Gesamtanalyse gingen des weiteren noch zwischen 30 und 50 Bachforellen aus drei staatlichen Zuchtstationen ein.

1.2.5 Etablierung der molekularen Markersysteme

Zur Etablierung der molekularen Markersysteme waren umfangreiche Vorarbeiten notwendig. Für die Bachforelle mußten bereits existierende Mikrosatellitensysteme auf ihre Anwendbarkeit auf die lokalen Populationen überprüft werden. Dabei wurden etwa ein Dutzend Loci an einer Auswahl von Bachforellen getestet und schließlich 7 vorab als informativ befunden, von denen schließlich 5 wegen ihrer leichten technischen Anwendbarkeit in die Endanalyse miteingegangen sind. Weiter musste eine sinnvolle Strategie zur quantitativen Analyse von mitochondrialen Eigenschaften etabliert werden. Als Ergebnis dieser Vorarbeiten wurden von fast 1600 Tieren Restriktionslängen-Polymorphismen (RFLPs) mit diagnostischen Enzymen ausgewertet und mit Hilfe stichprobendartiger DNA-Sequenzierung evaluiert. Für die Seesaiblinge mussten neue Mikrosatelliten kloniert und evaluiert werden, und bereits bekannte an unser System adaptiert werden. Schließlich kamen 6 Loci zum Einsatz. Desgleichen mussten mitochondriale Sequenzregionen des Seesaiblings aufgespürt werden, die einen höheren Informationsgehalt als bereits publizierte Sequenzabschnitte aufwiesen. Es wurde schließlich für alle Tiere das 3'-Ende des mitochondrialen D-Loops als geeignet ausgewählt und sequenziert. Analog wurde das 5'-Ende des Mühlkopfen-D-Loops nach einer Evaluation des Informationsgehalts und der technischen Reproduzierbarkeit für eine quantitative Sequenzierung ausgewählt.

1.2.6 Populationsgenetische Analyse

Sowohl für mitochondriale, wie auch für Mikrosatelliten-Daten stand eine Auswahl populationsgenetischer Auswerteverfahren zur Verfügung, die den Grad der Inzucht (erwartete und geschätzte Heterozygotitäten), den Grad der Populationsdifferenzierung (F-Statistik) und die phylogenetischen Zusammenhänge zwischen den genetischen Daten errechnen können. Es wurden vor allem die Programme AMOVA, FSTAT, GENEPOP, ARLEQUIN, PAUP* und GENECLASS verwendet, deren Details im Methodenteil dargestellt sind. Vor allem das neue Programm GENECLASS erlaubte es, Aussagen über die phylogeographische Integrität von Populationen zu machen, deren Kenntnis eine wichtige Grundlage für die Beurteilung des Besatzeinflusses darstellt

1.2.7 Verwendung der Daten für die Abschätzung von Schadenswahrscheinlichkeiten im Zusammenhang mit der Verdrängung von autochthonen Populationen durch Neozoen

Die erhobenen Daten sollten im Fall der Bachforelle (1) dazu verwendet werden, den Besatzeinfluß unabhängig von anderen erhobenen Umweltdaten und anthropogenen Einflüssen allgemein zu quantifizieren. Dazu wurde das neu in diesem Feld anwendbare Programm CANOCO nach einer Einarbeitungsphase erfolgreich verwendet (siehe Methodenteil) und erfolgreich ein Zusammenhang zwischen Besatzeinfluß und Zerstörung phylogeographischer Integrität autochthoner Bachforellenpopulationen untersucht. Die auf unseren Daten basierende Quantifizierung des negativen Besatzeinflusses kann theoretisch dazu verwendet werden, eine Risikoabschätzung von gezielten Besatzmaßnahmen vorzunehmen. Weiterhin (2) sollten die gefunden Erkenntnisse zur natürlichen genetischen Biodiversität der Bachforelle, des Seesailbings und der Mühlkoppe in Bayern dazu dienen, abzuschätzen, welcher regionalspezifische Verlust (Schaden) an genetischer Diversität in Bayern und Deutschland zu erwarten ist, falls er durch Besatzeinfluß oder auch gewollte oder ungewollte Introgression transgener Genmaterials in natürliche Populationen verloren gehen sollte. Entsprechend sollten auf der Basis der erhobenen genetischen Daten evolutionär signifikante Einheiten (ESU = Evolutionary Significant Units) dargestellt werden, die in weitergehenden Arbeiten auf ihren Naturschutzwert und ihre Klassifizierung als operationelle Naturschutzeinheiten (OCU's = Operational Conservation Unit) überprüft werden können. Entsprechender Forschungsbedarf sollte skizziert werden. Damit sollte es möglich sein, detaillierte Schadensabschätzungen bei der zukünftigen Einbringung von Neozoen und/oder transgenen Organismen zu erstellen.

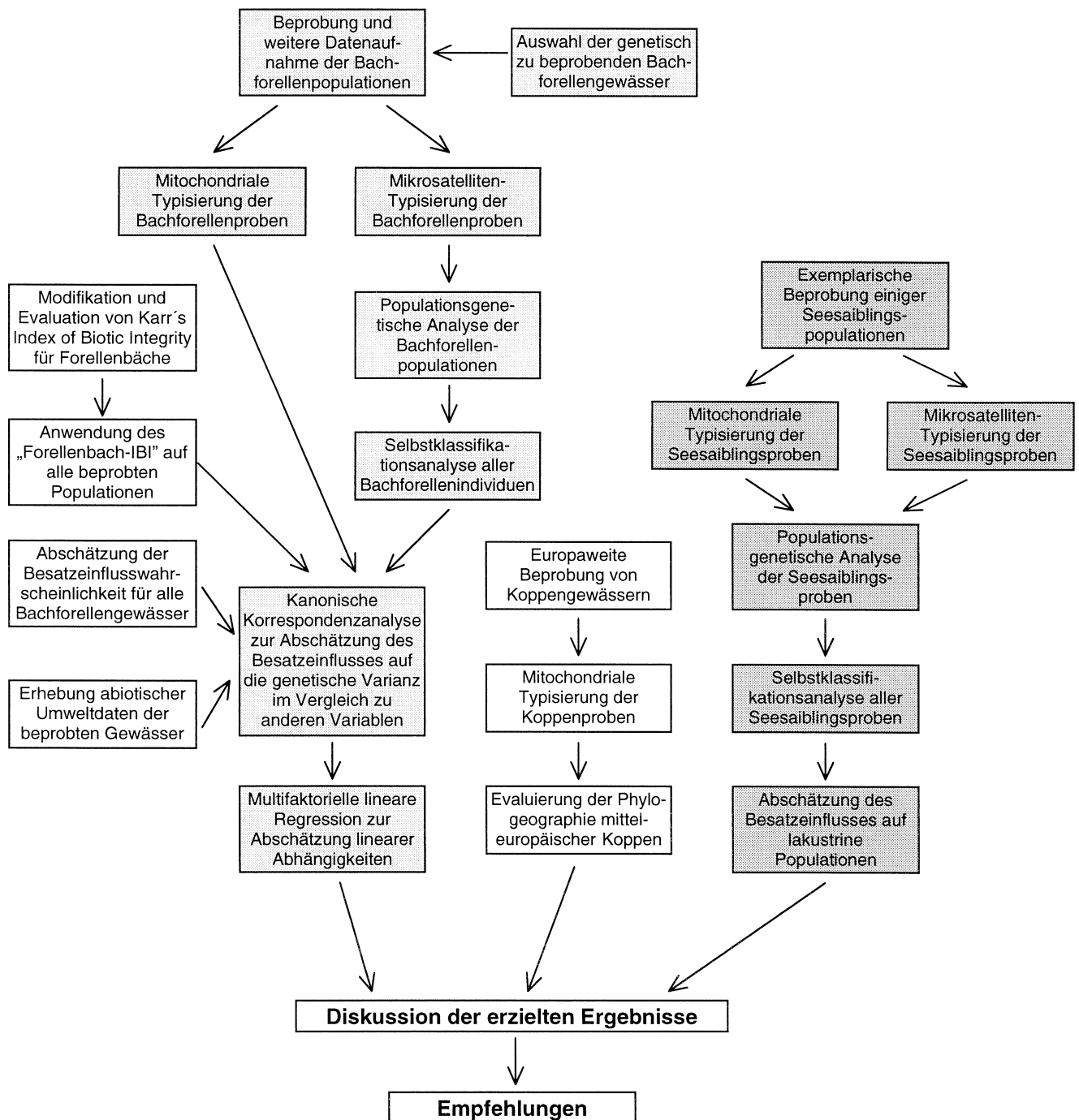


Abb. 1: Diagramm zum Ablauf des durchgeführten Vorhabens. Es soll darstellen, auf welche Art die verschiedenen einzelnen Teile zum Ziel des Vorhabens beigetragen haben.

1.3 Stand der Forschung

1.3.1 Grundlagen

1.3.1.1 Die Neozoen-Problematik auf innerartlicher Ebene

Neozoen können sowohl als ökologische wie auch als genetische Faktoren in Ökosystemen wirken. Im ersteren Fall können sie Schäden durch Ressourcennutzung verursachen, die auf Kosten der artfremden einheimischen Fauna gehen. Im zweiten Fall können sie Schäden durch Einkreuzen gebietsfremden Genmaterials verursachen. Diese Einführung befasst sich mit letzterer Problematik. Es sollen die genetischen Konsequenzen diskutiert werden, die neozoische Einflüsse auf Ökosysteme haben können. Weiterhin werden auch die Randbedingungen diskutiert, die den Grad dieser genetischen Einflüsse im Ökosystem theoretisch mitbestimmen können.

Neozoen können einen mehr oder weniger starken Einfluß auf die genetische Integrität einer autochthonen Population nehmen, je nachdem wie stark die genetischen Effekte der Hybridisation zwischen den beiden Formen sind. In erster Linie hängen diese Effekte von der Fertilität der Hybriden ab. Genetische Effekte, die den autochthonen Genpool *direkt* verändern können, entstehen, wenn die Hybride zumindest schwach fertil sind. Die stärksten Auswirkungen sind zu erwarten, wenn aus den Kreuzungen hochfertile Hybride entstehen. Keine *direkten* genetischen Effekte sind zu erwarten, wenn es zu keiner ökologischen oder reproduktionsbiologischen Interaktion zwischen den zwei Populationen kommt, wenn also keine sichtbaren Hybride zu finden sind, oder die Hybride steril sind. Erst in zweiter Linie können *indirekte* ökologische Effekte eines Neozoons Einfluß auf die genetische Zusammensetzung einer Ursprungspopulation haben. Der ökologische Einfluß eines Neozoons kann nämlich ein verändertes Selektionsregime für die autochthone Population bedingen, wodurch bestimmte Genotypen des ursprünglichen Genpools anders selektioniert werden, als vor der Einführung des Neozoons. Dieser Zusammenhang soll, kann an dieser Stelle aber nicht vertieft werden, weil er im Rahmen des Projekts auch nicht untersucht werden konnte.

Individuen zweier verschiedener Populationen sind nur dann in der Lage, fertile Hybride zu erzeugen, wenn deren gemeinsame evolutive Geschichte nicht allzu fern zurückliegt. Nur dann ist die Wahrscheinlichkeit hoch genug, daß ihre Genome noch soweit miteinander kompatibel sind, daß die Vitalität der Hybride noch nicht eingeschränkt ist. Auf systematischer Ebene werden solche nahe verwandten Populationen als nahe verwandte Arten, Unterarten, „Rassen“ oder „Standortvarianten“ bezeichnet. In manchen Fällen sind aber auch fertile Kreuzungen zwischen Mitgliedern verschiedener Gattungen beobachtet worden. Die evolutive Entstehung von Infertilität zwischen Organismen, sogenannte postzygotische Isolation, ist im wesentlichen als

Zufallsprozeß zu verstehen. Wenn Populationen sich getrennt haben, werden sich in jeder Einzelpopulation Mutationen ansammeln, die irgendwann dazu führen, daß die betreffenden Genome nicht mehr kompatibel sind. Dies wird in der Regel ein Prozeß sein, der sich über mehrere tausend Generationen hinzieht, also vergleichsweise langsam ist. Artbildung und ökologische Anpassung kann hingegen viel schneller von statten gehen. Es ist also davon auszugehen, daß es zu jedem Zeitpunkt viele im Prinzip gut differenzierte Arten oder Populationen gibt, die noch die prinzipielle Kapazität einer Hybridisierungsfähigkeit besitzen und die damit in den Rahmen der hier diskutierten Problematik fallen.

1.3.1.2 Ursprung der genetischen Biodiversität

Neue organismische Formen können auf verschiedene Art entstanden sein. Das ist im gegebenen Zusammenhang deshalb interessant, weil die Entstehungsgeschichte zweier Formen Voraussagen darüber zuläßt, unter welchen Bedingungen es wie stark zur Hybridisation kommen kann. Man unterscheidet hierbei allopatrische, parapatrische und sympatrische Differenzierung. In Deutschland, dessen organismische Vielfalt vor allem durch eiszeitliche und nacheiszeitliche Neubesiedlungen geprägt ist, spielen alle drei Entstehungsarten für die Evolution rezenter autochthoner Populationen eine Rolle.

Gegenwärtig geht man davon aus, daß die meisten Formen *allopatrisch* entstehen. Geographische Effekte, wie z.B. die Eiszeit-Zyklen, bewirken die physische und damit genetische Trennung von Populationen, die ursprünglich einer einzigen angehörten. Durch Zufallseffekte und Selektion unter unterschiedlichen ökologischen Bedingungen erwerben diese Populationen jeweils eigene genetische und auch phänotypische Merkmale. Bei sekundärem Kontakt kann es zur Ausbildung von stabilen Hybridzonen zwischen diesen Arten kommen. Ein Beispiel stellen die verschiedenen genetisch und morphologisch distinkten Saiblingspopulationen (*Salvelinus umbla*) der verschiedenen Voralpenseen dar. Diese sind postglazial allopatrisch entstanden, können sich aber in vielen Seen nach Mischbesatz intensiv wieder vermischen.

In einigen Fällen spielt aber auch *parapatrische* Auftrennung von Populationen entlang eines Selektionsgradienten eine Rolle. Am einen Ende eines Verbreitungsgebietes herrschen z.B. andere ökologische Bedingungen als am anderen Ende, so daß sich unterschiedlich angepasste und als eigenständig identifizierbare Populationen ausbilden. Ein Beispiel dafür sind die beiden Forellenarten aus Norditalien, die Marmorata-Forelle (*Salmo marmorata*) und die mediterrane Bachforelle (*S. trutta*). Während die großwüchsige Marmorata ursprünglich in größeren Fließgewässern beheimatet war, beschränkt sich das Vorkommen der Bachforelle auf kleinere Fließgewässer der gleichen Flußsysteme. Sie haben sich dort vor etwa 3 Millionen Jahren zu zwei ökologisch unterschiedlichen, parapatrischen Arten entwickelt, ohne daß es zu einer starken

Hybridisierung kommen würde, einfach weil sie im wesentlichen unterschiedliche Habitats besiedeln (Giuffra et al. 1996).

Schließlich ist denkbar daß Formenpaare auch durch *sympatrische* Differenzierung entstehen. Diese leben während ihrer Entstehungsgeschichte im gleichen geographisch abgegrenzten Lebensraum, wobei sie aber evolutiv Barrieren zueinander ausgebildet haben, die dazu führen, daß es keinen nennenswerten Genfluß mehr zwischen ihnen gibt. Zu dieser Gruppe gehören mit Sicherheit einige sympatrische Seesaiblingsformen, die unterschiedliche ökologische Nischen im gleichen See besetzen, in dem sie sich aus einer Form sympatrisch entwickelt haben.

Die Entstehungsgeschichte eines Formenpaars ist essentiell für die Abschätzung der Wahrscheinlichkeit einer Hybridisierung. Allopatrisch entstandene Formen entwickeln keine spezifischen Isolationsmechanismen gegenüber ihrer Schwesterart (sogenannte präzygotische Isolation), einfach weil sie nicht mit ihr in Kontakt kommen. Wenn es dann zu sekundärem Kontakt kommt, ist eine Hybridisierung sehr wahrscheinlich. Nur bei solchen Arten die bereits so lange getrennt sind, daß postzygotische Mechanismen greifen, kommt es nicht zur Hybridisierung. Die Situation ist völlig anders bei sympatrisch entstandenen Formenpaaren. Diese müssen effektive präzygotische Isolationsmechanismen evolviert haben, da sie sonst gar keine Möglichkeit der genetisch-ökologischen Einnischung gehabt hätten. Entsprechend findet dann auch so gut wie keine Hybridisierung statt, obwohl keine postzygotische Isolation vorliegt. Solche Formenpaare sind nur stabil, wenn sich auch die ökologischen Randbedingungen unter denen sie entstanden sind nicht verändern. Zum Beispiel wurde für Cichliden im Viktoriasee gezeigt, daß die präzygotische Isolation vor allem auf Grund der Erkennung unterschiedlicher Färbungsmuster basiert. Mit der Verschmutzung des Sees waren diese Muster für die Tiere nicht mehr eindeutig erkennbar und es kam zu einer Hybridisierung vieler bis dahin distinkter Arten.

1.3.1.3 Merkmale autochthoner genetischer Biodiversität und Integrität

Die Populationsgenetik beschreibt die genetische Vielfalt eigenständiger und stabiler Populationen durch die Anzahl, Kopplung und allelische Vielfalt ihrer Gene, die in einer Auswahl in jedem Individuum dieser Population repräsentiert sind. In einer modellhaft idealen Population stehen je nach Populationsstruktur alle Kopplungsgruppen von Genen und deren Allele in einem Gleichgewicht, dessen Ausprägung sich nur durch Evolutionsprozesse wie Selektion, Mutation und genetische Drift ändert. Ein bekanntes Modellgleichgewicht ist zum Beispiel das „Hardy-Weinberg-Gleichgewicht“, das sich in unstrukturierten Populationen für eine definierte Anzahl von Allelen eines Gens, deren selektionierte Eigenschaften sich nicht voneinander unterscheiden, einstellt. Auf mathematische Weise lassen sich mit Hilfe dieser Modellvorstellungen ungestörte Populationen beschreiben, bzw. deren genetische Biodiversität auf Abweichung von

diesen Modellvorstellungen testen. Gut verstanden und intensiv modelliert sind die auf Zufallseffekten basierenden Verschiebungen von Allelfrequenzen neutraler Loci, die in strukturierten Populationen auftreten. Auf der Analyse solcher neutraler Marker basiert die Identifizierung von genetisch getrennten Populationen, wobei es insbesondere oft auch möglich ist einen Zeitmaßstab anzugeben, also sagen zu können wie lange eine Trennung der Populationen her ist.

Die genetische Vielfalt voneinander differenzierter Populationen kann phänotypisch auf verschiedene Weise in Erscheinung treten. Einige unterscheiden sich durch lokale Adaptationen voneinander, die die ökologischen Besonderheiten ihrer Heimatregion widerspiegeln. Andere unterscheiden sich in ökologisch oft unbedeutenden, nur durch genetische Drift oder sogenannte „sexuelle Selektion“ entstandene Merkmale voneinander. Für den Menschen leicht erkennbar sind zum Beispiel die unterschiedlichen Zeichnungsmuster verschiedener Populationen oder nahe verwandter Arten. Generell gilt aber, daß die phänotypische Differenzierung von Populationen kein verlässliches Kriterium für eine Abschätzung der Zeitmaßstäbe darstellt, also keine Aussage darüber liefern, wie lange die Populationen bereits getrennt sind. Phänotypisch erkennbare Unterschiede können sich sehr schnell ausbilden (z.B. in wenigen dutzend Generationen), können aber auch trotz lang andauernder Trennung der Populationen nahezu ganz fehlen. Nur die molekulare Analyse kann hier eine verlässliche Abschätzung liefern.

1.3.1.4 Introgressive Hybridisation und ihre Folgen

Durch Hybridisation zweier Formen, die fertile Nachkommen erzeugen können, kann es zur permanenten Inkorporierung formfremden genetischen Materials in den eigenen Genpool kommen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Introgression. Alle genetischen Konsequenzen, die durch Einbringung von Neozoen in die heimische Fauna entstehen, beruhen auf den Konsequenzen dieser introgressiven Hybridisation. Aber auch natürlicherweise kann es zu Introgression kommen, zum Beispiel an einer gemeinsamen Verbreitungsgrenze zweier Taxa. Es lassen sich verschiedene Aspekte genetischer Introgression in autochthone Genpools beschreiben, die die biologische Grundlage für den Regelungsbedarf im Umgang mit Neozoen bilden. Diese Aspekte gelten auch für transgene Organismen, die als anthropogen erzeugte „Neozoen“ angesprochen werden können. Diese lassen sich neutral ausgedrückt auch als Populationen charakterisieren, die zwar einzelne Gene tragen, die neu für die autochthonen Populationen sind, ansonsten aber genetisch verarmt sind, weil sie auf Linien zurückgehen, die auf nur wenigen Elterntieren beruhen.

Mit genetischer Introgression verändert sich die autochthone genetische Integrität unwiederbringlich, weil durch die Hybridisation nicht nur einzelne Gene in den ursprünglichen Genpool gelangen, sondern ganze Genome fremder Populationen. Selbst wenn sich gegenselektionierte

Allele einzelner Gene nicht in der autochthonen Population halten können, bleiben zumindest selektionsneutrale Allele langfristig erhalten. In allopatrisch differenzierten Populationen, deren genetische Integrität im Laufe eines geographisch determinierten Differenzierungsprozesses entstanden ist, spricht man vom Verlust der phylogeographischen Integrität einer Population. Dadurch ist die genetische Grundausstattung der Population verändert, und damit auch die genetische Grundlage, auf der kurzfristig wirkende Evolutionsprozesse angreifen können, z.B. um flexibel auf sich schnell verändernde Umweltsituationen zu reagieren. Aus genetischer Sicht führt Introgression zum Aussterben der ursprünglichen Form in einem gegebenen Areal.

Beispiel: Alle freilebenden Populationen einer in einigen wenigen Quellen endemischen Art Zahnkarpfen in den USA (*Cyprinodon bovinus*) sind wegen Besatz mit einer weit verbreiteten, nahe verwandten Küstenart (*Cyprinodon variegatus*) mit einer Introgressionsrate von etwa 10% (4 getestete Loci, zwischen 6 bis 15%) verfälscht. Da die Hybriden nicht ohne weiteres phänotypisch zu erkennen sind, besteht keine effiziente Möglichkeit nachträglich einzugreifen. Die einzige reinerbige Population ist eine Gefangenschaftspopulation.

Die genetischen Effekte der Introgression können sehr unterschiedlich sein, je nachdem wie stark diese ist und wie die beiden hybridisierenden Populationen genetisch konstituiert sind. Die Effekte reichen von kaum meßbaren Allelfrequenzveränderungen über die Entstehung von Mischpopulationen mit intermediären Allelfrequenzen („Hybridschwärme“) bis hin zu fast völligen Verdrängen der autochthonen genetischen Merkmale.

Beispiel: Die genetische Integrität der in einigen kalifornischen Gewässern endemischen Apache-Forelle (*Oncorhynchus apache*) ist durch den jahrelangen Besatz mit Regenbogenforellen (*O. mykiss*) und der Cutthroat-Forelle (*O. clarki*) extrem stark gefährdet. Allerdings gibt es große Unterschiede im Grad der genetischen Introgression. Von 31 untersuchten Populationen wurden 11 entdeckt, die keine Hybridisationseffekte zeigten, 20 waren dagegen genetisch mehr oder weniger stark verändert, darunter auch solche, bei denen bei der Probennahme keine allochthonen Forellen entdeckt wurden. Zwei dieser Hybridpopulationen bestanden ausschließlich aus Hybriden. Die Ursachen für die unterschiedlichen Introgressionsraten lassen sich heute nicht mehr genau rekonstruieren, wahrscheinlich sind sie aber vielfältig.

Es kann sowohl zu einer Verarmung, als auch zu einer Heterogenisierung der genetischen Vielfalt kommen. Diese Effekte müssen aber nicht unbedingt negativ zu bewerten sein. Es sind viele Beispiele für die Entstehung neuer Formen und Arten durch Hybridisation bekannt. Zum Beispiel ist die endemische Gardaseeforelle, der Carpione (*Salmo carpio*) das lakustrine Kreuzungsprodukt der zwei mediterranen Forellenarten *S. marmorata* und *S. trutta f. fario*.

(Giuffra et al. 1996). Oft führt die Introgression aber zu negativen Konsequenzen, z.B. durch Veränderung koadaptierter Genkomplexe („outbreeding depression“). In abgeschlossenen, bereits langfristig stabilen Populationen befinden sich die verschiedenen Allele in einem koadaptiven Gleichgewicht, das durch die Introgression neuer Allele zerstört werden kann. Die Introgression einzelner maladaptiver Merkmale kann im Extremfall sogar zum Aussterben der Art führen.

Außer bei introgressionsbedingten Aussterbeereignissen, werden sich die genetisch neu konstituierten Mischpopulationen durch natürliche Selektion in relativ kurzer Zeit an die gegebenen Umweltverhältnisse anpassen. Obwohl die genetische Integrität der einheimischen Population zerstört ist, kann sich die neue Population bei unveränderten Umweltbedingungen ökophänotypisch der alten Population annähern. Genetische Introgression muß also nicht automatisch negativ zu bewerten sein. Natürliche Introgressionsprozesse haben sogar mit Sicherheit einen großen Beitrag für die Entstehung der heutigen Biodiversität bedeutet. Eine phänotypische Annäherung wird sich allerdings nicht bei Merkmalen einstellen, die keiner natürlichen Selektion unterliegen, z.B. bei populationsspezifischen Farbmustern.

1.3.1.5 Determinanten der Introgressionsintensität

Wie stark die Folgen introgressiver Hybridisation sind, hängt von der Stärke der Introgression ab. Für diese Stärke sind vor allem drei Faktoren ausschlaggebend:

1. Die ökologisch kompetitive Kraft neozoischer Individuen und neozoischen Genmaterials in der für diese neuen Umwelt relativ zu den autochthonen Individuen ist bestimmend für deren Überlebenswahrscheinlichkeit. Letztere sinkt, je besser die autochthone Population relativ zur neozoischen an die spezifischen Umweltbedingungen angepasst ist. Besonders bedeutsam ist dieser Aspekt für anthropogen veränderte Lebensräume, da in diesen oft auch die einheimischen Fauna und Flora am Rande ihrer ökologischen Kompetenz existiert.

2. Die numerischen Verhältnisse zwischen autochthonen und neozoischen Individuen. Je mehr sich das Verhältnis auf die Seite der Neozoen verschiebt, desto stärker wird die Introgression sein, auch wenn die kompetitive Kraft der Neozoen schlechter ist. Besonders bei Mangel an Paarungspartnern innerhalb der einen Population ist dann die Hybridisierungswahrscheinlichkeit höher. Dieser Punkt ist besonders relevant für solche Populationen, die gezielt mit neozooischen Tieren besetzt werden.

3. Auch ökologisch schlecht angepasste neozoische Individuen können eine höhere Paarungswahrscheinlichkeit mit autochthonen Individuen besitzen, wenn sie über Merkmale verfügen, die

bei der Partnerwahl attraktiver als die einheimischen Merkmale sind. Die Nachkommen sind dann zwar schlecht angepasst, aber können numerisch die autochthonen Nachkommen überflügeln, wenn der allochthone Auslöser sehr viel effektiver ist. Solche „Superauslösertiere“ werden zum Beispiel experimentell in der Schädlingsbekämpfung genutzt, ähnliche Szenarien sind aber auch für natürliche Populationen denkbar.

1.3.2 Die Bachforellenpopulationen (*Salmo trutta*) in Bayern als Modellsystem zur Untersuchung des Besatzeinflusses in Fließgewässern

1.3.2.1 Zur systematischen Einordnung der Bachforelle

Bezüglich der systematisch-taxonomisch richtigen Benennung der Bachforelle herrscht zur Zeit eine beträchtliche Konfusion, die sich aus der Vielfalt der morphologisch und genetisch unterschiedlichen Phänotypen herleitet (Kottelat 1997). Einige Wissenschaftler sind der Meinung, daß viele dieser Phänotypen Artstatus erhalten sollten, wobei bereits 57 verschiedene Artnamen seit dem Beginn der modernen Taxonomie im mittleren 18. Jahrhundert für die verschiedenen eurasischen Bachforellenformen vorgeschlagen wurden. Andere sehen die Bachforelle als eine einzige Art mit mehreren Unterarten an (z.B. Lelek 1987). Einige Klassifikationen basieren auf kleinen morphologischen und ökologischen Unterschieden, die eventuell auch phänotypische Plastizität reflektieren (Bernatchez et al. 1992). So können manchmal bei der Bachforelle bestimmte morphologische und ökologische Merkmale nicht zur Artdiagnose verwendet werden, die bei anderen Arten Verwendung finden. Besonders verworren wird die Diskussion dadurch, daß sich besonders in Mitteleuropa über lange Zeit kaum Ichthyologen mit der Systematik der Bachforelle beschäftigt haben, und dadurch das Feld Fischereibiologen überlassen haben, die oftmals nicht über ein systematisch-taxonomisches Hintergrundwissen verfügen. Obwohl sich inzwischen die Situation geändert hat und wissenschaftliche Arbeiten zu diesem Thema laufen, sind diese aber noch nicht am Ende und die Ergebnisse noch nicht verfügbar. Entsprechend werden alle in Bayern untersuchten Bachforellenstämme in diesem Bericht zusammenfassend als *Salmo trutta* bezeichnet, wobei wir uns an der Praxis der rezenten Arbeit von Kottelat (1997) zur Systematik der europäischen Süßwasserfische orientieren, die gleichzeitig herausstellt, daß das die im Taxon *Salmo trutta* vereinigten Phäna mit hoher Wahrscheinlichkeit in verschiedene Arten zerfallen werden. Dabei werden die im folgenden dargestellten bereits publizierten Ergebnisse zur genetischen Diversität mit Sicherheit eine Rolle spielen.

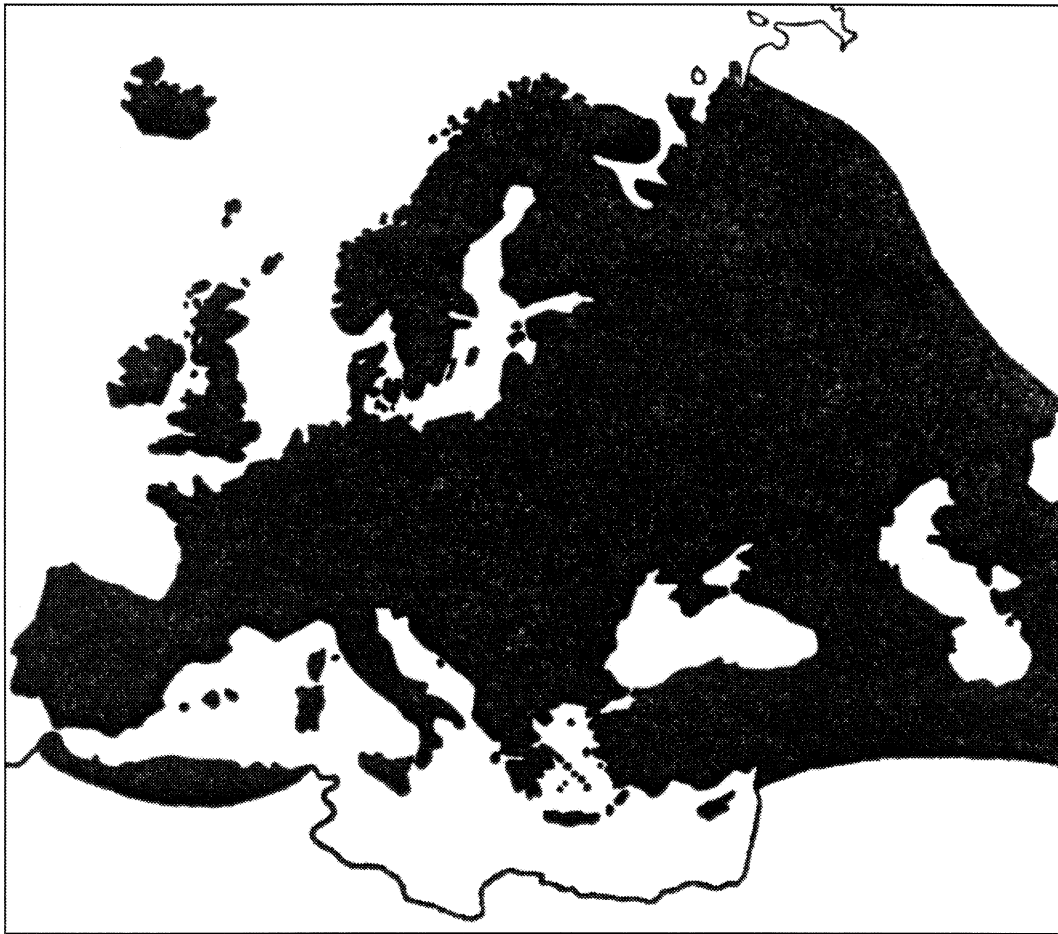


Abb. 2: Ursprüngliche Verbreitung der Bachforelle in Europa, Afrika und Asien (aus Ladiges & Vogt 1979). Die östlichste Verbreitung reicht noch weiter als in der Abbildung bis in den caspiaralischen Raum hinein. Aus diesem natürlichen Verbreitungsgebiet sind 57 Bachforellentaxa aus dem Formenkreis *Salmo trutta* beschrieben worden, deren Systematik und Taxonomie zur Zeit noch nicht auf einen modernen Stand gebracht worden ist.

1.3.2.2 Ursprüngliche genetische Diversität der Bachforelle in Europa und Bayern

Betrachtet man die genetische Diversität der Bachforelle im gesamten Verbreitungsgebiet in Europa (Abb. 2), so konnten im Rahmen molekularer Studien mindestens fünf evolutionäre Linien identifiziert werden (z.B. Bernatchez et al. 1992; Giuffra et al. 1994, 1996; Bernatchez & Osinov 1995; Garcia-Marin & Pla 1996; Largiader & Scholl 1996; Antunes et al. 1999). Diese Linien sind nach Ergebnissen mitochondrialer DNA-Analyse (Bernatchez 1995) die „atlantische“ Linie, die „danubische“ Linie, die „mediterrane“ Linie, die „adriatische“ Linie und die „marmorata“-Linie. In Mitteleuropa, und damit im Bereich der in diesem Projekt untersuchten

Gewässer treten natürlicherweise nur die „atlantische“ und die „danubische“ Linie auf. Auf die drei anderen Linien wird deshalb nicht weiter eingegangen.

Im nördlichen Verbreitungsbereich von Island und Norwegen über den Norden Spaniens bis nach Marokko und auch im Bereich des Baltikums und Nordwestrusslands dominiert die sogenannte „atlantische Linie“, wobei die spanischen und südlicheren Populationen sich deutlich von den nördlichen unterscheiden (Moran et al. 1995; Antunes et al. 1999; Bouza et al. 1999; García-Marín et al. 1999; Weiss et al. 2000). Der nördliche Teil der atlantischen Region war in der letzten Eiszeit eisbedeckt, weshalb viele rezent Populationen mit Sicherheit erst seit 10000 bis 18000 Jahren existieren. Allerdings werden neben immer eisfrei gebliebenen Refugien in Frankreich, Spanien und Nordafrika auch weitere diskutiert. Mehrere Studien machen nämlich wahrscheinlich, daß die Situation in diesem Areal komplexer ist als bisher angenommen (Ferguson & Fleming 1983; Hamilton et al. 1989; Hynes et al. 1996; García-Marín et al. 1999), weil es in diesem Bereich zu postglazialen Rekolonisationsereignissen aus verschiedenen pleistozänen Refugien gekommen sein könnte, wobei einzelne Linien bisher nicht eindeutig identifizierbar sind. Dennoch erscheint im Moment eine Rekolonisation mit Linien aus dem zentralen und östlichen Europa am wahrscheinlichsten (Weiss et al. 2000). Leider liegen aus dem zentralen Mitteleuropa mit Deutschland und Österreich bisher keine verwertbaren veröffentlichten Ergebnisse vor.

Im östlichen Bereich dominieren die „danubischen“ Linien, wobei im Vergleich zum gesamten Verbreitungsgebiet (50%-Anteil) relativ wenige Studien an östlichen Populationen gemacht wurden (Bernatchez et al. 1992, Bernatchez & Osinov 1995, Largiadèr & Scholl 1995, Riffel et al. 1995, Osinov & Bernatchez 1996).

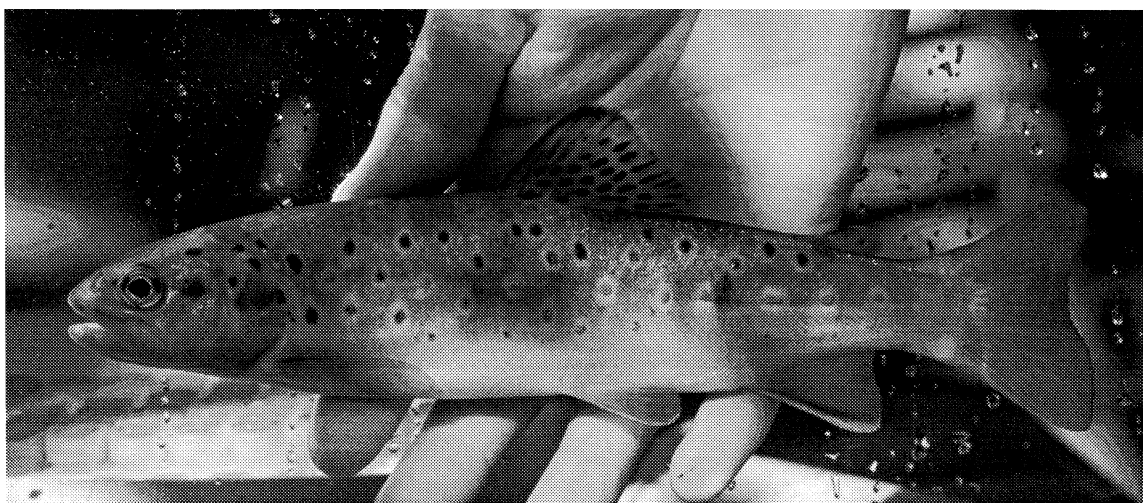


Abb. 3: Bachforelle (*Salmo trutta*) aus der Großen Ohe (Nationalpark Bayerischer Wald).

Auf die Ergebnisse soll nur eingegangen werden, solange sie den westliche Einzugsbereich, in dem die in diesem Projekt gesammelten Gebiete liegen, betroffen sind, weil sich der östlichere Bereich deutlich von dem westlichen danubischen Bereich unterscheidet und keine der dort gefundenen Linien bei uns gefunden wurden. Die meisten Donau-Populationen in der unteren und mittleren Donau bis auf die Höhe des ehemaligen Jugoslawien waren durch mitochondriale „danubische“ Haplotypen gekennzeichnet; allerdings hatten einige wenige Gewässer auch wenige „atlantische“ Individuen (z.B. der einzige mitochondrial typisierte Bach in Deutschland (Bernatchez et al. 1992), und eine Population in der oberen Wolga (Osinov & Bernatchez 1996)). In beiden Fällen war es aber nicht möglich, herauszufinden ob dieser Einfluß durch Besatz oder natürliche Introgression zustande kam. Allerdings wiesen bereits Enzymstudien u.a. aus oberen Zuflüssen der badenwürttembergischen Donau darauf hin, daß es im Oberlauf von Donauzuflüssen zu natürlichem Kontakt zwischen „atlantischen“ und „danubischen“ Flußsystemen gekommen sein könnte, was auch zu introgressiver Hybridisierung geführt haben könnte (Bernatchez & Osinov 1995, Largiadèr & Scholl 1995, Riffel et al. 1995, Osinov & Bernatchez 1996). Laikre (1999) weist jedoch darauf hin, daß weitere Studien in diesem Bereich dringend notwendig sind, um die Frage nach dem natürlichen oder anthropogenen Ursprung dieser „atlantischen“ Linien im oberen Donaubereich zu klären, „weil sie eine Voraussetzung für ein nachhaltiges Management der natürlichen genetischen Ressourcen der Bachforelle in mehreren europäischen Ländern (z.B. Österreich, Deutschland und der Schweiz) sind“ (Übersetzung: Schliewen).

Unabhängig von den fünf großen Linien, konnte auf der lokaleren Ebene gezeigt werden, daß es innerhalb verschiedener Strom-, Fluß- und Bachsysteme und sogar innerhalb eines Bachs auf unterschiedlichen Laichplätzen zu einer genetischen Differenzierung kommen kann (z.B. Ryman et al. 1979; Ryman 1983; Crozier & Ferguson 1986; Ferguson & Taggart 1991; Apostolidis et al. 1997; Estoup et al. 1998, Hansen & Mensberg 1998). Diese Differenzierung geht wahrscheinlich einerseits auf die Tendenz der Bachforellen zurück, zum Abblachen an ihren Heimatort zurückzukehren, und andererseits auf die Tatsache, daß Migrationsbarrieren auch innerhalb von Gewässern existieren.

1.3.2.3 Der Einfluss von Besatzmaßnahmen auf Bachforellenpopulationen

In Besatzanalysen wurden verschiedentlich versucht zu evaluieren, ob der Besatz erfolgreich war oder nicht. Allerdings sind die Ergebnisse nicht immer einfach und klar zu bewerten, weil die Beobachtungen und Experimente entweder nur über wenige Jahre durchgeführt wurden, oder aber über die Besatzgeschichte der einzelnen Populationen relativ wenig bekannt ist. Die Analysen führten zum Teil zu widersprüchlichen Ergebnissen, weshalb an dieser Stelle auf einige dieser Experimente und Beobachtungen, die in Fließgewässern stattgefunden haben und

deshalb vergleichbar mit unseren beprobten Gewässern sind, exemplarisch eingegangen werden soll. Wir orientieren uns hier an der Übersicht von Laikre (1999).

Mehrere Ergebnisse zeigen, daß Besatz mit allochthonen Forellen zu mehr oder weniger starken genetischen Introgression führen kann. So untersuchten Largiader & Scholl (1996) Populationen im Doubs, einem Zufluß der oberen Rhone. Die phänotypisch und genetisch unterscheidbaren autochthonen Populationen der „mediterranen“ Linie wurden dort mit „atlantischen“ Bachforellen besetzt. Sie konnten anhand von Allozym-Markern zeigen, daß ein gewisser Anteil „atlantischer“ Allele in die Population Einzug gehalten hatte. Dennoch gab es Beobachtungen, daß es auch zu sortengleicher Paarung zwischen besetzten und autochthonen Bachforellen kommt. Poteaux et al. (1998) berichten über Zuchtforellen „atlantischen“ Ursprungs, die in französische Gewässer mediterranen Ursprungs gesetzt wurden. Der Besatzeinfluß wurde über Allozyme und mitochondriale Marker beurteilt, wobei es so schien, daß der genetische Beitrag der Zuchtforellen mit der Zeit abnahm, obwohl Vermischung der beiden Einheiten gezeigt werden konnte. Das Ergebnis wurde so interpretiert, daß es wohl Selektion gegen Zuchtforellen und ihre Brut im natürlichen Gewässer geben muss. Apostolidis et al. (1996, 1997) zeigten, daß in genetisch unterscheidbaren Populationen Griechenlands Besatz mit Forellen aus jeweils anderen Teilen des Landes wahrscheinlich bis zu 75% ausmachen kann.

Andere Beobachtungen deuten daraufhin, daß Besatz nur wenig oder gar keinen genetischen Einfluß auf die allochthonen Populationen haben kann. So werden in Spanien hauptsächlich genetisch unterscheidbare Bachforellen aus Nordeuropa besetzt. Fast alle untersuchten Populationen zeigten keine Anzeichen genetischer Introgression, wobei die Fälle von Introgression hauptsächlich aus schwach fließenden Gewässern stammten (Moran et al. 1991; Martinez et al. 1993; Garcia-Marin et al. 1999b). Hansen et al. (1995, 2000a) dagegen untersuchte den Besatzeffekt von Forellen im Karup-Fluß in Dänemark. Sowohl mit mitochondrialen als auch mit Mikrosatellitenmarkern konnte gezeigt werden, daß es nur zu minimaler genetischer Introgression kam. Allerdings sind die Zusammenhänge komplex, weil in diesem Flußsystem sowohl anadrome als auch residente Forellenpopulationen vorkommen (Hansen et al. 2000b). Introgression wurde hauptsächlich bei den residenten Bachforellen gefunden, aber nur wenig bei den anadromen Formen.

Auch aus Deutschland und Österreich – unserem Untersuchungsgebiet - liegen Ergebnisse aus Besatzexperimenten vor, die alle gezeigt haben, daß das Aussetzen von Bachforellen in solchen Bächen, in denen Bachforellen vorhanden sind und selbstständig reproduzieren, nahezu erfolglos ist, wenn man die Überlebens- und Überdauerungswahrscheinlichkeit der Besatzfische im besetzten Gewässerabschnitt als Maß nimmt (Klinger 1997, Weiss et al. 1999a, b). Leider wurde in keiner dieser Studien die allochthone genetische Introgression anhand von

genetischen Markern gemessen. Weiss et al. (1999b) fanden jedoch heraus, daß der Einfluß der dänischen Besatzfische auf die autochthonen österreichischen Fische je nach Gewässer (Kalkstein- oder Urgesteinsbäche) variieren kann.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Zusammenhänge, die zur genetischen Introgression nach Besatz führen oder nicht, wahrscheinlich sehr komplex sind. Mit Sicherheit gilt aber, daß für jede Region, jeden Gewässertyp, jeden Typ von allochthonen Forellen unterschiedlicher Herkunft und jede autochthone Population eigene Effekte zu berücksichtigen sind, die sich zusätzlich zu eventuell gültigen Gesetzmäßigkeiten ergeben, die sich z.B. aus der Anzahl und dem Alter des Besatzmaterials ergeben können (Garcia-Marin et al. 1999b). Demnach müssen die tatsächlichen Wahrscheinlichkeiten und damit verbundenen Risiken separat abgeschätzt werden, unabhängig davon, daß allgemeine Gesetzmäßigkeiten weiter experimentell erforscht werden sollten. Besonders wichtig erscheint im gegebenen Zusammenhang, daß langfristige und schwache Besatzeffekte auf die Introgression und eine eventuell schleichende Auflösung autochthoner genetischer Integrität in die Forschungsprogramme mit aufgenommen werden. Einen Anfang können die Ergebnisse des vorliegenden Projekts liefern.

1.3.3 Der alpine Seesaibling (*Salvelinus umbla*) als Modellsystem zur Untersuchung des Besatzeinflusses in Seen

1.3.3.1 Abriß der Biologie des Seesaiblings

Vertreter des Formenkomplexes *Salvelinus alpinus* sind im holarktischen zirkum-polaren Raum verbreitet. Ihr Vorkommen erstreckt sich von Nordamerika über Grönland bis Europa, wobei die Bestände im nördlichen Europa auf Skandinavien, Island, Großbritannien und Irland beschränkt sind. Ein weiteres Vorkommen von Seesaiblingen befindet sich im Alpenraum (Abb. 5). Nach Behnke (1980) repräsentieren die nordeuropäischen und die alpinen Seesaiblinge zwei Unterarten, *S. alpinus alpinus* und *S. alpinus salvelinus*. Kottelat (1997) hingegen behandelt diese evolutionären Linien in seiner Zusammenfassung der Taxonomie und Nomenklatur europäischer Süßwasserfische als zwei Arten, *S. alpinus* bzw. *S. umbla* genannt. Von diesen beiden Arten wird noch eine weitere unterschieden, die die Tiefseeformen des Seesaiblings beschreibt. *Salvelinus profundus* wurde erstmals aus dem Bodensee von Schillinger (1901) beschrieben. Allgemein herrscht in der Systematik keine Einigkeit, da umfassende Analysen fehlen. In dieser Arbeit wurde jedoch die Unterscheidung von Kottelat (1997) aufgenommen, weil sie auf einer gründlichen Analyse der taxonomischen Situation beruht. Es werden also die skandinavischen Formen als *S. alpinus* (sic) und die präalpinen Formen als *S. umbla* bezeichnet.

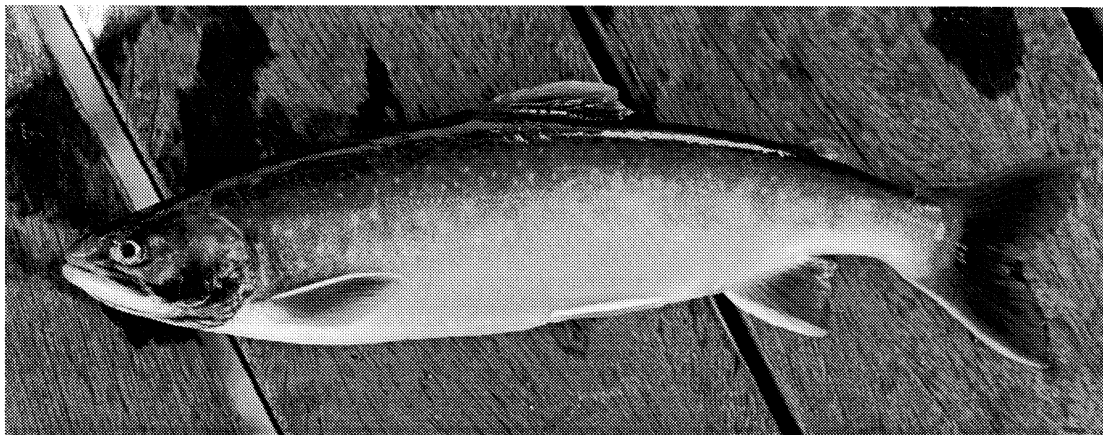


Abb. 4: *Alpiner Seesaibling (Salvelinus umbla) aus dem Starnbergersee.*

In phylogeographischen Studien (Wilson et al. 1996) an Seesaiblingspopulationen (*S. alpinus*) Nordamerikas, konnte mittels Restriktionsverdau der mitochondrialen DNA gezeigt werden, daß dieser Kontinent mit verschiedenen pleistozänen Refugiallinien besiedelt worden war. Im Wesentlichen konnten zwei phylogenetische Gruppen unterschieden werden, die an zwölf Restriktionsschnittstellen verschieden sind und vermutlich aus einem arktischen oder beringischen und einem atlantischen Refugium stammen. Ihre heutige Verbreitung entspricht diesen Refugien, da die arktische Linie im nördlichen Teil Kanadas vorkommt, die atlantischen Haplotypen im östlichen Kanada. Aufgrund der Distanz zwischen den Haplotypen der zwei Gruppen, konnte zweifelsfrei eine Auftrennung dieser im Pleistozän angenommen werden. Die Hypothese von Behnke (1980), daß Europa als Quelle für die heutige nordamerikanische atlantische Linie diene, wird durch die Daten von Wilson et al. (1996) unterstützt, aber auch eine umgekehrte Richtung, also eine holozäne Besiedelung Europas aus einem westlichen atlantischen Refugium kann nicht ausgeschlossen werden.

Der *Salvelinus alpinus* Formenkomplex zeichnet sich besonders durch eine hohe Variabilität in der Morphologie, Färbung, Ökologie und Lebensweise der verschiedenen Populationen aus, wobei auch innerhalb eines Sees häufig verschiedene Morphotypen in Sympatrie existieren (Behnke 1984, Hindar & Jonsson 1993, Vøllestad & L'Abée-Lund 1994, Reist et al. 1995). Aus dem isländischen See Thingvalla wurden sogar vier morphologisch wie ökologisch differenzierte Formen beschrieben, wobei zwischen großen piscivoren und limnetischen, sowie kleinen planktivoren und limnetischen, großen benthivoren und kleinen benthivoren Formen unterschieden werden kann (Jonsson et al. 1988). Das hohe Maß an Variabilität zusammen mit dem sympatrischen Vorkommen verschiedener Formen, oft auch als „Saiblingsproblem“ bezeichnet, ist schon länger Bestand des besonderen Interesses von Evolutions- und Fischereibiologen. Der

Formenreichtum erschwert die taxonomische Einordnung der verschiedenen Morphotypen in Arten oder Unterarten (siehe oben). Außerdem ist es aus evolutionsbiologischer Sicht besonders interessant, wie die sympatrische Existenz der unterschiedlichen Morphotypen erklärt werden kann. Nyman et al. (1972, 1981) schlagen vor, daß sie auf dem sekundären Zusammentreffen allopatrisch entstandener Populationen beruht. Behnke (1972) dagegen meint, die Formen entstanden sympatrisch als in einem See evolvierte systematische Einheiten. Die Polymorphismen innerhalb eines Habitats könnten aber auch in einer hohen phänotypischen Plastizität begründet sein (& Johnsson 1982, 1993, Jonsson & Hindar 1982). Viele Ansätze wurden schon gemacht, um diese Fragen zu klären. Insbesondere in den letzten Jahren wurde verstärkt durch den Einsatz molekularer Marker nach möglichen Antworten gesucht. In den meisten Studien konnten keine oder nur geringe genetische Unterschiede zwischen Morphotypen innerhalb eines Sees festgestellt werden (Hindar et al. 1986, Magnusson & Ferguson 1987, Danzmann et al. 1991). Hartley et al. (1992) zeigten aber, daß sich bestimmte Morphotypen genetisch signifikant unterscheiden und vermutlich allopatrischen Ursprungs sind. Dagegen fanden Volpe & Ferguson (1996) mittels Minisatellitenmarkern Hinweise darauf, daß die verschiedenen Morphotypen aus dem isländischen Thingvallavatn sympatrischen Ursprung sind, da sie ähnlicher zueinander als zu limnetischen Formen aus zwei anderen isländischen Seen sind.

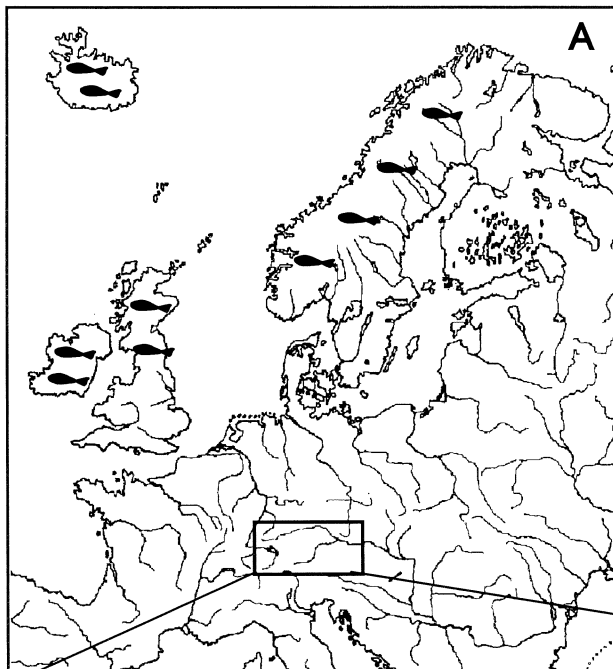


Abb. 5: Ursprüngliche Verbreitung von Seesaiblingen (*Salvelinus alpinus* und *S. umbla*) in Westeuropa. Der Kastenabschnitt bezieht sich auf die in diesem Projekt beprobten Populationen von *Salvelinus umbla* im Voralpengebiet Deutschlands. Das gesamte Verbreitungsgebiet der Art im Voralpengebiet zieht sich jedoch von Frankreich bis nach Österreich.

1.3.3.2 Genetische Diversität und Besatz von Seesaiblingen in Europa und Bayern

Die heute im Alpenraum existierenden Populationen werden häufig als Glazialrelikte bezeichnet (Thienemann 1950, Reisinger 1953, Johnson 1980), die nach dem Rückzug der letzten Gletscher aufgrund geologischer und ökologischer Barrieren als stationäre Formen in Voralpenseen nördlich des Alpenhauptkammes verblieben. Diese werden, im Gegensatz zu den anadromen Wandersaiblingen, als alpine Seesaiblinge bezeichnet.

Es wird allgemein angenommen, daß die Populationen postglazial aus nur einer atlantischen Population nach Zentraleuropa eingewandert sind, und nicht mehrere pleistozäne Refugialräume für diese Art existierten (Brunner et al. 1998). Brunner et al. (1998) untersuchten verschiedene alpine Seesaiblingspopulationen aus den Rhein-, Rhône- und Donaeinzugsgebieten mittels Mikrosatelliten und mitochondriellen Markern, um unter anderem diese Hypothese zu testen. Sie fanden keine Polymorphismen in den mitochondrialen Genen für die Untereinheiten 5 und 6 der NADH Dehydrogenase und für das Cytochrom b, ebenso wie in der mitochondrialen Kontrollregion. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, daß die Populationen nur einen einzigen postglazialen Ursprung haben. Auf der anderen Seite zeigten die Mikrosatellitenanalysen, daß sogar 18% der gesamten genetischen Varianz auf Unterschiede zwischen den Einzugsgebieten und 19% auf Unterschiede zwischen Populationen innerhalb eines Flußsystems zurückzuführen sind. Diese Ergebnisse wiederum sprachen für eine pleistozäne Differenzierung der alpinen Saiblingspopulationen. Desweiteren zeigten die Daten, daß der vermutete starke Besatz mit Fremdmaterial einen geringeren Einfluß auf die Populationsstrukturen hatte, als angenommen. Allerdings wurde zwischen verschiedenen sympatrischen Saiblingsformen in der Arbeit von Brunner et al. (1998) nicht unterschieden. Besonders der zuletzt genannte Umstand läßt Zweifel daran aufkommen, ob die untersuchten Populationen tatsächlich hinsichtlich des Besatzeinflusses korrekt charakterisiert waren, da aus der Literatur und aus mündlichen Mitteilungen bekannt war, daß viele bayerische Seen durch Besatz beeinflusst sind.

Es war deshalb ein Ziel dieser Teilstudie, ein feineres Verwandtschaftsmuster der alpinen Seesaiblinge zwischen den bayerischen Seen eines Einzugsgebiets so zu charakterisieren, daß eine phylogeographische Grundlage für die qualitative Beurteilung des Besatzeinflusses beim Seesaibling in Bayern gegeben war. Dazu sollte die genetische Struktur mehrerer Seesaiblingspopulationen aus deutschen und österreichischen Seen mittels Mikrosatelliten und mitochondriellen Markern untersucht werden, weil im Gegensatz zur Bachforelle weniger Vorarbeiten am alpinen Seesaibling von anderen Wissenschaftlern geleistet worden ist. Abgesehen vom

Bodensee, lagen alle Seen im Einzugsgebiet der bayerischen und österreichischen Donau. Die österreichischen Populationen wurden deshalb mit einbezogen, weil sie potentiell als Besatzmaterial für einige bayerische Gewässer in Frage kamen.

1.3.4 Die Mühlkoppe (*Cottus gobio*) als unbeeinflusstes phylogeographisches Vergleichssystem zur Bachforelle

1.3.4.1 Abriß der Biologie und Systematik der Mühlkoppe (*Cottus gobio*-Formenkreis)

Die Mühlkoppe (*C. gobio* L.) ist ein relativ kleiner, ungefähr 10 cm langer, benthischer Fisch, der hauptsächlich in kalten, sauerstoffreichen Gewässern vorkommt (Abb. 6). Die Art ist in fast ganz Europa verbreitet, nur in Irland, dem nördlichen Schottland, und Südspanien sowie Süditalien ist sie nicht zu finden. Die Fähigkeit der Mühlkoppe, aktiv längere Distanzen zurückzulegen, wird als gering eingeschätzt (Downhower et al. 1990, Waterstraat 1992). Da nie ein wirtschaftliches Interesse an dieser Art bestand, kann anthropogener Einfluß durch Besatz weitgehend ausgeschlossen werden. Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß die Verbreitung der Mühlkoppe in Europa ihre natürliche Populationsgeschichte widerspiegelt (Abb. 7). So scheint die Mühlkoppe eine ideale Art zu sein, um tertiäre und quaternäre Kolonisierungswege ähnlich verbreiteter europäischer Fischarten exemplarisch zu untersuchen und mit denen anderer Fischarten, v.a. der Bachforelle, die ähnliche Gewässer besiedelt, zu vergleichen.

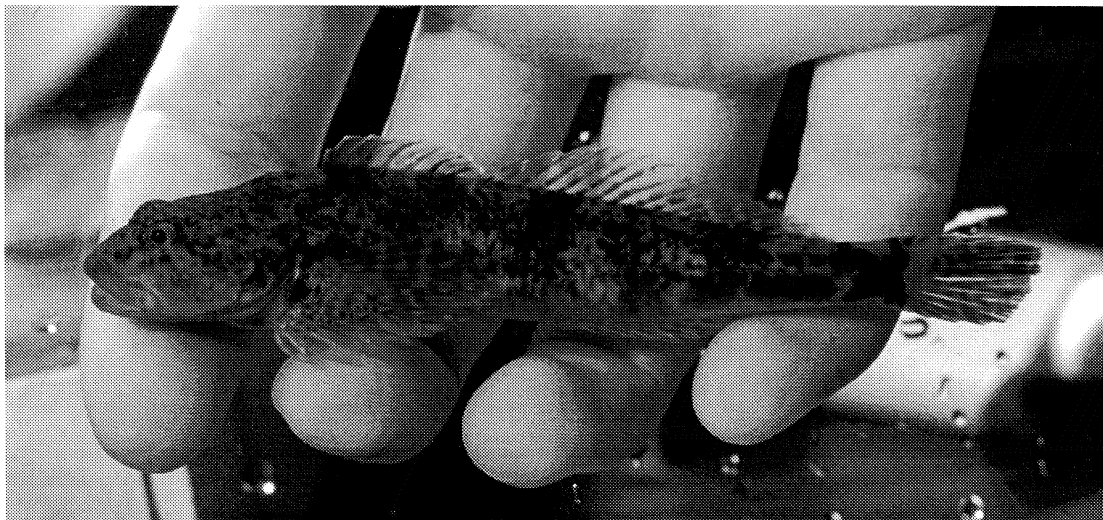


Abb. 6: Mühlkoppe (*Cottus gobio*) aus der Großen Ohe (Nationalpark Bayerischer Wald)

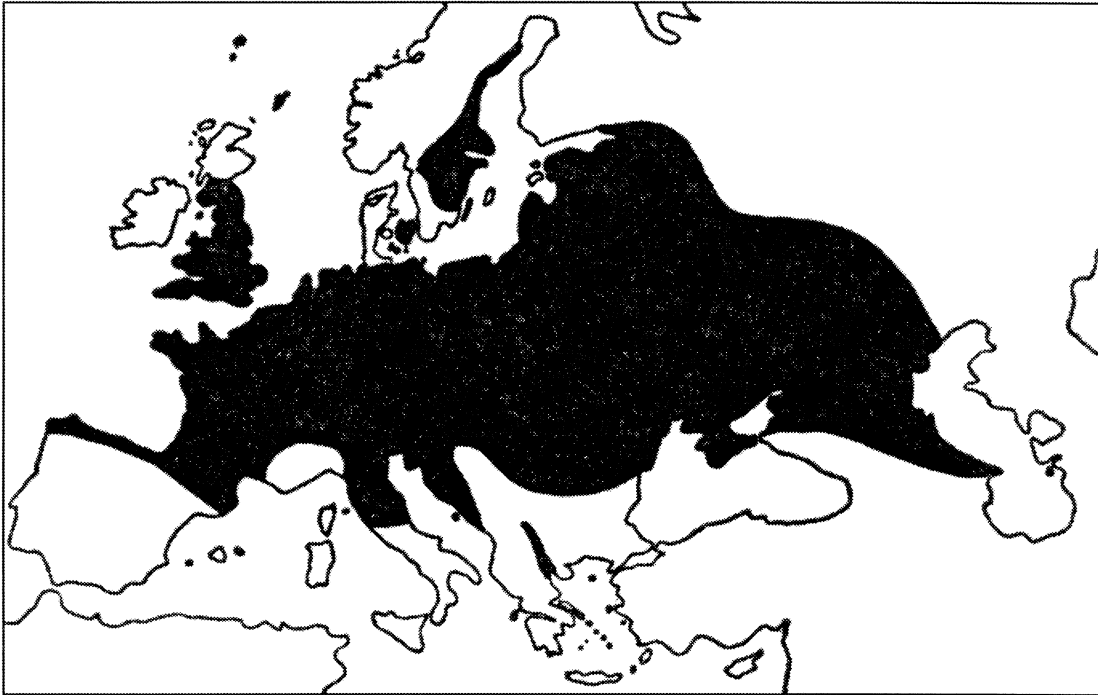


Abb. 7: Ursprüngliche Verbreitung von Mühlkoppe (*Cottus gobio*, *C. petiti* und *C. ferrugineus*) in Europa und Asien (aus Ladiges & Vogt 1979). Zusätzlich existieren Populationen im Gewässersystem des Aralsees.

Wie bei der Bachforelle und dem Seesaibling auch, herrscht keine einheitliche Ansicht über die korrekte taxonomische Zuordnung der Mühlkoppenpopulationen in Europa. Da bisher keine modernen und das gesamte Taxon untersuchenden Arbeiten zur Systematik der Mühlkoppe vorliegen, sprechen wir vom *C. gobio*-Formenkreis, der die beschriebenen und in Kottelat (1997) aufgelisteten Arten *C. ferrugineus* aus Oberitalien und *C. petiti* aus Südfrankreich mit einschließt, die gegebenenfalls als eigenen Arten aufgeführt werden.

1.3.4.2 Genetische Diversität von Mühlkoppen in Europa und Bayern

In früheren Studien wurden Populationen der Mühlkoppe aus den deutschen Flußsystemen Main, Donau, Elbe und Oberrhein mittels Allozym-Markern und morphologisch charakterisiert (Riffel & Schreiber 1995, Hänfling & Brandl 1998a, b, Riffel & Schreiber 1998). Die Ergebnisse zeigten, daß die genetische Distanz zwischen Populationen aus dem Main und denen aus Donau und Elbe sehr groß sind (0.24 nach Nei), und sich die Existenz dieser eventuell auf einen voreiszeitlichen Ursprung zurückführen läßt. Die morphologischen Vergleiche dagegen zeigten nur geringe Unterschiede zwischen Populationen der unterschiedlichen Flußsysteme. Da sich diese Arbeiten nur auf einen kleinen Teil des ursprünglichen Verbreitungsgebietes

beschränkten, erlaubten sie aber keine allgemeinen Schlußfolgerungen über die phylogeographische Positionierung der deutschen und besonders bayerischen Mühlkoppen in Europa. Für die vorliegende Studie wurden deshalb in ganz Kontinentaleuropa Proben genommen und mitochondriale Marker (Kontrollregion) untersucht, die sich in Beziehung zu den untersuchten Markern der Bachforelle setzen lassen konnten und eine ungefähre Altersabschätzung der Linien zulassen sollten. Ebenso wie in den vorangegangenen Arbeiten lag der Schwerpunkt im Süden Deutschlands, da dieses Gebiet, in dem drei große europäische Flußsysteme sehr eng aneinander grenzen, aus biogeographischer Sicht besonders interessant ist und das wichtigste Areal für die Untersuchung des Besatzeinflusses der Bachforelle im vorliegenden Projekt war. Die Ergebnisse sollten in einem zweiten Schritt dazu beitragen, die natürliche Phylogeographie der Bachforelle in Mitteleuropa zu verstehen, die eventuell eine gleiche Besiedlungsgeschichte Mitteleuropas haben könnte, oder aber ganz unterschiedlich sein könnte. Je nach Ergebnis sollten daraufhin Rückschlüsse über die Verallgemeinerungsmöglichkeit der an der Bachforelle gefundenen Ergebnisse auf andere Fische Mitteleuropas möglich sein.

2 Material, Methoden, Ergebnisse der Vorarbeiten

2.1 Auswahl der untersuchten Fischpopulationen

2.1.1 Bachforelle (*Salmo trutta*)

Es wurden 47 Populationen bayerischer Bachforelle beprobt. Die Auswahl der Gewässer richtete sich nach mehreren Kriterien, um dem Forschungsziel zu dienen, den Besatzeinfluss auf die phylogeographische und populationsgenetische Integrität von Bachforellenpopulationen zu messen. Zum einen sollten die drei Haupteinzugsgebiete Bayerns Main/Rhein, Elbe (Entwässerung in den Atlantik), und Donau (Entwässerung in das Schwarze Meer) ausreichend repräsentiert sein. Dabei wurde darauf geachtet, daß einerseits innerhalb des bayerischen Abschnitts des jeweiligen Flußsystems weiträumig Gewässer besammelt wurden. Andererseits sollten innerhalb einiger ausgewählter Flußsysteme mehrere nahe beieinander gelegene Bäche mit wahrscheinlich unterschiedlichem Besatzeinfluß beprobt werden, um eventuell auch kleinräumige Besatzeffekte nachweisen zu können. Weiterhin sollten sowohl mit hoher Wahrscheinlichkeit besetzte als auch weitgehend unbesetzte Populationen berücksichtigt werden, wobei mindestens einige wahrscheinlich vollständig unbeeinflusste Gewässer in die Auswahl genommen wurden. Schließlich sollte keines der beprobten Gewässer erst im Jahr oder Vorjahr der Befischung besetzt worden sein, um durch Besatz kurzfristig veränderte demographische Verhältnisse von den zu untersuchenden längerfristigen Introgressionseffekten unterscheiden zu können.

Neben den wissenschaftlichen Gesichtspunkten bei der Auswahl der Bachforellengewässer spielten praktische Aspekte eine Rolle, vor allem die Kooperationsbereitschaft und das Wissen der verschiedenen Fischereifachberatungen und Fischereifachinstitute. Ohne deren Mithilfe bei der Auswahl, Organisation und Genehmigung der fast 50 Einzelbefischungen hätte das Projekt nicht durchgeführt werden können. Besonders hervorzuheben in diesem Zusammenhang sind die Fischereifachberatungen Oberfranken (Dr. Klupp, Dr. Schadt, Herr Meyer), Niederbayern (Dipl.-Ing. Hoch, Dr. Harsanyi), die Bayerische Landesanstalt für Wasserforschung (Dr. Bohl) und die Bayerische Landesanstalt für Fischerei (Dr. Leuner). Zusätzlich stammen Gewebeproben aus drei bayerischen Fischzuchtanstalten (Aufseß, Lindbergmühle und Wielenbach), die einen Teil des in Bayern verwendeten Besatzmaterials liefern. Außerdem konnten zu Vergleichszwecken von Dr. Weiss (Tiermedizinische Fakultät der Universität Wien) zur Verfügung gestellte DNA-Proben von zwei kaum besetzten danubischen Populationen aus Österreich, sowie fünf Proben von Dr. Hansen (Danish Institute for Fisheries Research, Silkeborg, Dänemark), die jeweils zwei bei uns nicht vorkommende Taxa und einen atlantischen Typ repräsentieren, in die Untersuchung der mitochondrialen Vielfalt mit einbezogen werden sollten. Mehr Vergleichsproben waren nicht nötig, da die Phylogeographie der Bachforelle in Europa vergleichsweise gut bekannt ist (siehe Einleitung).

Die Auswahl der Populationen ist in Tabelle 1 dargestellt, die Lage der Fundorte auf Abb. 8.

Tabelle 1: *Populationsgenetisch beprobte bayerische und österreichische Bachforellengewässer und Zuchtstationen. Aufgeführt sind die im Text verwendeten 3-Buchstabenkürzel für einzelne Populationen, die Vorfluterfolge, die im Bach (fettgedruckt), der durch den Kürzel bezeichnet ist, endet (vgl. Abb. 8), sowie die Anzahl der aus dieser Population entnommenen Proben. Die Gesamtanzahl der Proben ($n = 1683$) verteilt sich auf insgesamt 49 Populationen und 3 Zuchtstationen. Populationen mit niedriger Stichprobenzahl (SHI, MOL, AIL: $N < 12$), sowie die drei Zuchtstationen (LBG, ZWI, AUF) wurden in die populationsgenetischen Analysen nur teilweise miteinbezogen. Nicht alle Proben konnten vollständig genetisch untersucht werden.*

Kürzel	Strom- system	Vorfluterfolge im Stromsystem	Anzahl Proben
WIE	Donau	Lech/ Wielenbach	30
RTB	Donau	Lech/ Rottbach/ Oberer Rottbach	30
GEI	Donau	Lech /Rottbach / Geiseldoosbach	30
KAL	Donau	Lech/ Rottbach/ Kaltebach	44
HAI	Donau	Naab/ Haidenaab	39
TAU	Donau	Naab/ Tauritzbach	37
WOL	Donau	Regen /Schwarzer Regen/ Teisnach/ Wolfertsrieder Bach	27
TEI	Donau	Regen/ Schwarzer Regen/ Teisnach	32
LBG	Donau	Regen/ Zucht Lindbergmühle	40
BAI	Donau	Laber/ Kleine Laber/ Baierbach	28
MUH	Donau	Isar/ Amper/ Ammersee/ Rott/ Mühlbach	31
SLI	Donau	Isar/ Amper/ Ammersee/ Rott / Schlittbach	30
STG	Donau	Isar/ Amper/ Ammersee/ Rott/ Steingraben	30
KOH	Donau	Isar/ Amper/ Ammersee/ Rott/ Kohlgraben	30
RTT	Donau	Isar/ Amper/ Ammersee/ Rott	30
MIC	Donau	Isar/ Amper/ Ammersee/ Rott/ Michelbach	30
ZWI	Donau	Isar/ Amper/ Ammersee/ Rott/ Zucht Wielenbach	52
ERL	Donau	Hengersberger Ohe/ Erlachbach	38
HAA	Donau	Ilz/ Kleine Ohe/ Sagwasser / Haarauer Saige	34
FOR	Donau	Ilz/ Große Ohe/ Forellenbach	32
OHE	Donau	Ilz/ Große Ohe/ Große Ohe	29
KIR	Donau	Inn/ Kirnbach	31
BLU	Donau	Inn/ Salzach/ Blühnbach	35
SAG	Donau	Mur/ Sulm/ Saggaubach	37
GOL	Elbe	Saale/ Sächsische Saale/ Pulschnitz/ Goldbach	34
LAM	Elbe	Saale/ Sächsische Saale/ Lamitz	41
HOL	Elbe	Saale/ Schwesnitz/ Höllbach	39
MAH	Elbe	Saale/ Schwesnitz/ Höllbach/ Mähringsbach	31
STE	Elbe	Eger/ Steinselb	37
BIB	Elbe	Eger/ Bibersbach	36
MOL	Elbe	Moldau/ Kalte Moldau	10
SHI	Elbe	Moldau/ Kalte Moldau/ Schindelbach	7
GRE	Elbe	Moldau/ Kalte Moldau/ Grenzbach (= Köhlbach)	22
SWA	Elbe	Moldau/ Kalte Moldau/ Schwarzbach	30
HAR	Elbe	Moldau/ Kalte Moldau/ Harlandtbach	30
KRU	Rhein	Main/ Itz RodachII/ Krummbach	31
FRN	Rhein	Main/ Itz/ Fornbach	18
MBB	Rhein	Main/ Itz/ Lauterbach/ Mucklbrunnenbach	32
KRE	Rhein	Main/ Rodach/ Kremnitz	34
GRU	Rhein	Main/ Rodach/ Kremnitz/ Grümpelbach	35
THI	Rhein	Main/ Rodach/ Wilde Rodach/ Thiemitz (Oberlauf = Höllbach)	37
LAN	Rhein	Main/ Rodach/ Langenaubach	30
SCH	Rhein	Main/ Weisser Main/ Schorgast/ Steinach/ Schindelbach	42
WEM	Rhein	Main/ Weisser Main	35
SHU	Rhein	Main/ Wiesent/ Leinleiter/ Schulmühlbach	34
MAT	Rhein	Main/ Wiesent /Leinleiter/ Mathelbach	36
AIL	Rhein	Main/ Wiesent/ Püttlach/ Ailsbach	11
AUF	Rhein	Main/ Zucht Aufsess	48
DRE	Rhein	Main Regnitz/ Rauhe Ebrach/ Mittelebrach/ Dreierbrunnen	40
MON	Rhein	Main/ Schneybach/ Mönchsbach/ Schifferbrunnen	37
KAP	Rhein	Bodensee/ Leiblach/ Rickenbach/ Kappeler Neubach	30
MAI	Rhein	Bodensee/ Bregenzer Ach/ Rotach/ RodachIII/ Maisach	30

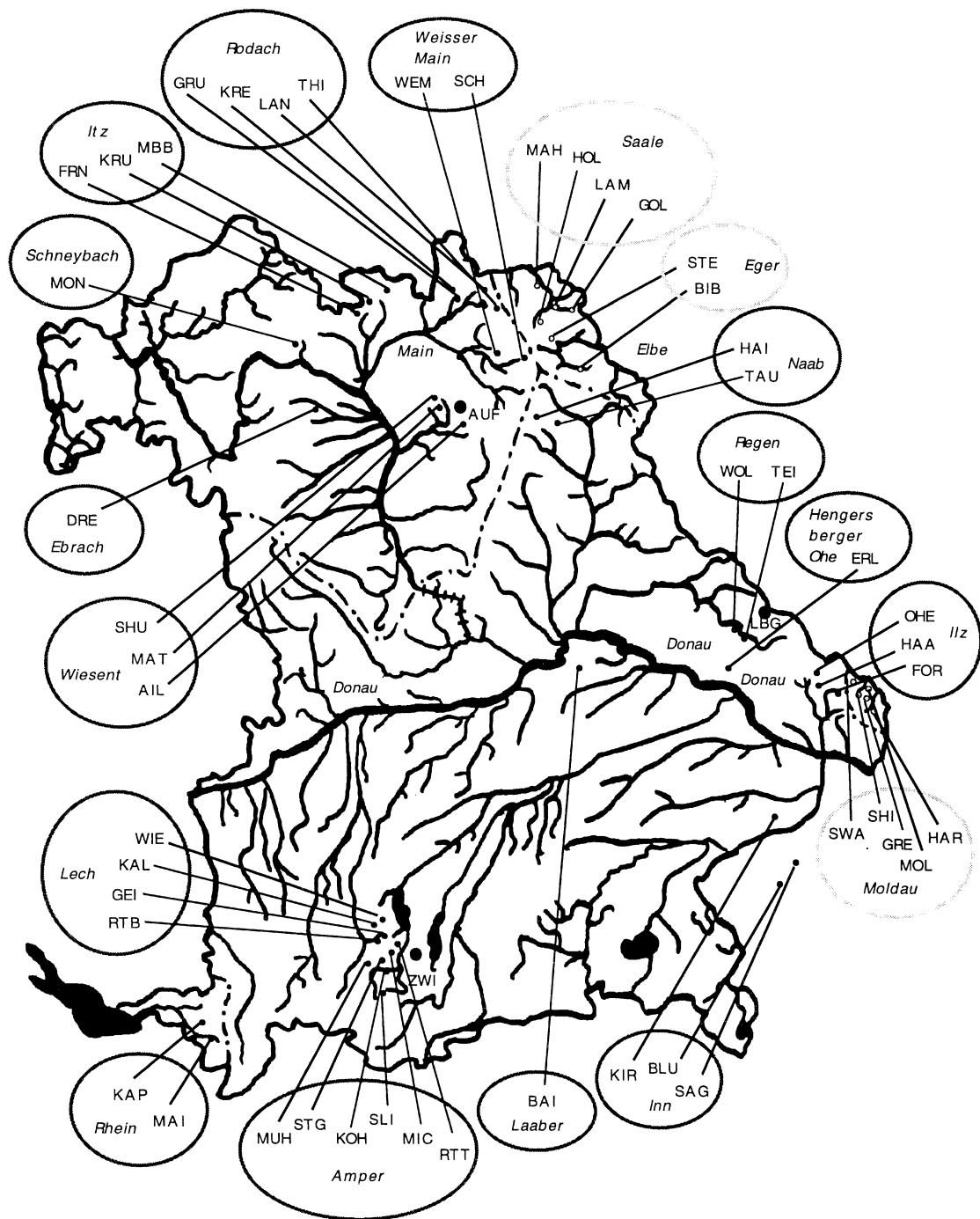


Abb. 8: Karte Bayerns und Westösterreichs mit allen beprobten Bachforellenpopulationen (siehe Tabelle 1). Kreise umschließen lokale Flußsysteme aus den drei verschiedenen Stromsystemen. Die Kärntner Population "SAG" ist nur der Übersicht halber auf der Abbildung mitaufgeführt, obwohl sie weiter östlich im Einzugsbereich der Mur liegt.

2.1.2 Koppe (*Cottus gobio*)

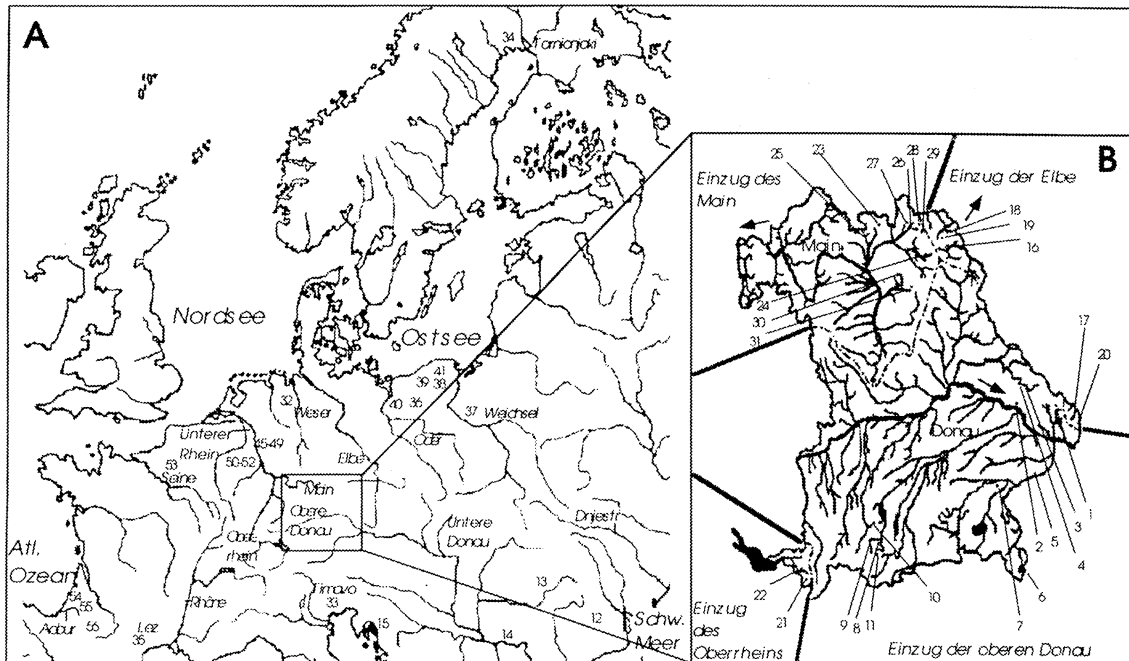
Im Gegensatz zu den Bachforellenproben sollte die Beprobung der Koppen zur Rekonstruktion der phylogeographischen Struktur der beprobten Bachforellengewässer dienen (siehe Einleitung). Wegen dieser Vorgabe spielten andere Kriterien bei der Probenauswahl eine Rolle. Zum einen wurden Proben aus fast allen im Rahmen des Vorhabens befischten Bachforellengewässern (siehe Tabelle 1 / Abb. 8) entnommen, falls sie einen Koppenbestand aufwiesen. Daraus ergab sich, daß die dichteste Probennahme in Bayern stattfand. Dort lagen die Probenorte in Zuflüssen der oberen Donau (Pop-Nr. 1-11), der Elbe (Pop-Nr. 16-20), des Oberrheins (Pop-Nr. 21 und 22) und des Mains (Pop-Nr. 23-31). Diese sind in Abb. 9 vergrößert dargestellt und in Tabelle 2 mit den gleichen 3-Buchstabenkürzeln wie bei den Bachforellengewässern belegt. Da jedoch im Gegensatz zur Bachforelle noch keine Vergleichsdaten zur Phylogeographie der Koppe im europäischen Raum vorlagen, war es wichtig, den gesamten europäischen Raum zu beproben, um die lokale bayerische Diversität in einen weiträumigen phylogeographischen Zusammenhang stellen zu können. So kamen insgesamt 56 Probenorte zusammen

Auch hier spielten neben rein wissenschaftlichen Gesichtspunkten praktische Erwägungen bei der Auswahl der Proben eine entscheidende Rolle. Die Proben aus Norddeutschland, Polen, dem früheren Jugoslawien, Rumänien, Frankreich und Italien, wurden freundlicherweise von Dr. Freyhof (damals Museum König-Bonn) und Arne Nolte (Universität Oldenburg) zur Verfügung gestellt, die aus anderen Gründen in den jeweiligen Gebieten Befischungen vornahmen. Populationsproben aus dem Einzugsgebiet des unteren Rhein stammten aus dem Rhein selbst (Pop-Nr. 47, 48, 50-52) und aus Rheinzufüssen (Mosel, Sieg, Düsseldorf). So wurden Proben aus der Ruwer entnommen (Pop-Nr. 45), welche in die Mosel fließt, und aus der Sieg (Pop-Nr. 46). Desweiteren wurden Tiere aus dem Krabach (Pop-Nr. 42), dem Ottersbach (Pop-Nr. 44) und dem Giertshagener Bach (Pop-Nr. 49) beprobt, welche alle Zuflüsse der Sieg sind. In der Düsseldorf wurde nur eine Population untersucht (Pop-Nr. 43). Aus der Weser wurde nur ein Tier aus einem Zufluß erhalten (Pop-Nr. 32). Im früheren Jugoslawien und in Rumänien wurden Proben aus Zuflüssen der unteren Donau entnommen (Pop-Nr. 12-15). Weiterhin wurden einzelne Populationsproben aus der Timavo-Quelle in Italien (Pop-Nr. 33) und dem Tornionjoki in Finnland (Pop-Nr. 34) erhalten. Polnische Proben stammten aus Zuflüssen der Oder und Weichsel (Pop-Nr. 36 und 37) und anderen kleineren Flüssen, die direkt in die Ostsee münden (Pop-Nr. 38-41). Französische Proben kamen aus dem Lez, dem Adour und der Seine (Pop-Nr. 35, 53, 54-56). Die Population aus der Timavo-Quelle (Pop-Nr. 33) ist ursprünglich als *Cottus ferrugineus* Heckel & Kner 1858, beschrieben. Ebenso ist die Population aus dem Lez als eigene Art, *Cottus petiti* Bacescu & Bacescu-Mester 1964, definiert. Ein Tier der sibirischen Koppe (*Cottus poecilopus* Heckel 1837), das aus dem Wistoka, einem Zufluß der Weichsel, stammte, wurde ebenfalls sequenziert und in Stammbaumanalysen als Außengruppe eingesetzt.

Tabelle 2: Populationsgenetisch beprobte Koppenpopulationen (vgl. Abb. 9). Aufgeführt sind die Probennummer (NO) der jeweiligen Population, die im Text verwendeten 3-Buchstabenkürzel für Populationen aus solchen Gewässern, aus denen auch Bachforellen entnommen wurden, die geographische Einordnung der Population im Stromsystem Europas, der Name des Gewässers aus dem die Population stammt, sowie die Anzahl (n) der aus dieser Population analysierten Proben. Die Gesamtanzahl der Proben (n = 408) verteilt sich auf insgesamt 56 Populationen. Dazu kommt eine Probe der Sibirischen Koppe (*Cottus poecilopus*) als Außengruppe.

No	Kürzel	Stromsystem	Gewässer	Herkunftsland	n
1	OHE	Obere Donau	Große Ohe	Deutschland	9
2	ERL	Obere Donau	Erlachbach	Deutschland	10
3	TEI	Obere Donau	Teisnach	Deutschland	5
4	WOL	Obere Donau	Wolfertsrieder Bach	Deutschland	9
5	KIR	Obere Donau	Kirnbach	Deutschland	8
6	KOS	Obere Donau	Königssee	Deutschland	47
7	-	Obere Donau	Inn	Deutschland	4
8	KOH	Obere Donau	Kohlgraben	Deutschland	7
9	WIE	Obere Donau	Wielenbach	Deutschland	2
10	MUH	Obere Donau	Mühlbach	Deutschland	9
11	SLI	Obere Donau	Schlittbach	Deutschland	3
12	-	Untere Donau	Borovo	Rumänien	8
13	-	Untere Donau	Mures	Rumänien	9
14	-	Untere Donau	Nera	Rumänien	8
15	-	Untere Donau	Kolpa	Slovenien	1
16	STE	Elbe	Steinselb	Deutschland	9
17	GRE	Elbe	Grenzbach	Deutschland	5
18	LAM	Elbe	Lamitz	Deutschland	8
19	HOL	Elbe	Höllbach	Deutschland	10
20	HAR	Elbe	Harlandtbach	Deutschland	9
21	MAI	Oberrhein	Maisach	Deutschland	3
22	KAP	Oberrhein	Kappeler Neubach	Deutschland	9
23	MBB	Rhein-Main	Mucklbrunnenbach	Deutschland	10
24	WEM	Rhein-Main	Weisser Main/	Deutschland	3
25	FRN	Rhein-Main	Fornbach	Deutschland	3
26	GRU	Rhein-Main	Grümpelbach	Deutschland	5
27	KRE	Rhein-Main	Kremnitz	Deutschland	8
28	LAN	Rhein-Main	Langenaubach	Deutschland	5
29	THI	Rhein-Main	Thiemitz	Deutschland	9
30	SHU	Rhein-Main	Schulmühlbach	Deutschland	7
31	AIL	Rhein-Main	Ailsbach	Deutschland	7
42	-	Unterrhein	Krabach	Deutschland	9
43	-	Unterrhein	Düssel	Deutschland	8
44	-	Unterrhein	Ottersbach	Deutschland	8
45	-	Unterrhein	Ruwer	Deutschland	9
46	-	Unterrhein	Sieg	Deutschland	9
47	-	Unterrhein	Schottel	Deutschland	10
48	-	Unterrhein	Bonn	Deutschland	5
49	-	Unterrhein	Giertschagener Bach	Deutschland	16
50	-	Unterrhein	Neuwied	Deutschland	3
51	-	Unterrhein	Urmitz	Deutschland	1
52	-	Unterrhein	Remagen	Deutschland	1
53	-	Seine	Sainte Marie	Frankreich	7
32	-	Weser	Weser	Deutschland	1
34	-	Tornionjoki	Tornionjoki	Finnland	6
36	-	Oder/Weichsel	Gwda	Polen	10
37	-	Oder/Weichsel	Skrwa	Polen	9
38	-	Oder/Weichsel	Slizieá	Polen	7
39	-	Oder/Weichsel	Broczynka	Polen	1
40	-	Oder/Weichsel	Radomysi	Polen	9
41	-	Oder/Weichsel	Radunia	Polen	7
54	-	Adour	Gave de Pau 1	Frankreich	7
55	-	Adour	Gave de Pau 2	Frankreich	6
56	-	Adour	Ouzom	Frankreich	3
33	-	Timavo	Timavo	Italien	4
35	-	Lez	Lez	Frankreich	2

Abb. 9: (A) Darstellung aller Flußsysteme und Probenorte mit ihren Nummern (vergleiche Tabelle 2 sowie Fließtext), (B) die Probestellen in Bayern sind vergrößert aufgeführt.



2.1.3 Alpiner Seesaibling (*Salvelinus umbla*)

Um auch den Besatzeinfluß in lakustriner Umgebung kursorisch untersuchen zu können, sollten exemplarisch an wenigen ausgewählten Seen Bayerns und Österreichs populationsgenetische Proben des Alpiner Seesaiblings genommen werden, allerdings nicht mit dem hohen Aufwand wie bei der Bachforelle. Es wurden im deutschen und österreichischem Alpen- und Voralpenraum insgesamt 10 Seen untersucht, die sich in ihrer Besatzgeschichte voneinander unterscheiden.

Aus Österreich wurden Populationsproben aus dem Fuschlsee (Fus), aus dem Plansee (Pla) und dem Heiterwanger See (Hei) erhalten. Letztere beiden Seen sind heute durch einen künstlichen Kanal verbunden, waren aber früher voneinander getrennt. Proben aus dem österreichischen Grundlsee (Grd) wurden freundlicherweise von Kollegen zur Verfügung gestellt. Im Nationalpark Berchtesgaden wurden drei Seen, der Königssee (Kos), der Obersee (Obe) und der Grünsee (Grn) untersucht. Der Königssee und der Obersee sind durch einen Bach miteinander verbunden. Der Königssee wurde unter anderem mit Material aus dem Fuschlsee besetzt. Der Grünsee liegt als einziger der untersuchten Seen in alpiner Höhe auf 1474 m und ist wahrscheinlich schon im Mittelalter mit Saiblingen aus dem Königs- oder Obersee besetzt worden. Desweiteren wurden Populationsproben aus dem Starnberger See (Sta), dem Bodensee (Bod) und dem Ammersee (Amm) entnommen. Die Tiere aus dem Ammersee entsprechen in ihrer Morphologie dem sogenannten Tiefseesaibling aus dem Bodensee (*Salvelinus profundus* Schillinger 1901), der Bestand wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit nie durch Fremdbesatz beeinflusst. Der Seesaiblingsbestand des Starnberger Sees war vor ca. 20 bis 30 Jahren durch Umweltverschmutzung sehr stark reduziert. Der Bestand wurde nach dem Bau einer ausreichenden Kanalisation für die Gemeinden des Starnberger Sees mit Fremdmaterial aus dem deutschen Hintersee und dem schweizer Vierwaldstätter See wieder aufgebaut (pers. Mittlg. Klein, Huber). Aus dem Bodensee wurden Populationsproben aus dem Überlinger See

erhalten. Diese Population, die aus dem Rhein-Flußsystem stammt, diente als geographisch entfernte Referenzprobe für die ansonsten hauptsächlich danubischen Saiblingsproben.

Die Fischproben wurden in der Regel von den Berufsfischern vor Ort zur Verfügung gestellt, beziehungsweise unter Einsatz des projekteigenen Netzes von den jeweiligen Fischereirechtsinhabern gefangen. Die Saiblinge wurden mit Kiemen-Stellnetzen gefangen und bis zur Probenahme lebend gehalten. Die Lage der Seen ist auf Abb. 10 dargestellt, Probenzahl und zugehöriges Flußsystem sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Abb. 10: Beprobte Seesaiblingsgewässer im bayerischen und österreichischem Voralpen- und Alpengebiet

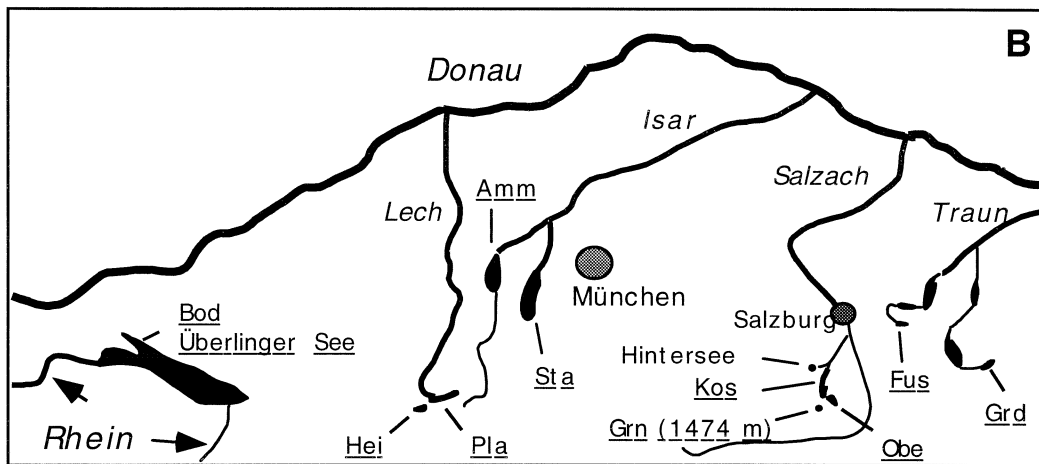


Tabelle 3: Populationsgenetisch beprobte Seesaiblingspopulationen. Aufgeführt sind die im Text verwendeten Drei-Buchstabenkürzel für einzelne Populationen, die Vorfluterfolge, die im See (fettgedruckt) endet (vgl. Abb. 10), sowie die Anzahl der aus dieser Population entnommenen Proben. Die Gesamtanzahl der Proben ($n = 308$) verteilt sich auf insgesamt 10 Populationen. Populationen mit niedriger Stichprobenzahl (HEI, OBE: $n < 9$) wurden in die populationsgenetischen Analysen nur unter Vorbehalt bzw. teilweise miteinbezogen. Ergebnisse, die diese Populationen betreffen, werden im Text gesondert diskutiert.

Kürzel	Stromsystem	Vorfluterfolge im Stromsystem	Anzahl Proben
PLA	Donau	Lech/ Plansee	40
HEI	Donau	Lech/Plansee/ Heiterwanger See	8
AMM	Donau	Isar/Amper/ Ammersee	28
STA	Donau	Isar/ Würm/ Starnberger See	29
KOS	Donau	Inn/Salzach/Saalach/ Königssee	85
OBE	Donau	Inn/Salzach/Saalach/ Königssee/ Obersee	7
GRN	Donau	isoliert und aus Königssee/Obersee besetzt: Grünsee	20
FUS	Donau	Traun/ Attersee/ Mondsee/ Fuschlsee	30
GRD	Donau	Traun/ Hallstädter See/ Grundlsee	30
BOD	Rhein	Bodensee	31

2.2 Abschätzung der Besatzintensität der untersuchten Gewässer

Schon vor dem Beginn des Projekts war klar, daß über die Intensität und Art des Besatzes nur ungefähre Angaben für die jeweiligen Fischgewässer zu erhalten sein würden. Die Abschätzung der Wahrscheinlichkeit und der Intensität, mit der Populationen durch Besatz möglicherweise genetisch verändert wurden, setzt aber eine *a priori*-Klassifizierung der Gewässer nach der Wahrscheinlichkeit mit der besetzt wurde voraus. Um dies semi-quantitativ erreichen zu können, mussten soviel Informationsquellen zur Besatzeinflußgeschichte der jeweiligen Gewässer genutzt werden, wie möglich. Vier verschiedene Quellen standen daher zur Verfügung, die alle in eine Gesamtaberschätzung einfließen sollten. Die Möglichkeit, den wahrscheinlichen Besatzeinfluß entsprechend dieser Quellen verbal und sinnvoll zu beschreiben, sollte dazu verwendet werden, Besatzwahrscheinlichkeiten als „Scores“ zu klassifizieren und die genetischen Daten gegen diese semiquantitativen Daten zu testen. Obwohl dieser Ansatz aus experimenteller Sicht unbefriedigend ist, war es jedoch der einzig mögliche, um genetische Konsequenzen des schon lange anhaltenden Besatzes auf bayerische Bachforellenpopulationen abschätzen zu können.

2.2.1 Direkte Befragungen zum Besatzeinfluß

Informationen, die Besatzgeschichte einzelner Gewässer widerspiegeln, lassen sich theoretisch von verschiedenen Personen und Institutionen erhalten, wobei die Qualität der Informationen aus verschiedenen Gründen stark unterschiedlich sein kann. So könnten solche Fischereirechtseigentümer, die die gesetzliche Hegepflicht als grundsätzliche Besatzpflicht missverstanden haben, sich genötigt fühlen, unrichtige Angaben zu machen, falls sie wenig oder gar nicht besetzt haben. Auf der anderen Seite könnten Personen, die ihrer Hegepflicht nicht fachgerecht nachgekommen sind, ebenfalls falsche Angaben machen. Vielfach sind die Besatzmaßnahmen auch nur unzureichend dokumentiert und an die Fachbehörden weitergeleitet worden, weshalb eine Rekonstruktion nur selten möglich erscheint. Um den Informationsgehalt dennoch nicht vollständig verwerfen zu müssen, erschien es daher sinnvoll, Befragungen zum Besatz der einzelnen Gewässer bei mehreren Personen durchzuführen, auf Suggestivfragen und Fragebögen ganz zu verzichten und die Angaben – wenn möglich – mit den Fischereisachverständigen zu diskutieren. Aus diesen Befragungen wurde dann eine verbal formulierbare Abschätzung der Besatzwahrscheinlichkeit vorgenommen und mit einem Score zwischen 0 und 3 belegt (siehe Tabelle 4). Die zusammengefassten Ergebnisse der Befragungen sind in Anhang 1 wiedergegeben.

2.2.2 Wahrscheinlichkeit des Einwanderens von allochthonen Teichflüchtlingen

Zusätzlich zum direkt im befischten Gewässerabschnitt getätigten Besatz können mit hoher Wahrscheinlichkeit Bachforellen aus Zucht- und Aufzuchtanlagen in die Vorfluter dieser Anlagen gelangen. Das passiert zum Beispiel regelmäßig bei Teichreinigungs- und Abfischungsaktionen, bei denen die Teiche abgelassen werden oder unregelmäßig bei Hochwasser, wenn das Wasser der Teiche über die Ufer tritt. Die Wahrscheinlichkeit, mit der Teichflüchtlinge in die befischten Gewässerabschnitte regelmäßig oder unregelmäßig gelangen, wurde aus den Befragungen (siehe oben), aus den Beratungen mit den Fachbehörden und aus der direkten Beschau benachbarter Teichanlagen und der Verbausituation, die die jeweiligen Gewässerabschnitte von Teichanlagen abgrenzt, abgeschätzt. Entsprechend der Ergebnisse (siehe Anhang 1) wurde die Wahrscheinlichkeit des Einwanderens von Teichflüchtlingen verbal beschrieben und mit 4 Scores von 0 bis 3 belegt (Tabelle 4).

2.2.3 Einwanderungswahrscheinlichkeit aus anderen Gewässerabschnitten

Zusätzlich zum direkten Besatzeinfluß im jeweiligen Gewässerabschnitt besteht in Gewässern mit keinen Wanderungshindernissen für Bachforellen die Möglichkeit, daß in anderen Gewässerabschnitten, die oft auch anderen Eigentümern zuzuordnen sind, besetzt wurde, und diese in den befischten Abschnitt einwandern beziehungsweise im Genfluß mit der befischten Subpopulation stehen. Entsprechend wurde durch direkte Anschauung, durch Befragung der Fachbehörden und Fischrechtsinhaber und durch die Konsultation von topographischen Karten (1:50000, in Einzelfällen auch 1: 25000) die Migrationswahrscheinlichkeit anhand der flußaufwärts gelegenen Verbauten für Bachforellen abgeschätzt und verbal in 4 Kategorien, die mit Scores von 0 bis 3 belegt wurden, eingeteilt (siehe Tabelle 4).

2.2.4 Vorkommen allochthoner Fischarten

In einigen Fällen wurden bei den Befischungen außer für das Gebiet autochthone Fischarten auch allochthone Fischarten gefangen, z. B. die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), der Bachsaibling (*Salvelinus fontinalis*) oder der Aal (*Anguilla anguilla*) (nur im Donaugebiet allochthon). Da das Vorkommen dieser Fischarten auf Besatz oder auf Teichfluchten zurückzuführen sein muss und damit also Besatzeinfluss für das Gewässer nachgewiesen war, erschien es sinnvoll, anhand dieser Fänge ebenfalls eine erhöhte Wahrscheinlichkeit des Bachforellenbesatzes anzunehmen. Entsprechend wurden der Bestand an allochthonen Fischarten für die Erarbeitung einer Besatzeinflußgesamtwahrscheinlichkeit als vorhanden oder nicht vorhanden in Form von Scores berücksichtigt (siehe Tabelle 4). In die Gesamtbewertung ging dieser Befund allerdings nur ein, wenn das Gewässer mit Hilfe der anderen Kriterien als nicht oder nur mit geringer Wahrscheinlichkeit besetzt charakterisiert wurde, also die Wahrscheinlichkeit einer Unterschätzung des Besatzes bestand.

2.2.5 Ermittlung einer Gesamtwahrscheinlichkeit für den Besatzeinfluß

Direkter Besatz, Einwanderung aus Teichen und Einwanderung aus nicht befischten Gewässerabschnitten sind als voneinander unabhängige und sich gegebenenfalls addierende Faktoren zu betrachten, die zur genetischen Verfremdung autochthoner Populationen führen können. Entsprechend wurden die Scores aus diesen drei Kategorien für die Intensität des wahrscheinlichen Besatzeinflusses zu einem Gesamtscore addiert, der zwischen 0 und 9 liegen kann. In Fällen, in denen der Besatzscore sehr niedrig lag (zwischen 0 und 3), aber gleichzeitig im Gewässer allochthone Fischarten festgestellt wurden, wurden der Gesamtscore um einen Punkt geringfügig heraufgesetzt und so ein korrigierter Gesamtscore (KorrScore) für alle Populationen berechnet. Bei der verbalen Beschreibung dieser Gesamtklassifikation wurde darauf geachtet, daß kein Widerspruch zu den Einzelklassifizierungen entsteht, also kein unter Kategorie „Besatz“ stark besetztes Gewässer (Einzel-score = 3) im korrigierten Gesamtscore als „mit nur geringer Wahrscheinlichkeit und/oder Intensität besetzt“ (KorrScore nicht größer als 2) beschrieben wurde. Dadurch sollte gewährleistet werden, daß die sprachliche Zusammenfassung der Gewässer in Gruppen nach Besatzeinflußwahrscheinlichkeit nicht der Intuition zuwiderläuft und deshalb eine weitergehende Akzeptanz über die in diesem Projekt durchgeführten statistischen Analysen hinaus finden kann.

Bei der Betrachtung der Einzelscores für alle untersuchten Gewässer (Tabelle 5) fällt auf, daß für viele Gewässer, die ursprünglich als „unbeeinflusst“ für die Befischung ausgewählt wurden, eine zumindest geringe Besatzeinflußwahrscheinlichkeit besteht. So konnte nur ein einziges Gewässer, die im Nationalpark Bayerischer Wald gelegene Haarauer Seige, als „mit großer Sicherheit unbesetzt“ (KorrScore = 0) klassifiziert werden. 10 Gewässer wurden als „mit nur geringer Wahrscheinlichkeit und/oder Intensität besetzt“ (KorrScore = 1 oder 2) klassifiziert. Alle anderen Gewässer können als „mit mittlerer Intensität und/oder Wahrscheinlichkeit besetzt“ (KorrScore = 3 bis 5, 21 Gewässer) besetzt gelten; oder sie waren mit großer Wahrscheinlichkeit und/oder Intensität besetzt“ (KorrScore 6 bis 9, 15 Gewässer).

Tabelle 4: Grundlage für die Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, mit der allochthone Bachforellen in den befischten Gewässerabschnitt gelangt sein konnten. Die verbale Beschreibung der auf vier Kategorien verteilten Wahrscheinlichkeiten stammt aus den Befragungen, Besichtigungen der Migrationsbarrieren für Bachforellen und den Elektrobefischungen. Sie dient dazu, diese Wahrscheinlichkeiten quantitativ in Form von „Scores“ darzustellen, die die Grundlage zur Klassifizierung der Gewässer nach Besatzeinflußwahrscheinlichkeit bilden. (Detaildaten siehe Anhang 1).

Verbale Beschreibung der Besatzwahrscheinlichkeit („Besatz“):	Score
„wahrscheinlich unbesetzt“	0
„eventuell unregelmäßig besetzt“	1
„mit Sicherheit geringfügig besetzt“	2
„mit Sicherheit häufiger besetzt“	3
Verbale Beschreibung der Wahrscheinlichkeit, mit der Bachforellen aus Teichanlagen in das Gewässer geflüchtet sind („Teichflüchtlinge“)	Score
„wahrscheinlich keine Teichflüchtlinge in das Gewässer gelangt“	0
„eventuell Teichflüchtlinge in das Gewässer gelangt“	1
„mit Sicherheit möglich, daß einige Teichflüchtlinge in das Gewässer gelangt sind“	2
„mit Sicherheit in hoher Frequenz möglich, daß Teichflüchtlinge in das Gewässer gelangt sind“	3
Verbale Beschreibung der Wahrscheinlichkeit des Einwanderens von Besatzfischen aus anderen Flußabschnitten, die („Einwanderung“)	Score
„Einwanderung von Besatzfischen unwahrscheinlich“	0
„Einwanderung von Besatzfischen eventuell möglich“	1
„Einwanderung von Besatzfischen mit Sicherheit möglich“	2
„Einwanderung von Besatzfischen mit Sicherheit und häufig möglich“	3
Verbale Beschreibung der Vorhandenseins von allochthonen Fischarten, die auf gezielten jüngeren Besatz hindeuten („Allochthone Fischarten“)	Score
„keine allochthone Fischart(en) gefischt“	0
„allochthone Fischart(en) gefischt“	1
Verbale Beschreibung der Gesamtwahrscheinlichkeit und Intensität des Besatzeinflusses in den befischten Gewässern („KorrScore“)	Korr Score
„mit großer Sicherheit unbesetzt“ (n=1)	0
„mit nur geringer Wahrscheinlichkeit und/oder Intensität besetzt“ (n=10)	1 - 2
„mit mittlerer Intensität und/oder Wahrscheinlichkeit besetzt“ (n=21)	3 - 5
„mit hoher Intensität und/oder Wahrscheinlichkeit besetzt“ (n=15)	6 - 9

Tabelle 5: Klassifizierung der Gewässer nach Besatzeinflußwahrscheinlichkeit auf der Basis der Befragungen und Elektrobefischungen (siehe Tabelle 4). Aus den Einzelscores der ersten 3 Kategorien und dem Score für „Allochthone Fischarten“ wurde ein „Korrigierter Gesamtscore“ berechnet, der ein Maß für die Abschätzung des Besatzeinflusses darstellt. Dazu wurden die ersten 3 Scores addiert und dieser Wert um 1 erhöht, falls der Score „Besatz“ 0 oder 1 war (nur geringe Besatzwahrscheinlichkeit), aber dennoch allochthone Fischarten in der Elektrobefischung gefunden wurden.

Bach	Kat. 1 Besatz	Kat. 2 Teichflüchlinge	Kat. 3 Einwanderung	Summe der Scores der Kategorien 1-3	Kat. 4 „Allochthone Fischarten“	Korr. Gesamt- score
WIE	1	0	3	4	0	4
RTB	2	2	2	6	1	6
GEI	0	1	2	3	0	3
KAL	0	1	2	3	0	3
HAI	3	0	0	3	0	3
TAU	2	1	0	3	1	3
WOL	3	0	3	6	1	6
TEI	3	0	0	3	1	3
LBG	-	-	-	-	-	-
BAI	3	0	1	4	1	4
MUH	0	3	1	4	1	5
SLI	0	1	1	2	0	2
STG	0	2	3	5	0	5
KOH	3	2	3	8	0	8
RTT	3	2	3	8	1	8
MIC	3	2	3	8	0	8
ZWI	-	-	-	-	-	-
ERL	0	2	3	5	0	5
HAA	0	0	0	0	0	0
FOR	0	0	1	1	0	1
OHE	1	0	1	2	0	2
KIR	1	0	1	2	1	3
BLU	0	0	0	0	1	1
SAG	1	1	1	3	1	4
GOL	0	0	1	1	0	1
LAM	3	2	3	8	0	8
HOL	2	2	0	4	0	4
MAH	2	2	0	4	0	4
STE	1	1	2	4	0	4
BIB	3	1	3	7	1	7
MOL	3	3	2	8	0	8
SHI	0	0	1	1	0	1
GRE	0	0	2	2	1	3
SWA	0	0	1	1	0	1
HAR	2	0	2	4	1	4
KRU	0	0	3	3	0	3
FRN	3	0	3	6	0	6
MBB	3	3	1	7	0	7
KRE	3	3	3	9	1	9
GRU	3	2	3	8	0	8
THI	0	1	1	2	0	2
LAN	0	0	0	0	1	1
SCH	3	0	0	3	1	3
WEM	3	1	3	7	0	7
SHU	1	0	0	1	0	1
MAT	0	1	1	2	0	3
AIL	1	1	0	2	0	2
AUF	-	-	-	-	-	-
DRE	0	3	3	6	0	6
MON	0	3	3	6	0	6
KAP	3	0	3	6	0	6
MAI	3	0	3	6	0	6

2.3 Befischungen, Probenahme, Charakterisierung der Untersuchungsstellen

2.3.1 Elektrofischerei in Fließgewässern

Alle beprobten Bachforellen und Koppen (außer Königsee-Koppen), stammten aus Fließgewässern und wurden mittels eines Elektrofisch-Gerätes (Modell Tecumseh TC200; 1 kW Leistung; Gleichstrom) unter Beachtung aller nötigen Genehmigungen und Sicherheitsvorkehrungen gefangen. Für die Bewertung der Ausarbeitung des „Index of Biotic Integrity“ ist eine Kenntnis der Wirkungsweise der Elektrobefischung nötig, weswegen diese genauer beschrieben wird:

Das Elektrofischereigerät besteht aus einem Generator, der an einen Benzinmotor gekoppelt ist und elektrischen Gleichstrom erzeugt. Die Leistung des Gerätes beträgt maximal 1 kW. Der negative Pol des Generators wird mit einer Kupferlitze verbunden, die sich hinter dem Fänger im Wasser befindet (Kathode), der Pluspol wird mit einem isolierten Käscher verbunden, dessen Metallrahmen für das Fangnetz gleichzeitig die Anode darstellt. Fische verschiedener Art und Größe sprechen unterschiedlich stark auf das erzeugte elektrische Feld an, doch ist die grundsätzliche Wirkung einheitlich. Bei einer bestimmten (niedrigen) abgegriffenen Spannung erzeugt das Feld auf den Fisch eine Scheuchwirkung, d.h. der Fisch schwimmt von der Anode weg. Bei einer optimalen abgegriffenen Spannung wird der Fisch physiologisch zu der Fanganode hingezogen, d.h. er schwimmt aktiv in Richtung Köcher (ausführlich Meng 1978).

Die individuelle Reaktion des Fisches wird durch drei wesentliche Faktoren bestimmt: die artspezifische Körperform und Reaktion auf elektrischen Strom, die Stellung des Fisches zum elektrischen Feld und die Größe des Fisches. Einige der im Untersuchungsgebiet vorkommenden Arten sprechen stärker bzw. schwächer auf das erzeugte elektrische Feld an als andere, abhängig von Körperleitfähigkeit, Hautwiderstand etc.. *Salmo trutta* reagiert empfindlich und gut auf das erzeugte elektrische Feld und ist demzufolge beinahe quantitativ in diesen Gewässern geringer Größe abzufischen. *Cottus gobio* neigt dazu, direkt in Narkose zu fallen (und damit die Galvanotaxis zu „überspringen“) und, da diese Art keine Schwimmblase hat, am Gewässerboden liegend abzudriften. *Lota lota* und Bachneunaugen sprechen sehr schlecht auf das elektrische Feld an und sind von daher nicht quantitativ, sondern nur qualitativ nachweisbar. Da Fische gleicher Art für die spezifischen Reaktionen immer die gleiche Schwellenstromdichte erfahren müssen (Meng 1978), reagieren kleine Fische, die weniger Spannung im gleichen Feld abgreifen, weniger empfindlich auf das elektrische Feld als große (Stromstärke und Spannung sind bei Fischen gleicher Art proportional, da der Widerstand identisch ist). Von daher ist mit einer systembedingten Schieflage zugunsten der größeren Fische einer Population zu rechnen.

Jede Untersuchungsstelle wurde i.d.R. auf ca. 100 m befischt. Falls in einem Bach extrem viele oder wenige Fische gefangen wurden, wurde diese Strecke dementsprechend verkürzt (um die Hälterung der Fische zu gewährleisten) oder verlängert. Vor der Befischung wurde der zu befischende Bereich des Bachbettes mit jeweils 130 Schritten abgesprochen. Bei einer durchschnittlichen ausgemessenen Schrittlänge von 0,75 Metern (von Lars Klein) wurde eine hinreichend genaue, gleichbleibend befischte Strecke von ca. 100 Metern erreicht. Diese ziemlich ungenaue, aber praktikable Methode ist für die Bestimmung der Biomasse geeignet, da es nicht um den Absolutbetrag der Fischbiomasse eines Gewässerabschnittes, sondern um den relativen Betrag eines Baches im Vergleich zu anderen Bächen gleicher Größe geht und eine recht grobe Unterteilung für diesen Zweck ausreichend ist. Ursprünglich wurde ein Netz bachaufwärts am Ende dieser befischten Strecke angebracht, um zu verhindern, daß Fische durch den Scheucheffekt der Anode des Elektrofischgerätes entkommen können. Es hat sich jedoch gezeigt, daß es ausreicht, eine längere, flache Rieselstrecke oder Gumpen als Begrenzung auszusuchen, da diese von den Fischen in der Regel nicht überwunden wird. Gefischt wurde immer flussaufwärts, um das Wasser durch Trittbewegung nicht zu trüben und um Abdrifteffekte zu minimieren. Um zu vermeiden, daß zu viele Tiere entfliehen, wurde die Anode rechenartig vom Ufer in den Mittelwasserbereich gezogen.

Abhängig von Wassertrübung und Leitfähigkeit ist der Anteil der gefangenen Tiere unterschiedlich, daher wurde für die Biomassebestimmung eine Fangquote für *Salmo trutta* geschätzt. Diese Art besitzt im Gros der Bäche einen überragend hohen Anteil an der Gesamtfischbiomasse. Eine solche Quote ist überdies recht genau zu schätzen, da man die entkommenden Fische aufgrund ihrer Größe, Färbung und Lebensweise im Freiwasserbereich gut wegschwimmen bzw. -driften sieht.

2.3.2 Fang der Seesaiblinge und Seenkoppen

Die Seesaiblinge wurden frishtot von Berufsfischern oder noch lebendig zur Verfügung gestellt und Einzelexemplare in einer Photoküvette photographiert. Die Koppen des Königssees wurden entweder im Flachwasser schnorchelnd mit Handnetzen gefangen; oder sie wurden in ca. 190 m Tiefe mit einer aus Gitter gefertigten „Stülpfalle“, die am Greifarm des U-Bootes „Jago“ befestigt war, eingesammelt und an die Oberfläche gebracht. Das U-Boot wurde im Rahmen einer anderweitigen Kooperation mit der Arbeitsgruppe Fricke des Max-Planck-Institutes Seewiesen eingesetzt.

2.3.3 Zwischenhälterung und photographische Dokumentation

Anschließend wurden alle Bachforellen und Koppen zwischengehältert. Dazu wurden die gefangenen Tiere in einem größeren Behälter (1,20 m x 0,50 m x 0,40 m) gebracht. Sauerstoff wurde ihnen mittels einer an der Autobatterie angeschlossenen Wasserpumpe zugeführt. Anschließend wurde jedes einzelne Tier auf das genaueste Gramm mittels einer Feldwaage und auf den genauesten halben Zentimeter mittels eines Lineals vermessen, weiterhin wurde es schließlich auf äußerlich sichtbare Anormalitäten und Parasitenbefall untersucht. Nach Erfassung dieser Daten (Art, Länge und Gewicht) wurden alle Bachforellen und eine Auswahl von Koppen in einer Photoküvette so auf Diafilm (Fuji Sensia 100) photographiert, daß nachträglich das Farbmuster und die wichtigen relativen Körpermaße auf von den Dias eingescannten Bilddateien ermittelt werden können.

Von Bachforellen, Koppen und Saiblingen wurde vom oberen Schwanzflossenlappen mit der Schere ein kleines Gewebestück entnommen und in 96%iges Ethanol überführt. Danach konnten sämtliche Fische wieder in das Gewässer entlassen werden beziehungsweise dem Berufsfischer zur weiteren Verwertung zurückgegeben werden. Dadurch wurde für die Bachforellen- und Koppenpopulationen sichergestellt, daß die spätere Genuntersuchung noch einen aktuellen Bezug zur Population hat, da die Elektrofischung und die schonende Gewebeentnahme erwiesenermaßen keine dauerhafte Schädigung der Fische zur Folge hat (Rümmler et al. 1998).

2.3.4 Dichtebestimmung der Bachforellenpopulationen

Die Dichte der Forellenpopulation war nur grob abzuschätzen. Es wurde die Anzahl der Individuen (und nicht die Biomasse) als zuverlässigste Parameter der Forellendichte gewählt, insbesondere deswegen, damit die Brütlingdichte adequat berücksichtigt wird. Die meisten dichteabhängigen Prozesse spielen sich im 0+-Lebensstadium der Bachforelle ab (Elliott 1984; 1985); die Biomasse als Dichteparameter würde jedoch die Brut tendenziell unterbewerten. Bei der Behandlung der Daten wird angenommen, daß die einmalige Befischung quantitativ war und den tatsächlichen durchschnittlichen Dichteverhältnissen entspricht. Um die Forellendichte zu bestimmen, wurde danach die Individuenanzahl auf einen Hektar (10.000 m²) hochgerechnet. Für die Bestimmung der Bachbreite wurden Intervallmittelwerte verwendet.

2.3.5 Fischbiomasse- und Individuenanzahlbestimmung

Für die Biomassebestimmung wurden alle gefangenen Tiere auf das genaueste Gramm gewogen. Anschließend wurde die Gesamtbiomasse der Bachforellenpopulation mit einem Fangeffizienzfaktor (Fangquote) multipliziert. Das Gewicht aller anderen Arten wurde ohne Fangquotierung aufaddiert, da deren Fangverlustrate im Feld weniger gut abzuschätzen ist. Schließlich wurde bei jenen Untersuchungsstellen, bei denen aufgrund des Fischvorkommens weniger als 100 m (bei sehr hohem Fischauftreten) oder mehr als 100 m (bei sehr niedrigem Fischauftreten) befischt wurden, die Biomasse auf die standardisierten 100 m berechnet. Die gleichen Faktoren wurden bei der Fischanzahlbestimmung angewendet.

2.3.6 Bestimmung der Bachforellen-Altersklassen und des Brutanteils

Die Bestimmung der Altersstruktur einer Bachforellen-Population gestaltet sich im Freiland nicht einfach, da die sichersten Methoden die Entnahme von kalzifizierten Körperstrukturen (Operculum, Schuppen oder Otolithen) ist (siehe z.B. Weatherley & Rogers 1978). Diese kamen bei dieser Studie nicht in Frage, da sie die Tötung eines Gros der Populationen bedeutet hätten.

Daher wurde für die Abschätzung der Altersstruktur die ungenauere Petersen-Methode verwendet (Weatherley 1984, S. 209 ff.). Mebes (1992) verglich die Ergebnisse der Altersstrukturabschätzung nach der Petersen-Methode mit denen nach der Schuppen-Methode und erzielte eine Übereinstimmung von 94% bis zum Alter von einschließlich 2+. Diese Methode beruht auf dem relativ starken und konstanten Wachstum der ersten drei bis vier Jahrgänge (0+ bis 3+). In einem Längen-Häufigkeitsdiagramm sind klare Spitzen zu erkennen, welche die jeweilige Altersklasse angeben. Die übrigen Mitglieder der gleichen Altersklasse streuen dann annähernd normalverteilt um diese Spitze. Individuen, deren Länge zwischen zwei solcher Verteilungen angesiedelt ist, werden bei der Analyse gewöhnlich ausgelassen. Die Petersen-Methode ist sinnvoll bis ca. zum 4. Lebensjahr, falls die Laichperiode kurz ist und die Neurekrutierung von Brut über einen relativ kurzen Zeitraum stattfindet, weil dann diskrete Größenklassen vorliegen (Pauly 1983). Diese Bedingungen treffen bei bayerischen Mittelgebirgsbachforellen-Populationen weitgehend zu. Wachstum und Produktivität einer Bachforelle sind nährstoffangebots- und temperaturabhängig (Elliott 1994; S. 78 ff.). In Folge dessen wachsen Forellen kleiner und kalter Bäche weniger stark auseinander als solche von größeren und näher am (Wachstums-) Optimum von 12 °C (Elliott 1994, pp.78 ff.) gelegenen Bächen. Deswegen darf die Abschätzung der Altersstruktur nicht unabhängig von den äußeren Bedingungen des Baches vorgenommen werden, sondern diese Informationen müssen bei der Bewertung berücksichtigt werden. Bei Bächen, bei denen die Einschätzung schwierig war, weil die Altersklassen sehr stark „zusammenwachsen“, wurde eher angenommen, daß die jeweilige Altersklasse vorhanden ist und damit die bessere Bewertung gewählt.

Die Abschätzung des Brutanteils wurde ebenfalls mit Hilfe der Altersklassenbestimmung nach der Petersen-Methode vorgenommen. Da der Wachstumsschub der Brut im ersten Jahr beträchtlich ist, war eine Unterscheidung zwischen der 0+- und der 1+-Generation meist nicht problematisch. Das Längen-Häufigkeitsdiagramm des Kalten Baches zeigt keine Anwesenheit der Brut. Da diese Befischung sehr frühzeitig im April vorgenommen wurde, war die Brut noch sehr klein, und wurde, obwohl reichlich vorhanden, bei der Befischung absichtlich geschont. Von daher erhält der Kalte Bach sowohl für die Altersstruktur als auch für den Brutanteil eine hohe Bewertung.

2.3.7 Berechnung des Bachforellen-Konditionsfaktors

Die logarithmierten Gewicht- und Längenmessungen, die von einer Fischgruppe gemacht worden sind, stehen häufig in einer sehr engen Beziehung, die sich durch eine Gleichung ausdrücken läßt. Aus verschiedenen Gründen musste für jede Population der Parameter zur Berechnung der Konditionsfaktoren gesondert berechnet werden (Details dazu siehe Klein 1998).

2.3.8 Ermittlung des Einzugsgebietes und der Höhe des Befischungsgebietes über NN

Auf der Normal- oder CD-ROM-Ausgabe der topographischen Landkarten des bayerischen Landesvermessungsamtes mit Maßstab 1:50.000 wurden die genauen Koordinaten des Befischungspunktes, die Höhe über Normalnull (NN) und das Einzugsgebiet des Gewässers oberhalb des Befischungspunktes ermittelt. Letzteres dadurch, daß das Einzugsgebiet auf Pergamentpapier gepaust und ausgeschnitten wurde, und dann der Schnipsel mit einer Analysewaage auf das genaueste 10.000stel Gramm abgewogen wurde. Die zum Gewicht korrespondierende Größe des Einzugsgebietes wurde durch Vergleich mit dem Gewicht eines standardisierten 25 cm²-Pergaments, dessen korrespondierende Fläche sich aus dem Kartenmaßstab ergibt, errechnet.

2.4 Fischunabhängige Evaluationsmethoden der untersuchten Fließgewässer

Um beurteilen zu können, ob der im Rahmen des Projekts zu etablierender „Forellenbach-IBI“ die Güte eines Gewässers bemessen kann, wurden Gütebestimmungsverfahren durchgeführt, die andere Gewässer-Parameter bemessen als der IBI. Von jedem Bach wurden zwei bis vier (je nach der Jahreszeit der Befischung) chemische Messungen durchgeführt. Weiterhin wurde von jedem Bach das Makrozoobenthos aufgenommen und bestimmt, und auf dieser Datengrundlage wurde der Saprobienindex, der im wesentlichen die organische Belastung eines Gewässers bemißt, und ein Säureindex, der die Tendenz eines Gewässers zur Versauerung bemißt, aufgenommen. Die biologischen Vergleichsindices haben den Vorteil, daß sie ähnlich wie der IBI über einen längeren Zeitraum (nämlich dem Zeitraum des Lebenszyklus der Wasserorganismen) integrieren.

Aus Zeitgründen war es nur möglich, einfache Bewertungen der physikalischen Begebenheiten der Bäche durchzuführen. Diese und die chemischen Messungen stärken jedoch das Verständnis über die gegebene ökologische Situation. Es sei darauf hingewiesen, daß in eventuell nachfolgenden, vertiefenden Arbeiten zur Anwendbarkeit eines Forellen-IBI's eine verfeinerte physikalische Aufnahme, v.a. in Bezug auf die spezifischen Habitatsansprüche der Bachforelle, und eine regelmäßige Aufnahme der chemischen Parameter unumgänglich ist.

2.4.1 Chemische Untersuchungen

Die chemischen Untersuchungen dienten zur Kennzeichnung der trophischen, saprobiellen und geologischen Situation. Zur geochemischen Typisierung der Bäche dienten die Parameter Leitfähigkeit, Gesamthärte, Karbonathärte und Calcium als relativ konstante gesteinsbürtige Parameter. Nitrat, Nitrit, Ammonium/Ammoniak und Phosphat wurden als Belastungsparameter der Gewässer gemessen. Der pH-Wert kann sowohl als gesteinsbürtiger als auch als Belastungsparameter aufgefaßt werden, da er sowohl durch den geologischen Untergrund als auch durch anthropogene Faktoren („saurer Regen“ etc.) beeinflusst wird. Neben den chemischen Faktoren zählen die physikalischen Faktoren Temperatur und Strömungsgeschwindigkeit zu den wesentlichen Komponenten des abiotischen Faktorengefüges, die ebenfalls aufgenommen wurden.

2.4.1.1 Ökologische Grundlagen der chemischen Belastungsparameter

Die Sauerstoffkonzentration ist in den untersuchten Ökosystemen eine der wichtigsten Komponenten im Nischenraum der Bachforelle, die eine Minimum-Sauerstoffkonzentration von 7-10 mg/l bei 10-17 °C als Überlebensgrenze benötigt (siehe Davis 1975; Hamor & Garside 1975, 1976; Turnpenny & Williams 1980; Crisp 1989), des Bachneunauges, daß ebenfalls erst ab 7 mg/l Sauerstoffkonzentration (Bohl 1993) angetroffen wird, und der benthische, kaltsteno-thermen Mühlkoppe (Ladiges & Vogt 1979).

Neben den anorganischen Stickstoffverbindungen ist der Gesamtphosphatgehalt ein Parameter, der den Trophiegrad eines Fließgewässerökosystems wesentlich mitbestimmt. Phosphat gehört zu den Makronährstoffen der Organismen. In den Gewässerläufen treten freies und gebundenes Phosphat nebeneinander auf, wobei das gebundene meist überwiegt. Die Konzentrationen des gelösten freien und gebundenen Phosphats bewegen sich in sauberen Fließgewässern im µg/l-Bereich, bei verunreinigten Gewässern oft auch im mg/l-Bereich. Unter natürlichen oder naturnahen Verhältnissen gelangt nur sehr wenig Phosphat in die Gewässerläufe. Meist liegt die Konzentration unter 30 µg/l (Brehm & Meijering 1994). Wasser mit weniger als 0,1 mg/l Phosphat gilt als sauber (Höll 1986).

Bei Ammoniak und Nitrit handelt es sich um sehr starke Fischgifte, auf daß v.a. die intoleranten Arten Bachforelle, Mühlkoppe und Bachneunauge (Bohl 1993) sehr empfindlich reagieren. Die toxische Wirkung von Stickstoff in seiner reduziertesten Form ist in neutralen und basischen Gewässern stärker als in sauren, da dieser hier mehr in der giftigen Ammoniakform vorliegt, während in sauren Gewässern das chemische Gleichgewicht zum ungiftigen Ammonium hin verschoben ist. Eine Belastung mit diesen Chemikalien gibt einen starken Hinweis auf dauerhafte Reduktionsprozesse, die in den gewöhnlich annähernd sauerstoffgesättigten Bachforellengewässern auf eine Störung des Ökosystems schließen lassen.

Als lebens- und wachstumslimitierender Faktor spielt die Wasserstoffionenkonzentration von Fließgewässern eine große Rolle. Sowohl die Invertebraten- als auch die Vertebratenfauna ändert sich drastisch nach Versauerungsprozessen. So sind Gammariden und Eintagsfliegenlarven der Familien Baetidae und Heptageniidae sehr säureempfindlich (Morrison 1989). Von Bachforellen ist bekannt, daß sie unterhalb einer kritischen Grenze von pH 5 schwere Flossen- und Schwanzdeformationen erleiden (Maitland et al. 1987) und auf Dauer, insbesondere wegen der größeren Anfälligkeit der Brut gegenüber sauren Bedingungen in diesen Habitaten nicht überleben können.

2.4.1.2 Datenaufnahme der chemischen Parameter

Für über die tabellarische Übersicht hinausgehende methodische Details sei auf Klein (1998) verwiesen. An dieser Stelle soll eine Übersicht über die Messverfahren der jeweiligen Parameter genügen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Gemessene chemische Parameter und angewandte Methode

Parameter	Methode	Meßbereich
Elektrische Leitfähigkeit	elektrometrisch mit Hanna-Leitfähigkeitstester	µS, kontinuierlich
pH-Wert	elektrometrisch mit Hanna-pH-Tester pHep	kontinuierlich
Sauerstoffsättigung- und -konzentration	elektrometrisch mit WTW Oximeter Oxi 191	%/ mg/l; kontinuierlich
Gesamthärte	Testkit Tetratest Gesamthärte	1 °dH
Karbonathärte	Testkit Tetratest Karbonathärte	1 °dH
Calciumkonzentration	Testkit Merck Merckoquant 10083	5, 10, 25, 50 mg/l
Ammonium-/Ammoniakkonz.	Testkit Merck Aquaquant 14428	0,025; 0,05; 0,075; 0,1 0,15; 0,2; 0,3; 0,4 mg/l
Nitritkonzentration	Testkit Merck Nitrit-Test 1.14658	0,025; 0,05; 0,1; 0,15 mg/l
Nitratkonzentration	Testkit Macherey-Nagel Visocolor Nitrate 50	1, 2, 5, 10, 20, 50 mg/l
Gesamtphosphatkonz.	photometrisch	µg/l; kontinuierlich
Temperatur	elektrometrisch mit WTW-Oximeter 191	°C; kontinuierlich

2.4.2 Saprobienindex

2.4.2.1 Ökologische Grundlage zum Saprobienindex

Saprobie ist als „Umsatz und Biomasse von heterotrophen Destruenten“ definiert (Schwörbel 1987). Saprobien sind Organismen, die Saprobie in Abhängigkeit von zersetzlichen, organischen Nährstoffen anzeigen (Kolkwitz & Marsson 1902). Durch den Abbau organischer Substanzen werden Nährstoffe, v.a. Nitrat und Phosphat, freigesetzt, die die Trophie des Fließgewässers, also Biomasse und Umsatz von autotrophen Produzenten (Schwörbel 1987), erhöhen. Da Produktion, Konsumption und Destruktion in einem dynamischen Gleichgewicht

miteinander verbunden sind (ausführliche Diskussion in Schmedtje 1984), machen Saprobiewerte auch eine Aussage über den Trophiegrad eines Fließgewässers.

Durch die Analyse der Makrozoobenthos-Lebensgemeinschaft, welche aus Destruenten und Konsumenten besteht, kann eine Aussage über die saprobielle Situation gemacht werden, da sich diese entlang eines Gradienten zunehmender organischer Belastung signifikant verändert.

2.4.2.2 Makrozoobenthos-Datenaufnahme

Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Untersuchungsstellen zu erreichen, muß die angewandte Methode stringent durchgeführt werden. Bei der von uns gewählten halbquantitativen Sampleprozedur (Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg 1992) wurden an jeder Untersuchungsstelle alle vorgefundenen Habitate (grobe Steine, Substrat, Pflanzenbewuchs, Schnellwasserbereiche und ruhige Zonen etc.) gleichmäßig und gegeneinander gewichtet (d.h. wenn ein Habitattyp nicht vorhanden war, wurde der jeweils dominierende Typus vermehrt berücksichtigt) nach Makrozoobenthos abgesucht. Diese Verfahrensweise ist nach Schwörbel (1987) ausgewogener, da es besser sei, in einem größeren Areal qualitativ zu sammeln als in einem kleinen quantitativ, da nur so die gesamte Makrozoobenthos-Biozönose adäquat berücksichtigt wird.

An jeder Untersuchungsstelle war die Verweildauer ungefähr eine Stunde, was einer reinen Suchdauer von ca. 20 Minuten entspricht; die Untersuchungsstellen wurden hauptsächlich Ende Oktober bis Ende November beprobt (siehe genaues Datum der jeweiligen Untersuchung im Ergebnisteil), da vorher aufgrund des Lebenszyklusses der Insekten die Bestandsdichte nicht ausreichend war. Die Tiere wurden mit einem Küchensieb (Maschenweite 1,5 mm; Durchmesser 15 cm) und mit einem feinen Fischnetz (Maschenweite 0,5 mm, Durchmesser 30 cm) gefangen und anschließend in 99% Ethanol konserviert. Turbellarien wurden lebend bestimmt. Bei der Untersuchung des Substrates wurde die *kick-sampling*-Methode angewandt: hierbei wird das Fischnetz in Strömungsrichtung gehalten und mit dem Fuß bis in ca. 10 cm Tiefe Substrat in das Netz hineingetreten. Für die Untersuchung des Pflanzenbewuchses wurde sowohl das Fischnetz als auch das Küchensieb verwendet. Die Netze, Siebe und Steine wurden anschließend mit einer Federstahlpinzette abgelesen. Die Häufigkeiten wurden nach Beendigung der Datenaufnahme in sieben Kategorien eingeteilt, die von Einzelvorkommen (Klasse 1) bis zu „Massenaufkommen“ (Klasse 7) reichten, ermittelt. Die Bestimmung der Tiere erfolgte anschließend im Labor. Verwendet wurde ein Stereomikroskop mit zehnfacher bis vierzigfacher Vergrößerung. Von den einzelnen Untersuchungsstellen wurden Belegsammlungen angelegt. Folgende Bestimmungsliteratur wurde benutzt: Illies (1955), Sedlak (1985), Brohmer (1988), Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft (1992), Studemann et al. (1992),

2.4.2.3 Berechnung des Saprobienindex'

Der Saprobienindex wird errechnet nach der Formel

$$S = (\sum (s_i \cdot A_i \cdot G_i)) / (\sum (A_i \cdot G_i))$$

Hierbei ist s_i der Indikatorwert des i-ten Taxons, A_i die Häufigkeitsklasse des i-ten Taxons und G_i die ökologische Gewichtung bzw. Valenz des i-ten Taxons. Die von uns verwendeten Indikatorwerte der einzelnen Taxa entsprechen denen der DIN-Liste (Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft 1992). Der Saprobienindex ist eine dimensionslose Zahl zwischen 1 und 4, die Gewichtung wird vorgenommen mit dimensionslosen Zahlen zwischen 1 und 16. Um das Ergebnis statistisch abzusichern, wird das Streuungsmaß angegeben. Allgemein wird das Ergebnis dann nicht mehr als statistisch abgesichert betrachtet, wenn das Streuungsmaß größer als 0,2 ist oder wenn die Summe der Einzelhäufigkeiten kleiner als 15 ist (Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg 1992). Die Taxalisten und Abundanzen, die für die Bestimmung der Saprobienindices ermittelt wurden, wurden auch für die Ermittlung des Versauerungsbefundes verwendet.

2.4.3 Biologischer Versauerungsbefund

Auf der Grundlage der mehrjährigen chemischen Untersuchungen zur Gewässerversauerung vorwiegend in süddeutschen Mittelgebirgen wurde als Bezugsbasis für die biologische Indikation eine hydrochemische Einteilung der Fließgewässer in vier verschiedene Säurezustandstypen auf Basis des pH-Regimes entwickelt (vgl. Braukmann 1992). Danach lassen sich die kalkarmen, versauerungsgefährdeten Fließgewässer chemisch in vier Typen im Hinblick auf ihren gegenwärtig gemessenen Säurestatus einteilen. Die Säureempfindlichkeit der Makrozoobenthos-Taxa wurde empirisch ermittelt und in säureempfindliche (Zeigerwert 1), mäßig säureempfindliche (Zeigerwert 2), säuretolerante (Zeigerwert 3) und säureresistente Taxa (Zeigerwert 4) eingeteilt, die in den entsprechend sauren Lebensräumen überleben können (Zeigerwerte der Taxa in Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft 1994). Die Abundanzen der Taxa mit Zeigerwert 1 werden bis zu einem Mindestschwellenwert, der sich aus einer Häufigkeitsklassensumme von 4 ergibt, aufsummiert. Wird diese Schwelle für Klasse 1 erreicht, so kann das Gewässer als permanent nicht sauer klassifiziert werden, wird diese erst bei Klasse 2 erreicht, als episodisch schwach sauer u.s.w.. Wird bis zur Klasse 4 die Abundanz von 4 nicht erreicht, kann über den Säurezustand keine Aussage gemacht werden. Das Verfahren führt nur in kalkarmen und unbelasteten Gewässern der Güteklasse I und I-II zu plausiblen Ergebnissen und ist auch nur dort sinnvoll, denn kalkreiche und/oder mäßig bis stärker abwasserbelastete Gewässer sind generell (wegen guter Pufferungseigenschaften) nicht sauer.

2.5 Molekulargenetische Analysemethoden

Um die verschiedenen Fragestellungen zu bearbeiten, wurden entweder mitochondrielle Marker, oder Mikrosatelliten Marker verwendet. Im Folgenden sind die molekularbiologischen und analytischen Methoden beschrieben, die in den verschiedenen Projekten angewandt wurden. Auf spezielle Ausführungen und Erklärungen wird aber auch in den jeweiligen Kapiteln gesondert eingegangen.

2.5.1 Eingesetzte Marker

2.5.1.1 Mitochondrielle DNA

Das mitochondrielle Genom ist haploid, ringförmig und in Vertebraten ungefähr 16-18 kb groß. 13 Proteine, 22 tRNAs und zwei rRNAs sind darauf kodiert. Die regulatorische Region, auch Kontrollregion oder D-loop genannt, ist die Region, in der die Replikation des Genoms beginnt. Sie liegt zwischen den Genen für die Pro-t-RNA und die Phe-t-RNA. Die Mutationsrate in der mt-DNA ist ca. 5-10 Mal höher als im Kerngenom (Brown et al. 1979), was vor allem auf eine geringere Effektivität der DNA-Reparaturmechanismen zurückgeführt wird (Wilson et al. 1985). Grundsätzlich nimmt man an, daß wegen der Haploidie des mitochondriellen Genoms, nur ein „Allel“ vorkommt und Rekombination nicht stattfindet. Doch konnte schon die Koexistenz von verschiedenen mt-DNA Typen in einem Individuum gezeigt werden (Wilkinson & Chapman 1991, Hoelzel et al. 1993). Auch mehren sich Belege, daß Rekombination im mt-Genom vorkommen kann (Eyre-Walter et al. 1999, Hagelberg et al. 1999). In den letzten Jahren wurde in verschiedensten Organismen gezeigt, daß Teile des mitochondriellen Genoms in das Kerngenom integriert haben (Zischler et al. 1995, Zhang & Hewitt 1996, Greenwood & Pääbo 1999). Das kann dazu führen, daß bei der Amplifizierung von Abschnitten der mt-DNA auch nukleäre Kopien vermehrt werden, die sich aufgrund unterschiedlicher Mutationsraten von mitochondrieller und nukleärer DNA in ihrer Sequenz sehr unterscheiden können. In manchen Fällen wird auch nur die Kernkopie amplifiziert, was daran erkannt werden kann, daß eine unerwartet geringe oder gar keine Variabilität innerhalb von Arten festzustellen ist. Grundsätzlich aber eignet sich das mitochondrielle Genom gut für phylogenetische Studien. Die Kontrollregion, die häufig eine noch höhere Mutationsrate als der Rest des mt-Genoms zeigt, hat sich als besonders geeignet für innerartliche Studien erwiesen.

2.5.1.2 Mikrosatelliten

Mikrosatelliten, ursprünglich „*simple sequence repeats*“ (SSR) genannt, sind hochpolymorphe Abschnitte, die über das gesamte nukleäre Genom verteilt sind. Sie bestehen aus tandemartig wiederholten Einheiten von 2-5 bp langen DNA-Motiven und können im Säugetiergenom an bis zu 10^6 Loci vorliegen (Tautz 1993). Aufgrund des repetitiven Aufbaus der Mikrosatelliten, kann es bei der Replikation zu einem sogenannten „*slippage*“ kommen, einer Fehlpaarung der beiden DNA-Stränge und somit zu einer Veränderung der Länge des Mikrosatelliten (Levinson & Gutman 1987). Man führt das hohe Maß von Längenpolymorphismen bzw. die hohe Mutationsrate dieses DNA-Typs im wesentlichen auf diesen Mechanismus bei der Replikation zurück. Die Mutationsrate wird auf 10^{-2} bis 10^{-5} pro Gamet und Generation geschätzt. Das „*Single locus fingerprinting*“ dient dazu, diese Längenpolymorphismen zu detektieren, und sie sich für evolutionsbiologische Fragestellungen als Marker zu Nutzen zu machen. Mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) werden die Mikrosatelliten amplifiziert und anschließend durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt (Tautz 1989). Im Gegensatz zum „*fingerprinting*“ mittels Minisatelliten, deren Wiederholungseinheiten bis zu 100 bp lang sind, (Jeffreys 1985a, b), sind beim Mikrosatelliten-„*fingerprinting*“ nur kleinste DNA Mengen erforderlich. Deshalb ist diese Methode auch in forensischen Labors zum Standard geworden. Mikrosatelliten sind aber auch in der Humangenetik von Bedeutung, da Krankheiten wie Chorea-Huntington und Fragiles X durch die starke Erhöhung der Kopienanzahl von Wiederholungseinheiten entstehen.

Um Schlußfolgerungen über die genetische Struktur von Populationen anhand von Mikrosatellitendaten ziehen zu können, ist es wichtig, die zugrundeliegenden Mutationsprozesse dieser DNA Abschnitte zu verstehen. Verschiedene Modelle wurden vorgeschlagen, wobei sich vor allem zwei etabliert haben. Das „*infinite allele model*“ (IAM) geht davon aus, daß bei jeder Mutation ein neues Allel entsteht, dessen Länge unabhängig von der Länge des ursprünglichen Allels ist. Dieses Modell wird z.B. für die Auswertung von Allozym-Daten eingesetzt. Das „*stepwise mutation model*“ (SMM) nimmt an, daß jede Mutation die Allelgröße um eine Wiederholungseinheit erhöht oder erniedrigt und entspricht somit dem Mechanismus des „*slippage*“.

Man unterscheidet verschiedene Typen von Mikrosatelliten, die sich auch in ihrer Mutationsrate unterscheiden. Grundsätzlich scheinen di-nukleotid Wiederholungseinheiten eine höhere Mutationsrate zu haben als tri- oder tetra-nukleotid Einheiten. Man findet auch zusammengesetzte Mikrosatelliten aus verschiedenen Wiederholungseinheiten und unterbrochene Mikrosatelliten, bei denen das Wiederholungsmotiv von einer nicht-repetitiven Abfolge unterbrochen ist. Unterbrochene Loci sind oft stabiler und damit weniger variabel als rein repetitive Mikrosatelliten. Mutationen in den Primer-Regionen der Mikrosatelliten können dazu führen, daß bestimmte Allele nicht amplifiziert werden (Nullallele) und somit fälschlicherweise ein Überschuß an Homozygoten erhalten wird. Das kann zu falschen Schlußfolgerungen bezüglich der Populationsstruktur führen.

2.5.2 Labormethoden

2.5.2.1 DNA-Extraktion

2.5.2.1.1 Bachforellen und Seesaiblinge

Ungefähr 3 mm² des Schwanzflossengewebes wurden in 250 µl einer 10%-igen Chelex-Lösung mit 2 µl Proteinase K [14 mg/ml] für 3 Stunden bei 55°C verdaut. Anschließend wurde die Proteinase K bei 100°C für 10 Min denaturiert. Mittels Zentrifugation für 3 Min bei 8 000 Upm wurde das Chelex sedimentiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die resultierende DNA-Lösung wurde 1:10 verdünnt und in die folgenden Reaktionen eingesetzt.

2.5.2.1.2 Mühlkuppen

Die genomische DNA der Mühlkuppen wurde mit einer Salz-Chloroform-Extraktion isoliert. Etwa 3 mm² Flossengewebe wurden für 3 Stunden in 250 µl Homogenisierungspuffer (EDTA 80 mM, Tris-HCl 100 mM, 0,5% SDS) und 2 µl Proteinase K [14 mg/ml] bei 55°C inkubiert. Nach dem vollständigen Verdau des Gewebes, wurde die DNA mit 1 Vol NaCl (4,5 M) und 1 Vol Chloroform extrahiert und von Proteinen gereinigt. Die DNA wurde mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt und in 30 µl H₂O aufgenommen. Die resultierende DNA-Lösung wurde 1:10 verdünnt und so für die folgenden Reaktionen verwendet.

2.5.2.2 Amplifikation von DNA mit PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Alle PCRs wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Je nach Volumen wurden zwischen 10 und 30 ng DNA pro Reaktion eingesetzt. Es wurde der zu der jeweiligen Taq-Polymerase gehörende 10x Standardpuffer (15 mM MgCl₂) eingesetzt. Die Endkonzentration der desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTP) in den Reaktionsansätzen betrug 200 µM, die der Primer je 1 µM. Alle Reaktionen wurden in PTC-100 oder PTC-200 PCR-Maschinen (MJ-Research) durchgeführt.

2.5.2.2.1 Amplifikation und Detektion von Mikrosatelliten

Die Mikrosatelliten wurden in einem Volumen von 10 µl amplifiziert. Hier wurde die *Ampli*-Taq-Polymerase (Perkin Elmer) eingesetzt (0,25 U/10 µl). Einer der Primer wurde jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, um die erhaltenen Mikrosatelliten-Fragmente auf dem automatischen Sequenzierer (ABI™377, Perkin Elmer) detektieren zu können. Das Reaktionsprofil wurde nach Brownstein et al. (1996) eingestellt, um ein möglichst sauberes „*slippage*“-Muster zu erhalten. Die Vordenaturierung bei 95°C dauerte 1 Min. Anschließend folgten 10 Zyklen mit 30 Sek bei 93°C, 45 Sek bei der jeweiligen *Annealing*-Temperatur und 1 Min bei 72°C. Daran schlossen weitere 20 Zyklen mit 30 Sek bei 89°C, 45 Sek *Annealing* und 1 Min bei 72°C an. Um möglichst an alle Fragmente ein zusätzliches Adenosintriphosphat durch die Taq-Polymerase angehängt zu bekommen, wurden die Reaktionen abschließend 30 Min auf 72°C gehalten. Je nach Ausbeute der PCR wurden zwischen 0,25 und 0,8 µl des Produkts auf das Gel geladen. Pro Spur wurden bis zu drei verschiedene Mikrosatelliten-Loci kombiniert. In jeder Spur wurde auch ein interner Längenmarker aufgetragen, um anschließend die Größe der Fragmente bestimmen zu können.

Tabelle 7: Mikrosatellitenloci, PCR-Primersequenzen und PCR-Annealing-Temperaturen für alle in der Studie verwendeten nukleären genetischen Marker, sowie Kurzangabe der Literaturstellen, in denen die Loci und Primer das erste Mal beschrieben wurden. Fett gedruckt ist der am 5'-Ende zusätzlich angehängte „pig-tail“.

Locus	Primersequenzen	°C	Referenz	verwendet für
543AEU	5' \ ATT CTT CGG CTT TCT CTT GC 5' \ ATC TGG TCA GTT TCT TTA TG	55	Estoup et al. 1998	Bachforelle
BS131	5' \ CAC ATC ATG TTA CTG CTC C 5' \ CAG CCT AAT TCT GAA TGA G	55	Estoup et al. 1998	Bachforelle
MST-85	5' \ GGA AGG AAG GGA GAA AGG T 5' \ GGA AAA TCA ATA CTA ACA A	55	Estoup et al. 1997	Bachforelle Seesaibling
SFO-8	5' \ CAA CGA GCA CAG AAC AGG 5' \ CTT CCC CTG GAG AGG AAA	55	Angers et al. 1995	Bachforelle Seesaibling
SSA-85	5' \ AGG TGG GTC CTC CAA GCT AC 5' \ GTT TCT TAC CCG CTC CTC ACT TAA TC	54	O'Reilly et al. 1996	Bachforelle Seesaibling
Sa72ZIM	5' \ AAC TTC AAG ATA TAT GAT GT 5' \ ATT CGT TTA GTC TGA GAA	43	Englbrecht unveröffentlicht	Seesaibling
COCI-3	5' \ GTT TCA GGT TTG GTA AGC AAG 5' \ AGT GTA ATA AAT CAC CCG AG	55	Bernatchez unpublished	Seesaibling
SSOSL-85	5' \ TGT GGA TTT TTG TAT TAT GTT A 5' \ GTT TAT ACA TTT CCT CCT CAT TCA G	53	Slettan et al. 1995	Seesaibling

2.5.2.2.2 Amplifizierung der Kontrollregion und des ND5/6 der mitochondrialen DNA

Die Amplifizierung der Kontrollregion wurde in einem Volumen von 30 µl durchgeführt. Für alle Reaktionen wurde die *Expand High Fidelity* Taq-Polymerase (Roche) benutzt [0,35 U/10 µl], die sich durch eine erhöhte Fehlerkorrekturrate auszeichnet. Das Reaktionsprofil bestand aus 2 Min Vordenaturierung bei 95°C und anschließend 30 Zyklen mit 1 Min bei 94°C, 1 Min bei der jeweiligen *Annealing*-Temperatur und 1 Min bei 72°C. Abschließend wurde 5 Min bei 72°C inkubiert, um eine vollständige Beendigung aller Strangverlängerungen zu gewährleisten.

Tabelle 8: Mitochondriale Genabschnitte, die zur Amplifikation dieser Abschnitte verwendeten PCR-Primersequenzen, die dazugehörigen PCR-Annealing-Temperaturen sowie Kurzangabe der Literaturstellen, in denen die Loci und Primer das erste Mal beschrieben wurden.

Locus	Kürzel	Primersequenzen 5' Ende --->	°C	Referenz	Sequenzier primer
D-Loop Cottus	L 19 HN 20	CA CTA GCT CCC AAA GCT A ATC TGG TCA GTT TCT TTA TG	50	Bernatchez 92 Bernatchez et al. 93	L19
D-Loop Salvelinus	L 19 H 17	CCA CTA GCT CCC AAA GCT A ACT TTC TAG GGT CCA TC	50	Bernatchez 92 Bernatchez et al. 92	H17
D-Loop Salmo	L 19 H 17 H2	CCA CTA GCT CCC AAA GCT A ACT TTC TAG GGT CCA TC CGT TGG TCG GTT CTT AC	50	Bernatchez 92 Bernatchez et al. 92 Bernatchez et al. 93	L19/H2
ND5/6 Salmo	ND5/6A ND5/6B ND5A-2 ND5A-3 3ND5A-4 ND6B-2 ND6B-4 ND5A-2rC	AAT AGC TCA TCC ATT GGT CTT AGG TAA CAA CGG TGG TTT TTC AAG TCA ACC TCA CAC TCC CAC TCA TA AAC CTT GCT AGC TAC CTC CT GTA TCC CAC CCC CCT GAG AG GTC TTT ATT TCT TTT AGG GT GGA GGT AGC TAG CAA GGT TA TAT GAG TGG GAG TGT GAG GT	50	Nielsen et al. 98 Nielsen et al. 98 Miller unveröffentl. Miller unveröffentl. Miller unveröffentl. Miller unveröffentl. Miller unveröffentl.	alle

2.5.2.3 Aufreinigung der mitochondrialen Fragmente und Sequenzierung

Die Kontrollregion wurde ebenfalls mit dem System ABI™377 (Perkin Elmer) direkt sequenziert. Die Sequenzreaktion wurde mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden durchgeführt. Deshalb mußten die überschüssigen Primer aus der Primär-PCR vor der Sequenzreaktion entfernt werden, um nicht zwei Sequenzen pro Reaktion zu erhalten. Die Primärreaktion wurde durch Filtern mit Ultrafree-Röhrchen (Millipore) von Primern und Nukleotiden gereinigt. Die Sequenzreaktionen entsprachen dem „Cycle-sequencing“ Protokoll von Perkin Elmer und fanden in einem Volumen von 10 µl statt. Es wurden ca. 300 ng des zu sequenzierenden Fragments, 2 µM eines Primers und 2 µl des „Big-Dye-TerMinator“ Reaktionsgemisches (Perkin Elmer) eingesetzt. Das Reaktionsprofil entsprach 20 Sek bei 95°C Denaturierung, 10 Sek bei der jeweiligen Annealing-temperatur und 4 Min bei 60°C Elongation. Es wurde 30 Mal wiederholt. Anschließend wurden die Sequenzen mittels einer Sephadex-G50 Matrix (AmershamPharmacia) von überschüssigen Nukleotiden gesäubert, eingetrocknet, in Ladepuffer (AmershamPharmacia) aufgenommen und auf das Sequenzgel geladen. Nach dem Sequenzlauf, bei dem die Fragmente aufgetrennt und detektiert wurden, folgte die Auswertung der Rohdaten mit dem Programm SEQUENCE ANALYSIS (Perkin Elmer) und die anschließende Weiterbearbeitung in dem Programm SEQUENCE NAVIGATOR (Perkin Elmer). Die Sequenzen der verschiedenen Proben wurden in dem Programm CLUSTALW (Thomson et al. 1994) ihrer Ähnlichkeit nach untereinander angeordnet, mit Hand verbessert und anschließend mit Programmen zur Stammbaumrekonstruktion ausgewertet.

2.5.2.4 RFLP-Analyse mitochondrialer Genabschnitte

2.5.2.4.1 Das Prinzip der RFLP

Bei der RFLP-Analyse werden Restriktionsenzyme verwendet, die die DNA an einer spezifischen Kennsequenz schneiden. Restriktionsenzyme sind eine Klasse von Doppelstrang-DNA spaltenden Enzymen, die im Gegensatz zu anderen DNasen sequenzspezifisch spalten und daher je nach Häufigkeit und Lage der betreffenden Schnittsequenzen zu mehr oder weniger großen, exakt definierten DNA-Fragmenten führen. Bei den hier verwendeten Restrik-

tionsenzymen handelt es sich um Typ II - Enzyme, bei denen die Schnittstelle innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der Erkennungssequenz liegt. Die Restriktionsenzyme stammen aus Mikroorganismen, wo sie wohl eine Schutzfunktion erfüllen. Dringt nämlich fremde DNA in den Organismus ein, können die Restriktionsenzyme das von ihr ausgehende Gefährdungspotential durch Zerschneiden abmindern und die in ihr enthaltene genetische Information kommt nicht zur Replikation bzw. wird nicht exprimiert (ausgeprägt). Organismeneigene DNA hingegen ist durch Methylierung der Kennsequenzen vor der Wirkung der Restriktionsenzyme geschützt.

Da bei der Untersuchung bayerischer Bachforellenpopulationen hauptsächlich die Unterscheidung zwischen atlantischen und danubischen Typen interessant ist, wurden in gemeinsamen Überlegungen mit Louis Bernatchez, Uli Schliwen und Kornelia Rassmann während des ersten Workshops des TROUT CONCERTs (EU FAIR-Programm CT97 3882, vom 29.6.-5.7.1998 in Silkeborg, Dänemark) Restriktionsenzyme ausgewählt, die besonders zur Klärung dieser Fragestellung geeignet sind. Dabei legte man sich auf folgende vier Enzyme fest (Tabelle 9):

Tabelle 9: Restriktionsausschnittstellen der 4 untersuchten Enzyme

Restriktions- enzym	Erkennungssequenz und Schnittstelle („I“)
AluI	AGICT
Avall	GIGACC oder GIGTCC
MbolI	I(N) ₇ TCTTC
TaqI	TICGA

Zur effizienten Arbeitsgestaltung wurden die folgenden Restriktionsverdau mit einer SLG-Multipette pipettiert und als Reaktionsgefäße die gleichen tubes wie bei der PCR (siehe 2.3.2) verwendet. Nach dem Verteilen der Stammlösung der Restriktionsenzyme (siehe 2.1) werden jeweils 4,5µL des PCR-Produktes zugegeben. Daraus ergibt sich ein Gesamtreaktionsvolumen von 20µL. Unmittelbar nach Beendigung des Pipettiervorgangs werden die 0,5mL Röhrchen fest verschlossen und inkubiert. Dazu stellt man die PCR-Racks (Fa. Roth, Kat. No. K 82x.1) mit den Enzymen AluI, Avall und MbolI in einen auf 37°C temperierten Trockenschrank, die TaqI-Verdau kommen in ein 65°C warmes Wasserbad. Nach drei Stunden sind die Reaktionen abgeschlossen, die Röhrchen werden 15 Sekunden bis 13 000 U/min zentrifugiert um die Kondensattröpfchen zu sammeln, und eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

2.5.2.4.2 Analyse der Restriktionsfragmente

Nach dem Restriktionsverdau gilt es nun, das im Reaktionsgefäß vorliegende Gemisch von Restriktionsfragmenten mittels Elektrophorese voneinander zu trennen und sichtbar zu machen.

Prinzipiell ist die Gelelektrophorese mit der unter 2.3.2 beschriebenen PCR-Kontrolle identisch, es erfordert aber einige Modifikationen. So wird hier ein 15 cm langes Gel gegossen, wobei auf gleichmäßige Dicke und Blasenfreiheit besonders geachtet werden muß. Für zwei Gele (2%ig) werden in einen 500mL Erlenmeyer-Kolben (Weithals) 6g Agarose eingewogen und 300mL 1x TBE-Puffer zugegeben, kurz geschwenkt und in der Mikrowelle auf höchster Stufe 8min. erhitzt. Dabei muß durch ständige Kontrolle und ggf. kurzes Schwenken ein Überlaufen durch Siedeverzug verhindert werden. Nach vollständigem Schmelzen der Agarose ist die Flüssigkeit farblos klar. Vor dem Gießen der Gele werden noch 5µL EB pro Kolben zugegeben und vermischt. Der Kamm, welcher nach Erhärten der Matrix die Taschen zum Laden des RFLP-Produkts hinterläßt, ist einen Millimeter dick und hat 24 Zähne mit den Maßen 7,5 x 3 mm. Daraus ergibt sich ein Taschenvolumen von ungefähr 16µL, je nach Dicke des Gels. Die erhärteten Gele werden nun in die Gelwannen eingesetzt und mit 1x TBE-Puffer millimeterhoch bedeckt.

In die Röhrchen mit dem RFLP-Produkt werden dann jeweils 8 µL des zehnfachen Ladepuffers pipettiert und 14 µL der Mischung in die Geltaschen eingefüllt. In Spur eins und 24, ggf. auch bei Beginn eines neuen Enzyms zwischendurch, werden jeweils 5 µL 1 kb-Marker und 5 µL 50 bp-Leiter pipettiert, um nach Abschluß der Laufzeit die Länge der Fragmente abschätzen zu können. Ist ein Gel fertig geladen, kommen in den Puffer auf der Anodenseite 3 µL EB. Dann werden unverzüglich 35V Spannung angelegt und die Fragmente im Gel über Nacht (ca. 16 Stunden) aufgetrennt. Dabei wandern die kürzeren Fragmente wegen ihres günstigeren Ladungs-/Größenverhältnisses schneller durch die Gelmatrix auf die Anode zu als die längeren. Dabei interkalieren die EB-Moleküle, die sich ihnen entgegen auf die Katode zubewegen, mit der DNA. So können die Banden später unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Zur Auswertung wird das Bandenmuster photographiert und mit Hilfe der beidseitigen Marker-muster analysiert. Rein rechnerisch ergibt sich bei einer Kennsequenz von vier Basenpaaren Länge alle 256 Basen eine Schnittstelle, in der Praxis aber differieren die Fragmentgrößen innerhalb eines Bereichs von unter zehn bis über 1 000 Basen Abstand bei den hier verwendeten Restriktionsenzymen. Definitionsgemäß muß pro Enzym die Summe aller Fragment-längen die Ausgangsgröße der durch die Primer begrenzten Gensequenz ergeben. Mit den hier verwendeten 2%igen Agarosegelen lassen sich Fragmente, die kleiner als 150bp sind, aber kaum detektieren, was zu einer unvollständigen Gesamtsumme der Einzelfragmentgrößen führen kann. Dadurch geht auch ein Teil der Sequenzinformation verloren, da Schnittstellen-verluste oder -aquirierungen unter Umständen nicht bemerkt werden. Die Schnittmuster der einzelnen Proben werden mit Großbuchstaben kodiert. Auseinander hervorgehende Typen können ermittelt werden, wobei jede fehlende oder neu erworbene Schnittstelle mindestens eine Mutation im Genom kennzeichnet.

2.5.2.5 Klonierung von Mikrosatelliten

Grundsätzlich folgt die Klonierung der Mikrosatelliten dem Protokoll von Rassmann et al. (1991), wobei als Vektoren der Phage M13mp19 (Stratagene) für den Seesaibling und das Plasmid pZErO-2™ (Invitrogen) für die Mühlkoppen eingesetzt wurden.

2.5.2.5.1 Isolierung und Restriktionsverdau genomischer DNA und Herstellung einer Genbank

Hochmolekulare genomische DNA des Seesaiblings wurde aus Muskelgewebe (ca. 10 g) hergestellt, die der Mühlkoppe aus den Flossen mehrerer Tiere. In beiden Fällen wurde das Gewebe mit einem Skalpell in kleine Teile geschnitten und anschließend in 10 ml Homogenisierungspuffer (EDTA 80 mM, Tris-HCl 100 mM, 0,5% SDS) und 20 µl Proteinase K [14 mg/ml] aufgenommen und bei 55°C für ca. 3 Stunden inkubiert. Nach dem vollständigen Verdau des Gewebes, wurde die DNA mit 1 Vol NaCl (4,5 M) und 1 Vol Chloroform extrahiert und von Proteinen gereinigt. Die DNA wurde mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt und in 100 µl H₂O aufgenommen. Ungefähr 10 µg der genomischen DNA wurden mit dem Restriktionsenzym *A*/I (3 U/µg DNA) für 3 Stunden bei 37°C verdaut. Die so geschnittene DNA wurde über Nacht auf einem 0,8%-igen präparativen Agarosegel bei 20 Volt aufgetrennt. Die Fragmente mit einem Größenbereich zwischen 300 und 500 bp wurden anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und bei 80 V für 30 Min elektrisch eluiert. Anschließend wurde die DNA mit 1/10 Vol 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2 Volumen EtOH 100% gefällt und das Präzipitat in 30 µl H₂O aufgenommen.

2.5.2.5.2 Ligation und Transformation der Fragmente

Um die Fragmente in die Vektoren ligieren zu können, wurde der Phage M13mp19 mit *Sma*I, und das Plasmid pZErO-2™ mit *EcoRV* verdaut. Das molare Verhältnis von Fragment:Vektor im Ligationsansatz betrug ca. 3:1, wobei ca. 100 ng des Vektors eingesetzt wurden. Die Ligationen wurden jeweils in XL-1 *E. coli* Zellen (Stratagene) transformiert und ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.5.2.5.3 Detektion der Mikrosatelliten-Klone mittels radioaktiv markierter Sonden

Die Phagen-Plaques (M13mp19) oder Bakterien-Kolonien (pZErO-2™) wurden nach Abkühlen der Platten auf Raumtemperatur mit Nitrocellulose-Filtern (Schleicher & Schull) abgezogen. Nach der Denaturierung der Proteine und der DNA wurde die DNA für 1 Std. bei 80°C auf den Filtern fixiert. Anschließend wurden die Filter mit radioaktiv endmarkierten (GT)₇G und (AG)₇A Sonden bei 39°C für 3 Std. hybridisiert (Hybridisierungslösung: 5xSSC, 10 mM Pyrophosphat, 0,1% SDS, 50µg/ml Heparin, 5g/l Boehringer Blocking Reagenz). Im Folgenden wurden die Filter 3x 10 Min gewaschen (Waschpuffer: 2xSSC, 0,1% SDS), dicht in Folien eingeschweißt und die positiven Klone mit einem „Bio Imaging Analyzer“ (Fuji, BAS-1000) detektiert.

2.5.2.5.4 Isolierung der M13mp19 und pZErO-2™ DNA und deren Sequenzierung

Die positiven Phagen-Plaques und die pZErO-2™ Kolonien wurden in 3 ml LB Medium (Gibco) angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die anschließende Isolierung der Vektor-DNA erfolgte nach den Protokollen in Sambrook et al. (1989). Zur Sequenzierung der integrierten DNA wurden zwischen 100 und 200 ng der Vektor-DNA eingesetzt. Die Sequenzreaktion entsprach der für mitochondriale Sequenzen (II.2.3.). Die *Annealing*-Temperatur lag bei 37°C. Die Sequenzen wurden auf dem automatischen Sequenzierer ABI™377 (Perkin Elmer) detektiert. Wenn die Sequenzen Mikrosatelliten mit Mindestens 8 Wiederholungseinheiten enthielten, wurden mit Hilfe des Programms OLIGO™4.05 (Rychlik 1992) Primer für die flankierenden Sequenzen entwickelt.

2.5.2.6 Auswertung der Rohdaten der Mikrosatellitenanalyse

Die Rohdaten wurden mit dem Programm GENESCAN (Perkin Elmer) ausgewertet, wobei die Länge und die Intensität der Fragmente bestimmt wird. Die Endauswertung und Darstellung der Fragmente wurde in dem Programm GENOTYPER (Perkin Elmer) durchgeführt. Für die weiterführende Auswertung der Daten wurden verschiedene populationsgenetische Programme eingesetzt.

2.6 Populationsgenetische Analysen

2.6.1 Test auf Hardy-Weinberg Gleichgewicht

Innerhalb jeder Art existiert genetische Variation. Die Populationsgenetik versucht, die Struktur dieser Variation zu beschreiben und ebenso die evolutionären Kräfte zu bestimmen, die für diese Variation verantwortlich sind. Evolution kann als Veränderung in der genetischen Zusammensetzung von Populationen betrachtet werden.

Die in der Populationsgenetik verwendeten statistischen Analysen beruhen auf biologischen Modellen, wobei man im einfachsten Fall davon ausgeht, daß die Allelfrequenzen von Generation zu Generation gleich bleiben, wie es in sehr großen Populationen mit Zufallspaarung der Fall wäre. Solche Populationen befinden sich im Hardy-Weinberg Gleichgewicht (H-W Gleichgewicht), bei dem sich die Genotypfrequenzen (AA, Aa, aa) nach folgender Gleichung verteilen: $1 = p^2 + 2pq + q^2$; wobei p und q die Frequenzen der Allele A und a sind. Diese Gleichung hat aber nur Gültigkeit, wenn bestimmte Annahmen auf die untersuchten Populationen zutreffen, so z. B.: die Population ist unbegrenzt groß, die Individuen paaren sich zufällig, es gibt keine Mutation oder Selektion und es findet keine Migration zwischen Populationen statt. Wenn diese Annahmen nicht erfüllt sind, wie es in realen Populationen oft der Fall ist, werden sich die Allel- bzw. Genotypfrequenzen verändern. Der Test auf Abweichungen vom H-W Gleichgewicht ist also eine Möglichkeit, die Evolution von Populationen zu veranschaulichen. Ein einfaches Maß, um genetische Variation innerhalb einer diploiden Population im H-W Gleichgewicht zu beschreiben ist die Heterozygotie. Man kann zwischen der beobachteten Anzahl (H_o) und der geschätzten Anzahl (H_e) heterozygoter Genotypen, basierend auf der Häufigkeit der Allele in der Population, unterscheiden. Ob sich eine Population im H-W Gleichgewicht befindet, läßt sich folgendermaßen bestimmen. Für jeden möglichen Genotyp wird diese Differenz gebildet:

$$(H_o - H_e)^2 / H_e$$

Die Summen dieser Differenzen ergeben den χ^2 -Wert für den Chi-Quadrat-Anpassungstest. Mit ihm wird getestet, ob die beobachtete Genotypen-Verteilung signifikant von der erwarteten Verteilung abweicht. Die Heterozygotie- und H-W-Berechnungen wurden mit dem Programm GENEPOP3.1d (Raymond & Rousset 1995a) durchgeführt, wobei die statistische Signifikanz durch Markov-Ketten ermittelt wurde (5000 *dememorizations*, 1000 *batches*, 1000 *iterations*) (Raymond & Rousset 1995b).

2.6.2 Test auf freie Rekombination zwischen Markern

Marker, die eingesetzt werden, um populationsgenetische Aussagen zu treffen, sollten frei rekombinieren können und nicht als eine Einheit in die nächste Generation weitergegeben werden. Gekoppelte Genorte liegen nah zusammen, häufig in der Nähe der Zentromere und Telomere. Bei freier Rekombination würde man einen gleichen Anteil von jeder Allelkombination erwarten, die zwischen zwei Genorten möglich ist. Die Genorte wären dann im Kopplungsgleichgewicht. Wenn die Allele allerdings nicht zufällig zusammen vorkommen, sondern als Einheit vererbt werden, liegt ein Kopplungsungleichgewicht vor, basierend auf einer physikalischen Kopplung der Genorte. Ob Genorte miteinander gekoppelt sind, kann mit dem Programm GENEPOP3.1d (Raymond & Rousset 1995a) getestet werden. Die Signifikanz einer eventuellen Kopplung wird wiederum über Markov-Ketten ermittelt.

2.6.3 F-Statistik

In einer Population von begrenzter Größe, in der keine Migration oder Mutation stattfindet, werden mit der Zeit durch Zufallsdrift alle Allele bis auf eines verloren gehen. Die Zeit bis zur Fixierung dieses Allels hängt von der Größe der Population ab. Der Grad der Fixierung wird dabei ausgedrückt als Maß der Inzucht zwischen Individuen einer Population, d. h. von der Häufigkeit der Paarung zwischen verwandten Individuen. Der Inzuchtskoeffizient F_{IS} mißt die Wahrscheinlichkeit, daß zwei Allele autozygot bzw. in der Abstammung identisch sind. Wenn $F_{IS}=0$, dann sind keine Allele identisch, wenn $F_{IS}=1$ liegt völlige Inzucht vor.

Da Inzucht und Genfluß mit die wichtigsten Faktoren sind, die die genetische Struktur von Populationen bestimmen, ist es notwendig ihr Ausmaß festzustellen. Dies wird meist mittels der F-Statistik von Sewall Wright (Wright 1965) berechnet. Es gibt in einer Populationsstruktur verschiedene Ebenen, die Individuen (I), die Subpopulationen (S) und die gesamte Population (T). Für jede Ebene kann die Heterozygotie berechnet werden. H_I ist die Heterozygotie, die in einem Individuum innerhalb einer Subpopulation beobachtet wird. H_S ist die Heterozygotie, die man in dem Individuum in der entsprechenden Subpopulation erwarten würde. H_T ist die Heterozygotie, die man in dem Individuum in einer entsprechenden Gesamtpopulation erwarten würde. Indem diese Werte in verschiedener Weise kombiniert werden – die F-Statistik – erhält man eine detaillierte Beschreibung einer Populationsstruktur, wobei

$$\begin{aligned} F_{IS} &= (H_S - H_I) / H_S \\ F_{ST} &= (H_T - H_S) / H_T \\ F_{IT} &= (H_T - H_I) / H_T \end{aligned}$$

Die drei Parameter haben folgende Beziehung zueinander

$$(1 - F_{IS})(1 - F_{ST}) = (1 - F_{IT})$$

Mit dem F_{ST} -Wert oder auch Fixierungsindex kann das Ausmaß der Populationsunterteilung, die Reduktion des Genflusses aufgrund genetischer Drift bzw. das Maß an Genfluß zwischen Populationen gemessen werden. Ein hohes Maß an Genfluß bedeutet niedrige F_{ST} -Werte.

2.6.4 Varianzanalyse

Cockerham (1969, 1973) überarbeitete Wright's F-Statistik. Er ging davon aus, daß die untersuchten Subpopulationen nur Zufallsstichproben von unbegrenzt vielen anderen Subpopulationen darstellen und Unterschiede in Allelfrequenzen zwischen Subpopulationen das Ergebnis genetischer Drift sind. Weir & Cockerham (1984) entwickelten analog zur F-Statistik Schätzwerte, die sich aus der hierarchischen Varianzanalyse von Allelfrequenzen ableiten lassen. Die Varianzanalyse berücksichtigt typische Eigenschaften populationsgenetischer Datensätze, wie kleine oder uneinheitliche Stichprobenzahlen, Kombinationen von Loci mit unterschiedlichen Allelzahlen und unterschiedliche Individuenzahlen pro Subpopulation. Es ergeben sich die Parameter f , θ und F , wobei $f \hat{=} F_{IS}$, $\theta \hat{=} F_{ST}$ und $F \hat{=} F_{IT}$. Als Varianz bezeichnet man die Differenz zwischen den Mittelwerten der Quadrate der Allelfrequenzen der verschiedenen Subpopulationen und dem Quadrat der Mittelwerte der jeweiligen Allelfrequenzen.

$$(p_1 + p_2)^2 / 2 - (p_1 + p_2 / 2)^2 = V(p)$$

θ läßt sich folgendermaßen interpretieren $\theta = V(p)/pq$

Man kann zwischen der Varianz zwischen Subpopulationen ($\delta_a^2 = p(1-p)\theta$), zwischen Individuen innerhalb von Subpopulationen ($\delta_b^2 = p(1-p)(F-\theta)$) und der Varianz zwischen Allelen innerhalb von Individuen ($\delta_w^2 = p(1-p)(1-F)$) unterscheiden. Diese drei Parameter werden durch die Varianzanalyse ermittelt (Weir & Cockerham 1984) und ergeben:

$$\begin{aligned} F &= (\delta_a^2 + \delta_b^2) / (\delta_a^2 + \delta_b^2 + \delta_w^2) \\ \theta &= \delta_a^2 / (\delta_a^2 + \delta_b^2 + \delta_w^2) \\ f &= \delta_b^2 / (\delta_b^2 + \delta_w^2) \end{aligned}$$

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse der Varianzanalyse kann durch Permutationstests überprüft werden. Unter der Annahme, daß keine Populationsdifferenzierung vorliegt, werden zufällig neue Datensätze aus den vorhandenen Datensätzen bei Beibehaltung der Größe generiert, und ebenfalls einer Varianzanalyse unterzogen. Permutiert werden kann über Allele und Genotypen, wobei im letzteren Fall nicht gegeben sein muß, daß sich die Populationen im H-W Gleichgewicht befinden. Der p-Wert ist dann der Anteil der neuen Datensätze, die einen Wert ergeben, der genauso groß oder größer als der des wirklichen Datensatzes ist. Die Genauigkeit dieser Abschätzung hängt von der Anzahl der Permutationen ab. Die Varianzanalysen wurden mit dem Programm FSTAT27b (Goudet 1999) durchgeführt. Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurden jeweils 10 000 Permutationen durchgeführt. Permutiert wurde über Genotypen.

2.6.5 Selbstklassifikationsanalysen („Assignment“-Tests)

Um die phylogeographische Integrität von Bachforellen und Seesaiblingspopulationen zu untersuchen, wurden alle Individuen einer Selbstklassifikationsanalyse mit dem Programm GENECLASS1.0.02 (Cornuet et al. 1999) unterworfen. Diese Tests wurden unternommen, um herauszufinden, ob Individuen eines bestimmten Genotyps, die aus einer Population mit bestimmten populationsgenetischen Eigenschaften stammt, dieser „eigenen“ Population wieder zugeordnet werden, oder ob sie aufgrund ihres Genotyps eher einer anderen Population zugeordnet werden könnten.

Das Programm offeriert zwei Möglichkeiten (Wahrscheinlichkeits- und Distanz-Methoden), um Individuen charakterisierten Populationen zuzuordnen. Wir wählten die auf einer Wahrscheinlichkeitsmethode beruhenden bayesianische Methode (Rannala & Mountain 1997), die Individuen einer Population zuordnet, für die die Wahrscheinlichkeit des Auftretens des individuellen (Mikrosatelliten-) Genotyps am höchsten ist. Da aber jedes Individuum immer am wahrscheinlichsten einer Population, die notwendigerweise aus einer begrenzten Auswahl von Populationen stammt, zugeordnet werden kann, ist die Möglichkeit gegeben, ein Konfidenzintervall für die Wahrscheinlichkeit zu berechnen, mit der ein Individuum wirklich zu

einer Population gehört. Das wird erreicht, indem man den Wert eines individuellen genotypischen Kriteriums mit den wahrscheinlich möglichen Werten, die für bestimmte Populationen zu berechnen sind, vergleicht. Der individuelle Wert muss dann innerhalb einer *a priori* definierten Grenze von Werten liegen. Falls der individuelle Wert deutlich außerhalb der möglichen Verteilung liegt, kann das Individuum nicht dieser Population zugeordnet werden. Um die wahrscheinlich „echte“ Verteilung der populationsspezifischen Werte aus dem tatsächlichen Genotypen-Sample zu berechnen, wird die Verteilung der Multilocus-Mikrosatelliten-Genotypen simuliert, indem zufällig Allele entsprechend ihrer Frequenz in die Simulation einfließen (Cornuet et al. 1999). Das jeweilige Konfidenzintervall ist dann zu bestimmen, um Individuen tatsächlich einer Population zuzuordnen. Ob Simulationsmethoden oder direkte Zuordnungsmethoden für Bachforellen- und Saiblingsanalysen verwendet wurden, ist in den jeweiligen Kapiteln dargestellt.

2.6.6 „Multiple comparison post tests“

Bei der Durchführung mehrfacher Vergleiche zwischen Gruppen ergeben sich bei der statistischen Absicherung der Ergebnisse Probleme. Wenn viele Vergleiche gemacht werden, ist die Wahrscheinlichkeit einen „Typ I Fehler“ zu begehen, d.h. eine korrekte Null-Hypothese abzulehnen, größer als 5%. Außerdem sind manche Vergleiche nicht völlig unabhängig voneinander. Wenn z. B. Gruppe 1 mit Gruppe 2 und Gruppe 1 mit Gruppe 3 verglichen wird, ist schon etwas über den Vergleich zwischen Gruppe 2 und Gruppe 3 bekannt. Um diese Probleme zu umgehen, wurden verschiedene „multiple comparison post tests“ entwickelt. Zwei dieser Tests, zum einen die Bonferroni-Methode ($\alpha' = \alpha/k$), zum anderen die Dunn-Šidak Methode ($\alpha' = 1 - (1 - \alpha)^{1/k}$), auch sequentielle Bonferroni-Methode genannt (nachzulesen in Sokal & Rohlf 1995), wurden auf die paarweisen Vergleiche der Datensätze angewandt. Dies betraf sowohl die Berechnung der Abweichungen vom H-W Gleichgewicht, als auch die Tests auf Abweichungen vom Kopplungsgleichgewicht und auf Populationsdifferenzierungen. Es wurden aber auch andere Tests angewendet.

2.7 Phylogenetische Analysen

2.7.1 „Median-joining network“

Mitochondrielle Haplotypen wurden mit der „Median-joining network“ Methode (Bandelt et al. 1995, Röhl 1998, Bandelt et al. 1999) ausgewertet. Diese Methode beginnt analog zu Excoffier & Smouse (1994) mit der Bildung eines „Minimum-spanning networks“, was bedeutet, daß alle Haplotypen in einem Netzwerk miteinander verbunden werden, ohne zusätzliche hypothetische (ancestrale) Knoten einzufügen. Mit dem Ziel maximaler Parsimonie werden anschließend jeweils einige Konsensus-Sequenzen (d.h. „median-vectors“) von drei im Netzwerk nah benachbarter Sequenzen gebildet und integriert. Diese „median-vectors“ können biologisch als existierende, nicht gefundene Sequenzen, oder als ausgestorbene ancestrale Sequenzen interpretiert werden. Bei einer geringen Anzahl von Substitutionen, wie in einem innerartlichen Datensatz häufig, sind retikulate Netzwerke oft besser geeignet als herkömmliche Stammbaumrekonstruktionen, um die phylogenetischen Zusammenhänge darzustellen. Die Datensätze wurden in eine binäre Matrix umgewandelt, bei der Lücken im Alignment kodiert wurden, aber Positionen mit mehr als zwei Zuständen, die in dieser Analyse von geringerer phylogenetischer Aussagekraft schienen, nicht berücksichtigt wurden. Der Ausschluß von Lücken oder Positionen mit mehr als zwei Zuständen kann in der Identität von eigentlich unterschiedlichen Haplotypen resultieren.

2.7.2 Stammbaumanalysen

Die Abschätzung molekularer phylogenetischer Beziehungen basiert im Prinzip auf der Art und Anzahl der Substitutionen zwischen den Sequenzen. Man unterscheidet bei Stammbaumrekonstruktionsmodellen zwischen quantitativen bzw. Distanz-Modellen wie z.B. „Neighbour-Joining“ (N-J) (Saitou & Nei 1987) und diskreten Modellen, wie z.B. „Maximum Parsimony“ (MP) und „Maximum Likelihood“ (ML).

2.7.2.1 „Neighbour-Joining“

Die „*Neighbour-Joining*“ (N-J) Methode arrangiert die Sequenzen sukzessive nach ihren genetischen Distanzen, ohne die Topologie nachträglich zu ändern. Es gibt verschiedene Modelle, um die evolutionären Distanzen zwischen Sequenzen zu ermitteln. Das einfachste ist das *Jukes-Cantor* Modell, welches annimmt, daß für alle Nukleotide die gleiche Substitutionsrate besteht. In dieser Arbeit wurde das *Tamura-Nei* Modell angewandt (Tamura & Nei 1993), welches sowohl Unterschiede in den Basenhäufigkeiten und den Raten für Transitionen und Transversionen berücksichtigt, als auch zwischen unterschiedlichen Raten von Purin- und Pyrimidin-Transitionen differenziert.

Die Berechnungen wurden mit dem Programmpaket PAUP (4.0b2) (Swofford 1999) durchgeführt. Die Robustheit der Verzweigungen wurde mit 1000 „*bootstrap*“-Replikaten getestet (Felsenstein 1985). Dabei werden Pseudoreplikate generiert, indem zufällig aus dem Originaldatensatz variable Positionen herausgenommen und ersetzt werden. Aus diesen „neuen“ Datensätzen werden dann ebenfalls Stammbäume rekonstruiert und anschließend wird die relative Häufigkeit, der „*bootstrap*“-Wert, der einzelnen Verzweigungen berechnet.

2.7.2.2 „Maximum Parsimony“

„*Maximum Parsimony*“ (MP) Methoden haben zum Ziel die Anzahl von Schritten (d.h. Substitutionen) zu minimieren, die benötigt werden, um alle Taxa in einem phylogenetischen Baum zu verbinden. Nur Positionen mit zwei Zuständen, die Mindestens zweimal vorkommen, werden in die Analyse eingeschlossen (informative Positionen). Nicht variable Positionen, oder Substitutionen die nur einmal vorkommen, werden, im Gegensatz zu Distanz- und „*Maximum Likelihood*“-Methoden, ignoriert (uninformative Positionen). Auch bei der MP Methode kann die Baum-Topologie mittels „*bootstrapping*“ statistisch abgesichert werden (s.o.). Die Parsimonie-Berechnungen wurden ebenfalls mit dem Programm PAUP (4.0b2) (Swofford 1999) durchgeführt.

2.7.2.3 „Maximum Likelihood“

Das Ziel der „*Maximum Likelihood*“ Analyse ist es, einen Baum und die entsprechenden Astlängen zu bestimmen, welche die größte Wahrscheinlichkeit haben, die beobachteten Daten hervorzubringen. Die „*Maximum Likelihood*“ (ML) Methode besteht aus drei Elementen, dem Modell der Sequenzevolution, dem Baum und den beobachteten Sequenzen. Der Baum spezifiziert sowohl das Verzweigungsmuster, als auch die Länge der Äste. Für eine gegebene Baumtopologie wird berechnet, welche Astlängen die beobachteten Daten am wahrscheinlichsten macht (d. h. welcher der „*Maximum Likelihood*“ Wert für diesen Baum ist). Anschließend wird ermittelt, welcher aller möglichen Bäume die größte „*Likelihood*“ hat.

Eine Annahme dieses Modells ist, daß die verschiedenen Positionen in einer Sequenz unabhängig voneinander evolvieren. Geht man von einem bestimmten Substitutionsmodell aus (s.o.), kann man so die Wahrscheinlichkeit berechnen, daß zwei Sequenzen mit bestimmter Distanz die beobachteten Nukleotide an einer Position haben. Die logarithmierte „*Likelihood*“, die beobachteten Sequenzen zu erhalten, ist die Summe der logarithmierten „*Likelihoods*“ an jeder Position.

Um die „*Likelihood*“ für einen gegebenen Baum auszurechnen, muß die „*Maximum Likelihood*“ für die Astlängen des Baums geschätzt werden. Dies entspricht ungefähr dem oben geschilderten Vorgang, mit einem wichtigen Unterschied. In allen Ästen sind Mindestens einer, wenn nicht beide verbundenen Knoten interne (ancestrale) Knoten mit unbekannter Sequenz. Um also die „*Likelihood*“ einer Base an einer Position zu berechnen, muß die Wahrscheinlichkeit der beobachteten Zustände ermittelt werden, mit Berücksichtigung aller möglichen Kombinationen der ancestralen Positionen. Dieser Rechenprozeß kann je nach Größe des Datensatzes sehr zeitaufwendig sein.

Man kann den Datensatz allerdings in kleinere Einheiten unterteilen, daraus jeweils den Baum mit der „*Maximum Likelihood*“ ermitteln und die Ergebnisse anschließend zusammenfügen. Die kleinste sinnvolle Einheit beinhaltet vier Sequenzen, ein Quartett. Mit diesem Ansatz kann mit dem Programm PUZZLE 4.1 (Strimmer & v. Haeseler 1996) auch für größere Datensätze mittels der „*Maximum Likelihood*“ Methode der beste Baum ermittelt werden. Erst werden alle möglichen Quartett „*Maximum Likelihood*“ Bäume berechnet, dann werden die Quartett Bäume wiederholt in einen Baum mit allen Sequenzen kombiniert (*Puzzling*-Schritte). Aus allen daraus resultierenden Bäumen wird schließlich ein „*majority-rule*“ Konsensus-Baum gebildet (Konsensus-Schritt). Wie oft eine Gruppe bei den *Puzzling*-Schritten gebildet wird, gibt dann die Robustheit der Verzweigung an. Um diese festzustellen, wurden in dieser Studie 10 000 *Puzzling*-Schritte gemacht. Die Distanzen zwischen den Sequenzen wurden nach dem *Tamura-Nei* Modell berechnet.

2.7.3 Abschätzen der „Molekularen Uhr“ mit dem „*Likelihood ratio test*“

Viele DNA-Abschnitte evolvieren mit konstanter Rate innerhalb verschiedener evolutionärer Linien, was zu der Bezeichnung der „Molekularen Uhr“ geführt hat. Diese Entdeckung hat dazu beigetragen, die Theorie der neutralen Evolution der DNA zu unterstützen, da sie die Konstanz der zugrundeliegenden neutralen Mutationsrate zeigt. Das Konzept der „Molekularen Uhr“ bedeutet aber nicht, daß alle DNA-Abschnitte mit den gleichen Raten evolvieren. Deshalb müssen „Molekulare Uhren“ kalibriert werden, z.B. durch bekannte geologische Ereignisse, wie die Bildung von Inseln. In anderen Worten: wenn bekannt ist, mit welcher Geschwindigkeit die Uhren ticken, kann anhand von genetischen Distanzen das Alter von evolutionären Linien abgeschätzt werden. DNA-Abschnitte können aber auch in ihrer Evolutionsrate zwischen innerartlichen phylogenetischen Linien divergieren. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um die „Molekulare Uhr“ zu testen. Der „*Likelihood ratio test*“ berechnet in diesem Fall die logarithmierten „*Likelihoods*“ für die beiden Hypothesen, daß die Sequenzen mit gleicher Rate (H_1) oder mit unterschiedlicher Rate (H_0) evolvieren. Die Differenz zwischen erster und letzter Hypothese ergibt die „*Likelihood ratio statistic*“, deren statistische Signifikanz mit einem Chi-Quadrat Test geprüft werden kann. Dieser Test wurde ebenfalls mit dem Programm PUZZLE 4.1 (Strimmer & v. Haeseler 1996) durchgeführt.

2.7.4 Berechnung der molekularen Diversität

Die genetische Struktur der Populationen aus verschiedenen Einzugsgebieten wurde mit dem Programm ARLEQUIN 1.1 (Schneider et al. 1997) ermittelt, welches unter anderem die Nukleotid-Diversität zwischen verschiedenen Haplotypen nach folgender Formel berechnet:

$$ND = \sum p_i p_j d_{ij}$$

p_i bzw. p_j = die Häufigkeit des i-ten bzw. j-ten Haplotyps
 d_{ij} = die Distanz zwischen dem i-ten und dem j-ten Haplotyp

Die mittleren paarweisen Distanzen zwischen Haplotypen wurden mit dem Programm PAUP (4.0b2) (Swofford 1999) berechnet. Als Substitutionsmodell zur Distanzberechnung wurde ebenfalls das *Tamura-Nei* Modell (Tamura & Nei 1993) gewählt.

2.8 Statistische Methoden

2.8.1 Statistische Standardmethoden

Falls nicht anders angegeben, wurde für alle statistischen Standardanalysen das Programm SPSS für Windows, Version 6.1.3 S, verwendet. Auf die Begründung für die Verwendung statistischer Standardtests zur Überprüfung von Hypothesen kann im Rahmen dieses Berichts nicht eingegangen werden, da bis auf besonders gekennzeichnete Testverfahren alle zum durchschnittlichen Handwerkszeug von Umweltgutachtern gehören. Für die Analyse multi-faktorieller linearer Beziehungen (ANOVA) wurde das Programm SYSTAT verwendet.

Wenn nicht anders angegeben, gilt die Ablehnung einer Nullhypothese mit einer Wahrscheinlichkeit (p) von 0,05 als signifikant, mit $p < 0,01$ als hochsignifikant und mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ als höchstsignifikant. Für mehrfache multiple Vergleiche wurde korrigiert (siehe 2.6.6).

2.8.2 Kanonische Korrespondenz-Analyse (CCA)

2.8.2.1 Hintergrund

Besonderer Erklärungsbedarf besteht für die relativ neue Anwendung der „Kanonischen Korrespondenzanalyse“ (Canonical Correspondence Analysis (CCA) zur multivariaten Analyse von Umweltfaktoren auf genetische Daten. Ursprünglich für ökologische Fragestellungen entwickelt, handelt es sich bei der CCA um eine der effizientesten statistischen Methoden, um Varianz in der Artenzusammensetzung auf verschiedene Einflußvariablen zurückzuführen. (ter Braak 1988). Die CCA ist ein statistisches Testverfahren, das für die direkte Analyse von Zusammenhängen zwischen multivariaten ökologischen Datenmatrizen geschaffen wurde. Es hat gegenüber anderen klassischen Testverfahren den Vorteil, daß es nicht voraussetzt, daß die Reaktion der Artenzusammensetzung linear mit dem Umweltparameter, der sie (mit)bestimmt, verlaufen muss. Interessanterweise hatte der Erfinder der Methode schon früh darauf hingewiesen, daß die Methode auch dazu benutzt werden könnte, genetische Varianz und nicht nur die Varianz in der Artenzusammensetzung auf Umweltfaktoren zurückzuführen (ter Braak 1988). Außer in einer einzigen Studie zur genetischen Varianz des Bachsaiblings in Nordamerika (*Salvelinus fontinalis*) (Angers et al. 1999) wurde dieser Analyseansatz bisher noch nicht auf seine Effizienz getestet. Diese Studie belegte aber die analytische Kapazität des Testverfahrens, so daß sie auch in dieser Studie zur Anwendung kommen sollte.

CCA integriert sogenannte Ordinations- mit multiplen Regressionstechniken. In konventionellen Ordinationstechniken, z.B. der Hauptkomponentenanalyse, wird die Variation der ökologischen Daten auf wenige Dimensionen reduziert, die in einem Ordinationsdiagramm als abhängige und unabhängige Variablen aufgetragen werden. Die durch diese Analyse erhaltenen Muster werden dann normalerweise in einem zweiten Schritt in einen statistischen Zusammenhang mit externen Daten gebracht und interpretiert. Das kann z.B. in Form von Korrelationskoeffizienten zwischen unabhängigen Variablen und Ordinationsachsen geschehen, oder mit Hilfe einer multiplen Regression von Ordinationsachsen und unabhängigen Variablen. Eine Schwierigkeit dieser Techniken besteht aber darin, daß die Ordinationsachsen auf bestimmte orthogonale Richtungen im Ordinationsdiagramm festgelegt sind, daß aber andere Richtungen besser zum Wirken der untersuchten Umweltvariablen passen können, daß also zum Beispiel die multiple Regression die Auswahl der Ordinationswerte *a priori* beschränkt. Da aber die Tests, die in der CCA implementiert sind, auf Permutationsbasis programmiert sind, setzen sie im Gegensatz zu klassischen Verfahren keine bestimmte Verteilung der Ausgangsdaten voraus. Desweiteren nimmt die CCA, wie oben schon erwähnt, einen unimodalen und keinen linearen Zusammenhang zwischen Umweltparametern und Artenzusammensetzungsvariablen an. Sie kann daher im Gegensatz zu den klassischen Techniken Zusammenhänge auch detektieren, wenn nicht-lineare Zusammenhänge die Zusammensetzung der Artengemeinschaft bestimmen.

In der vorliegenden Studie sollte aber nicht der Einfluß von Umweltvariablen, z.B. des Besatzeinflusses auf die Zusammensetzung von Fischartengemeinschaften untersucht werden, sondern deren Einfluß auf die genetische Zusammensetzung der Forellenpopulationen. Mit anderen Worten, es wurden statt der Artenvielfalt und –häufigkeit, die Allelhäufigkeit, die mitochondriale Haplotypenhäufigkeit, Heterozygositätsmaße auf ihren Zusammenhang mit Umweltparametern hin analysiert. Von besonderer Bedeutung für die Populationsgenetik ist die Tatsache, daß CCA auch für statistische Datensets geeignet ist, die in ihren Matrizen viele leere Zellen („0“) enthalten. Dies ist bei genetischen Daten wie Allelfrequenzen eher die Regel als die Ausnahme.

2.8.2.2 Anwendung der CCA auf die erhobenen genetischen Daten

2.8.2.2.1 Aufbereitung der Daten

Genetische Daten repräsentierten also die abhängigen Variablen in dieser Analyse. Um sowohl inner- als auch Interpopulationsanteile der genetischen Vielfalt zu berücksichtigen, wurden die Daten auf verschiedenen Matrizen verteilt. Varianz der genetischen Vielfalt zwischen den Populationen wurde durch die relative Häufigkeit jedes einzelnen Allels eines Locus pro Population festgehalten, insgesamt also fünf Datenblätter mit den Allelfrequenzen aller untersuchten Populationen erstellt. Eine andere Matrix wurde für die genetische Varianz innerhalb der Populationen angefertigt, die die Anzahl Allele pro Population, die erwartete Heterozygotität und die prozentuale Zuordnungswahrscheinlichkeit eines Individuums in seine eigene oder eine geographisch und hydrographisch benachbarte Population in Prozent angibt (siehe Kapitel Molekulare Analysemethoden). Die Werte für diese Matrizen sind den Tabellen 22 und 23 zu entnehmen.

Die unabhängigen Umweltvariablen, deren Einfluß auf die genetische Diversität der Bachforellenpopulationen untersucht werden sollte, bestand unter anderem aus den klassischen Parametern „Höhe über dem Meeresspiegel“ und „Einzugsgebiet“ oberhalb der Befischungstrecke. Dazu kamen die in den aufwendigen Vorarbeiten ermittelten Index of „Biotic Integrity“ (IBI)-Werte für jedes Bachforellengewässer und die Besatzeinflußwahrscheinlichkeit. Diese wurden in einer einzigen Matrix integriert und gegen die genetischen Daten getestet. Die Werte dieser Matrix ist aus Tabelle 19 zu entnehmen.

Eine weitere „geographische“ Matrix berücksichtigte die biogeographisch hochwahrscheinliche Verwandtschaft von Forellenpopulationen, die im gleichen oder einem benachbarten Flußsystem vorkommen. Dazu wurde eine binäre Matrix für das Gewässersystem, das die Bäche mit den verschiedenen Bachforellenpopulationen miteinander verbindet, erstellt (siehe Anhang 2). Diese Matrix spiegelt ein durch Verzweigungspunkte gekennzeichnetes dichotomes Netzwerk wieder. Jeder Verzweigungspunkt im hydrogeographischen Netz wurde mit einer Zahl versehen (in unserem Fall von 49). Die Wurzel (Verzweigungspunkt No 1) ist der definierte gemeinsame Verzweigungspunkt für alle untersuchten Populationen, in vorliegenden Fall also der Punkt, der die atlantischen (Rhein/Main und Elbe-Populationen) mit den danubischen Populationen verbindet. Diese Methode ist analog zur phylogenetischen Stammbaumrekonstruktion. Entsprechend ist jeder Bach im „Bachstammbaum“ durch eine Reihe von Verzweigungspunkten gekennzeichnet, die von der Wurzel bis zu seiner Position im hydrogeographischen Baum führen. Eine „Bach/Verzweigungspunkt-Matrix“ wurde also so gestrickt, daß jeder Verzweigungspunkt, der den Bach mit der Wurzel verbindet eine „1“ bekam, jeder andere eine „0“.

2.8.2.2.2 Gesamtanalyse mit CANOCO

Um in der Gesamtanalyse der Bachforellendaten die Varianz der abhängigen genetischen Variablen in Beziehung zu den unabhängigen Umwelt- und geographischen Variablen zu setzen, wurden jede der sieben „genetischen Matrizen“ mit jeweils den beiden für die unabhängigen Variablen kodierenden Matrizen mit der CCA analysiert. Dazu wurde das Programm CANOCO for Windows (Version 4) benutzt. Für die geographischen Variablen (Verzweigungspunkte im Gewässernetz) und die Umweltvariablen wurde die „Forward Selection“ Routine genutzt, um den potentiell statistisch signifikanten Beitrag einzelner Parameter auf die genetische Varianz zu überprüfen. Um diese Signifikanz statistisch abzusichern, wurden 10000 Monte Carlo Permu-

tationen durchgeführt. Die Höhe des Beitrages (mit anderen Worten: wieviel der genetischen Varianz durch einen Umwelt- oder geographischen Parameter erklärt wurde) wurde unabhängig mit 10000 Monte Carlo Permutationen evaluiert. Im Ergebnisteil werden ausschließlich signifikante Beiträge der unabhängigen Variablen diskutiert, auch wenn sie vergleichsweise niedrig ausfallen. Auf der anderen Seite werden vergleichsweise hohe Beiträge einzelner Parameter, die aber nicht signifikant waren, nicht weiter behandelt.

Da die Umweltvariablen einen nicht unerheblichen Anteil genetischer Varianz zu bestimmen scheinen, der *auch* durch die geographische Verwandtschaft der Populationen verursacht sein kann, also ein Teil der Varianz durch beide Variablen erklärt werden kann, musste dieser Umstand gesondert berücksichtigt werden. Es galt herauszufinden, ob die Interpretation des Einflusses der Umweltvariablen (vor allem des Besatzeinflusses) auf die genetische Diversität der Populationen durch die biogeographische Verwandtschaft der Populationen verfälscht sein könnte. Dazu wurden beide Variablensets *gleichzeitig* dem Testverfahren des „Variation Partitioning“ (Borcard et al. 1992) unterzogen, die man mit Hilfe der „Partiellen CCA“ (PCCA) berechnen kann (ter Braak 1986, 1998). Dazu wurde die gesamte genetische Varianz (gemessen anhand der Eigenvalues) in vier verschiedene Fraktionen unterteilt. (1) Die Komponente, die durch die Umweltvariablen in der CCA allein erklärt wird, indem man die (2) die Komponente, die durch die geographischen Variablen in der CCA alleine erklärt wird, von den Umweltvariablen subtrahiert (und umgekehrt). Die von beiden Variablensets zusammen erklärte Komponente („shared component“) besteht in der Fraktion der Gesamtvarianz, die von der PCCAs (Analyse mit beiden Variablensets gleichzeitig) entfernt wird. Schließlich erhält man die unerklärte Komponente der Varianz, indem man die reine Umweltkomponente (1), die reine geographische Komponente (2) und die „shared component“ von der Gesamtvarianz abzieht.

Um für den mehrfachen Einsatz des gleichen Sets an Beobachtungen zu korrigieren (Umwelt und geographische Variablen) wurde eine sequentielle Bonferroni-Korrektur genutzt, die von α/k ausging, wobei $\alpha = 0.05$ und $k=7$ war und von der Anzahl verschiedener Matrizen, die gleichzeitig entweder gegen die Umwelt- oder die geographischen Variablen getestet wurden (siehe auch „multiple post hoc comparison tests“ für genetische Analysen).

Für die wichtigste signifikante statistische Beziehung zwischen Besatzeinfluss und phylogeographischer Integrität („KorrScor“) wurde eine graphische Darstellung gewählt, bei der die Ordinations-Scores der einzelnen Populationen aus der PCCA mit Umweltdaten auf die Selbstklassifikationszuordnung dargestellt sind. Zu diesem Zweck wurden die Ergebnisse der Selbstklassifikationsanalyse aufgeteilt und einer PCCA unterworfen. Die Vektoren für die 4 verschiedenen Umwelteinflüsse geben die Richtung des Einflusses an, wobei die jeweiligen Ordinationsscores für die einzelnen Populationen im zweidimensionalen Gefüge der wichtigen 1 und 2 Ordinationsachse liegen (genauer siehe in der Legende zu Abb. 15).

3 Ergebnisse

3.1 Erarbeitung eines biotischen Integritätsindex (IBI) für Forellenbäche

Zur Untersuchung der Parameter, die zur Veränderung der genetischen Integrität autochthoner Bachforellenpopulationen durch Besatz beitragen, sollte als zusätzlicher Faktor die biotische Integrität der untersuchten Bachforellengewässer untersucht werden. Dies, weil die begründete Annahme vorliegt, daß autochthone und lokal adaptierte Populationen besser gegen genetische Introgression gefeit sind, wenn der Lebensraum, an den sie sich angepasst haben, intakt ist (siehe Einleitung). Um eine Evaluation aller untersuchten Bachforellengewässer möglich zu machen, sollten möglichst Daten aus den sowieso vorgenommen Elektrobefischungen verwertet werden. Dazu sollten bereits der von Karr (1981) in den USA entwickelte „*Index of Biotic Integrity*“ für nordamerikanische Fischgesellschaften in Fließgewässern modifiziert und auf seine Aussagekraft hin evaluiert werden. Zu diesem Zweck wurde eine eigene Studie an einer Auswahl von 34 der untersuchten Bachforellengewässer angelegt. Der an dieser Auswahl modifizierte und evaluierte Index sollte dann auf die Befischungsdaten aller untersuchten Bachforellengewässer übertragen werden, um für alle Gewässer eine bachforellengemäße Gewässergütebewertung zu erhalten, die in die Gesamtanalyse miteingehen kann. Da die Studie bereits in vollem Umfang dem Umweltbundesamt vorliegt (Klein 1998) wird an dieser Stelle nur eine Zusammenfassung der Arbeit wiedergegeben, die die für Beurteilung des Besatzeinflusses relevanten Aussagen und die Grundlagen zum Verständnis von Gewässergüteindices zusammenfasst.

Der von Karr (1981) in den U.S.A. entwickelte *Index of Biotic Integrity* oder IBI bewertet die biologische Güte eines Fließgewässers anhand von fischbiologischen Parametern. Der IBI ist bisher nur bei einigen europäischen Gewässern angewendet worden (Oberdorff & Hughes 1992, Oberdorff & Porcher 1994). Eine Übertragung der nordamerikanischen Verhältnisse nach Europa ist v.a. wegen der sehr unterschiedlichen zoogeographischen und geomorphologischen Verhältnisse nur schwer vorzunehmen. Für dieses Projekt wurde daher untersucht, ob der Biotische Integritätsindex dahingehend modifiziert werden kann, daß er eine fundierte Aussage über die ökologische Güte bayerischer Forellengewässer machen kann. Neben Fischdaten wurden daher noch chemische und Makroinvertebraten-Daten aufgenommen, um den modifizierten Index zu evaluieren.

3.1.1 Indices zur Bestimmung der Gewässergüte

Ein effektiver Fließgewässerschutz verlangt nach einer hinreichenden und schnellen Evaluation der Güte von Wasserkörpern. In der Vergangenheit hat sich die Bewertung der Gewässergüte jedoch vornehmlich auf die Erfassung von chemischen Belastungen und entsprechenden Gegenmaßnahmen erschöpft. Der Nachteil von alleinigen chemischen Messungen ist jedoch, daß diese Methode die Gewässergüte nicht in einem solchen Maß über die Zeit integriert, wie biologische Methoden dazu imstande sind. Weiterhin wird bei dieser Methode nur eine einzige Auswirkung der Degradation von Gewässern berücksichtigt. Die Lebenswelt reagiert jedoch auf eine ganze Fülle weiterer Störungen, wie Verschlammung, Verbauungsmaßnahmen des Gewässerbettes und Veränderungen des Einzugsgebietes (Maitland et al. 1994). Die Leitorganismen und typischen Lebensgemeinschaften zeigen einerseits an, welche durchschnittliche Güte das Wasser gehabt hat (Meyer 1990), das während längerer Zeit über diese Indikatoren hinweggeflossen ist, weiterhin machen sie eine Aussage über die Güte des physikalischen und biologischen Umfelds. Daher ist allein die biologische Wasseranalyse in der Lage, zumeist bereits bei einer Untersuchung eine langzeitliche Aussage über die biotische Integrität zu machen.

Ausgehend von dieser Erkenntnis ist bereits 1902 von Kolkwitz & Marsson ein Saprobien-System zur Beurteilung der biologischen Güte von Fließgewässern entwickelt worden. Dieses ist seitdem mehrfach modifiziert worden, u.a. von Verneux & Tuffery (1967) und von Meyer (1990). Ein Nachteil dieser Methode ist, daß mit einer Saprobienindizierung viele ökologische Faktoren, wie etwa Artenzusammensetzung und Nahrungsnetz, nicht hinreichend berücksichtigt werden und die Bemessungsgrundlage für die Güte eines Gewässers auf die Bestimmung des Ausmaßes der organischen Belastung bzw. Sauerstoffmangeltoleranz reduziert wird.

Ausgehend von diesen Nachteilen wurde versucht, auch Fischgemeinschaften zur Bewertung der biologischen Güte von Lebensgemeinschaften heranzuziehen, u.a. von Buhse (1973) und von Verneux (1976). Diese eignen sich aus einer Reihe von Gründen besonders für die Erstellung eines Index', der die Ursprünglichkeit bzw. den Gesamtzustand eines Ökosystems bemessen soll: erstens ist die Lebensgeschichte vieler Fischarten vergleichsweise gut bekannt, zweitens existieren mehrere trophische Ebenen in Fischlebensgemeinschaften (so daß eine Aussage über das Nahrungsnetz einer Lebensgemeinschaft möglich wird), drittens sind Fische leicht bis auf Artebene bestimmbar und schließlich machen sich viele Arten von Störungen, wie Toxizität (durch fehlende Arten) oder Streßeinwirkungen (durch unterdrücktes Wachstum und Reproduktion) direkt bemerkbar (Karr 1981). Weiterhin sind Fische als Top-Prädatoren in Fließgewässern besonders geeignet, die Güte eines Ökosystems anzuzeigen, da sich jede Veränderung in niederen trophischen Ebenen unweigerlich auf die Fisch-Lebensgemeinschaft niederschlagen muß (Hocutt & Stauffer 1980).

Ein grundlegender Nachteil von Verneux's (1976) Fisch-Modell ist, daß es v.a. Aspekte berücksichtigt, die auf der Verbreitung und Dominanz von Arten oder Familien basieren. Es indiziert von daher nicht unbedingt die Güte des Gewässers, sondern nur, ob eine erwartete Gemeinschaft anwesend ist. Ein detaillierterer Index, der mehrere ökologische Aspekte einer Fisch-Lebensgemeinschaft auch quantitativ berücksichtigt, wurde von Karr (1981) entwickelt. Sein Biotischer Integritätsindex („*Index of Biotic Integrity*“, *IBI*) faßt qualitative und quantitative Kriterien zusammen, so daß man ein gutes Fundament besitzt, um Aussagen über die „Gesundheit“ der Fisch-Lebensgemeinschaft und dadurch über die des gesamten Ökosystems machen zu können. Zudem kann man verhältnismäßig einfach und schnell eine umfassende Bewertung eines Ökosystemes vornehmen.

3.1.2 Der Biotische Integritätsindex (IBI) nach Karr

Der IBI bewertet den Zustand von Fischlebensgemeinschaften und der Umwelt, die diese umgeben (Karr 1981). Der IBI beruht auf der bewiesenen (Leonard & Orth 1986) Annahme, daß sich ausgesuchte Fischlebensgemeinschaftsparameter mit zunehmender Verschlechterung der Umwelt in einer charakteristischen und vorhersehbaren Weise verändern. Eine solche Degradation kann z.B. durch anthropogene Einflüsse wie chemische, physikalische, und biologischen Veränderungen des Fließgewässerökosystems verursacht werden.

Ursprünglich berücksichtigte Karr (1981) 12 Kriterien (*metrics*), um den Zustand des Ökosystems zu bewerten. Diese hohe Anzahl unterscheidet sich von anderen Güte-Indices, die biotische Gemeinschaften aufnehmen und bewerten wollten. So verwendet der Shannon Diversity Index (Shannon & Weaver 1949) nur zwei Parameter, nämlich die Anzahl der Arten (*richness*) und ihre relative Häufigkeit (*evenness*). Auch wurden Indices entwickelt, die Biomasse (Boling et al. 1975) und Biomasse in Kombination mit Diversität (Gammon et al. 1981) verwenden. Diese Indices berücksichtigen jedoch viele wichtige Parameter nicht, so daß die Gefahr der Übersimplifizierung komplexer Ökosysteme besteht. Karr (1981) berücksichtigte zwei Bewertungsebenen (Artenzusammensetzung und ökologische Faktoren) des ökologischen Gefüges eines Fließgewässers in 12 Kriterien, um den Status der Gemeinschaft zu beurteilen:

Ebene 1: Artenzahl und –zusammensetzung: Anzahl der Arten, Anwesenheit von intoleranten Arten, Artenanzahl und Zusammensetzung der Barsche (Percidae), Artenzahl und Zusammensetzung der Sauger (Catostomidae), Artenzahl und Zusammensetzung der Sonnenbarsche (Centrarchidae), Individueller Anteil des Gründers Sonnenbarsches (*Lepomis cyanellus*), Anteil der Hybrid-Individuen

Ebene 2: Ökologische Faktoren: Anzahl der Individuen in der Stichprobe, Anteil der Omnivoren (Individuen), Anteil der insektivoren Cypriniden, Anteil der Top-Karnivoren, Anteil der Fische mit Anomalien (Krankheit, Tumore, Flossenschäden u.a.)

3.1.2.1 Beschreibung der Kriterien des IBI's nach Karr (1981)

3.1.2.1.1 Kriterien der Artenzahl- und zusammensetzung (Ebene 1)

Die *Artenanzahl* ist als Kriterium von Bedeutung für ein Ökosystem, solange man dieses in Beziehung setzt zur Biogeographie, zur Jahreszeit und zur Flußgröße. Die *Anwesenheit von intoleranten (= stenöken) Arten* korreliert mit der Güte eines Fließgewässers, da diese bei zunehmender Belastung durch anthropogene Einflüsse zuerst verschwinden würden. Die Verwendung der recht speziellen Parameter wird ähnlich begründet, da die Arten dieser Familien in *Artenanzahl und -zusammensetzung der Percidae, der Catostomidae und der Centrarchidae* in eine Toleranz-Rangfolge gegenüber Umwelteinflüssen gebracht werden können, so daß die Lebensgemeinschaften mit intoleranteren Arten eine bessere Wertung erhalten. Die gleiche Begründung wird für das Kriterium *Anteil an Individuen des Grünen Sonnenbarschs* angeführt, da diese euryöke Fischart mit dem Auftreten von Umweltdegradationen häufiger wird. Schließlich soll das Kriterium *Auftreten von Hybridindividuen* Habitatsverschlechterung anzeigen, da sich Fischarten entlang von Habitatsgradienten unterschiedlich verteilen und es so zu Hybridisierungen kommen kann. So gehen z.B. die ursprünglich diskreten Ablaichhabitate einiger Fischarten durch negative Umwelteinflüsse ineinander über.

3.1.2.1.2 Kriterien, die andere ökologische Faktoren berücksichtigen (Ebene 2)

Das Kriterium *Anteil der omnivoren Individuen* mißt eine Änderung der Fischlebensgemeinschaft als Folge eines veränderten Nahrungsangebotes. Dieses hängt von anthropogen beeinflussbaren Faktoren wie der Wasserqualität oder Landnutzung im Einzugsbereich des Fließgewässers ab. Da bei zunehmender Degradation die Vielfalt der Invertebratenfauna stetig abnimmt, leiden hierunter in erster Linie die Spezialisten, so daß auch deren Anteil abnehmen sollte. Da eine stark inverse Beziehung zwischen dem *Anteil an omnivoren Individuen* und der *Häufigkeit der (spezialisierten) insektivoren Cypriniden* besteht, wurde ebenfalls das letztere Kriterium aufgenommen. Da auch die Fischmenge ansteigt, wenn die Gesamttrophie eines Ökosystems zunimmt, wird die *Anzahl der Individuen in einer Stichprobe* ebenfalls berücksichtigt. Das Kriterium *Anteil der Top-Prädatoren* soll eine gesunde trophische Struktur anzeigen. Mit zunehmender Degradation nähmen v.a. die Arten an den Spitzen des Nahrungsnetzes ab. Das Kriterium *Anteil von Individuen mit Anomalien* wurde eingeführt, da Karr in stark verschmutzten Flüssen einen hohen Anteil von solchen Anomalien aufgefunden hat, die durch toxische Chemikalien etc. zumindest mitverursacht wurden.

3.1.2.2 Bewertung der Kriterien für die Bildung von Integritätsklassen nach Karr

Die Einteilung der Kriterienausprägung in verschiedene Qualitätsklassen erfolgt in Bezug auf eine „beste Stelle“, die *per definitionem* als unbelastet gilt und damit die beste Wertung erhält. Falls in dem zu untersuchenden Gebiet keine von Menschen unbelasteten Gewässer zu finden sind, muß eine Referenzstelle ausgesucht werden, die als solche die geringste Belastung aufweist. Für jedes Kriterium wird eine festgelegte Punktzahl entsprechend der jeweiligen Qualitätsklasse von 5, 3 oder 1 vergeben, wobei solche Stellen die höchste Punktzahl bekommen, die am ehesten in diesem Kriterium dem Zustand der Referenzstelle entsprechen, und jene bekommen die niedrigste Punktzahl, die diesem am wenigsten entsprechen. Die einzelnen Punktwerte jedes einzelnen Kriteriums werden dann zusammenaddiert: der Gesamtpunktwert gibt die Güte der gemessenen Gewässerstelle an (Tabelle 10).

Tabelle 10: Biotische Integritätsklassen sowie die generelle Beschreibung ihrer Eigenschaften gemäß dem IBI nach Karr (1981). Die Punktevergabe ergibt sich aus der Einzelpunktevergabe für einzelne Kriterien der Gewässergüte (siehe Text). Die maximale Punktzahl entspricht einer „unbeeinflussten“ Referenzstelle

Integritätsklasse	Eigenschaft
Exzellent (57-60 Punkte)	Keine anthropogene Beeinflussung feststellbar
Gut (48-52 Punkte)	Artenreichtum etwas unter Erwartung, v.a da die intoleranteren Arten verschwinden. Einige Arten mit suboptimaler Häufigkeit oder Größenverteilung; trophische Struktur zeigt Anzeichen von Streß.
Ausreichend (39-44 Punkte)	Dominanz von omnivoren, kontaminationsresistenten Formen; Wachstumsraten und Konditionsfaktoren meistens unterdrückt; viele Hybride und kränkelnde Fische.
Schlecht (28-35 Punkte)	Kaum Fische anwesend; meist eingeführte oder sehr tolerante Formen; Hybride häufig; Anomalien gewöhnlich.
Sehr schlecht (< 23 Punkte)	Kaum Fische anwesend; meist eingeführte oder sehr tolerante Formen; Hybride häufig; Anomalien gewöhnlich.
Keine Fische	-

3.1.2.3 Bisherige Modifikationen der IBI-Kriterien

Karr's IBI zeigt Probleme bei der Anwendung, da einige seiner ökologischen Annahmen für andere Habitate bzw. Regionen nicht bestätigt werden konnten oder weil die Biozönosen deutlich unterschiedlich von Karr's waren. Nachdem der IBI vorgestellt wurde, ist dieser häufig modifiziert worden, um ihn auf Gewässersysteme anderer Regionen anzuwenden.

3.1.2.3.1 Kritik an und Modifikationen von Karr's Kriterien der Artenzahl- und zusammensetzung

Lyons et al. (1996) weisen in ihrer Arbeit darauf hin, daß die bei Karr (1981) zugrundeliegende Annahme, daß Ökosysteme mit hohem Artenreichtum automatisch als besser zu bewerten seien als Systeme relativer Artenarmut, nicht immer zutrifft. Sie legen dar, daß bei Kaltwasserflüssen, deren Sommertemperatur 22 °C nicht übersteigt, eine Umweltdegradation oftmals zu einer Erhöhung des Artenreichtums führen würde, da eine kleine Anzahl von Kaltwasserarten durch eine größere Anzahl eurythermalen Arten und durch echte Warmwasserarten ersetzt würde. Sie verzichten daher auf einen Gesamtartenparameter und setzen stattdessen auf eine erhöhte Gewichtung der intoleranten Arten.

Karr's Kriterien, die die Artenanzahl und Zusammensetzung der Barsche, Sauger und Sonnenbarsche entsprechend ihrer Toleranzrangfolge behandeln, wurden immer dann modifiziert, wenn diese Gruppen entweder nicht die dominante ökologische Bedeutung haben wie im Mittleren Westen der USA (Steedman 1988; Bramblett & Fausch 1991, Minns et al. 1993, Lyons et al. 1996) oder aber nicht oder teilweise nicht vorhanden sind (Oberdorff & Porcher 1994, Harris 1995). Oberdorff & Hughes (1992) und Oberdorff & Porcher (1994) ersetzen diese Kriterien durch die *Anzahl der Arten des Freiwasserbereichs* und durch die *Anzahl der benthischen Arten*, weil durch diese Zuordnung ebenfalls ein Toleranzrangfolge ausgedrückt wird. Weitere Ersatz-Kriterien berücksichtigen jeweils die diesen Taxa entsprechenden ökologischen Gilden des untersuchten Habitats (z.B. Steedman 1988). Ähnliches gilt auch für das Kriterium *Individueller Anteil des Grünen Sonnenbarsches*: wo dieser nicht vorhanden ist oder aber nicht die dominierende tolerante Art darstellt, wurde dieses Kriterium durch entsprechende, habitats-typische Indikatorarten ersetzt (z.B. Steedman 1988). Grundsätzlich gilt es bei diesen Kriterien zu bedenken, daß eine Toleranzrangfolge oftmals auf dünner Datenbasis gründet, und von daher mehr Forschung nötig ist, um eine solche Rangfolge gesichert festlegen zu können (Miller et al. 1988). Weiterhin ist die Art der Toleranz auch von der Art der Störung abhängig, so daß Fische, die hinsichtlich einer Form von Störung sehr tolerant sein mögen (z.B. pH-Veränderung) gegenüber einer anderen (z.B. Begradigung) extrem intolerant sein könnten. Auch von daher sei ein einheitliches Toleranzranking sehr kritisch zu betrachten (Leonard & Orth 1986). Bei der

Anwendung dieser Kriterien muß klar sein, welche Form der Toleranz betrachtet wird und wie hoch deren ökologische Aussagekraft für das gesamte Ökosystem ist.

3.1.2.3.2 Kritik an und Modifikation von Karr's Kriterien, die ökologische Faktoren aufnehmen

Das Kriterium *Anteil an insektivoren Cypriniden* ist häufig verändert worden. In den von Karr untersuchten Gewässern des Mittleren Westens der USA ist der Anteil dieser dominanten trophischen Gruppe umgekehrt proportional zur Verschlechterung der Umwelt (Karr et al. 1986). Wo diese Bedingung nicht zutrifft, ist das Kriterium dahingehend geändert worden, daß es alle Insektivoren beinhaltet (Hughes & Gammon 1987) oder nur spezialisierte Insekten- oder Invertebratenfresser (Leonard & Orth 1986). Das Kriterium *Anteil der Top-Prädatoren* wurde teilweise oder ganz gestrichen, weil entweder keine Karnivoren vorhanden waren (Leonard & Orth 1986; Fausch & Schrader 1987) oder weil der Hauptkarnivor tolerant gegenüber verschlechterten Umweltbedingungen war (Hughes & Gammon 1987). Im letzteren Fall wurde dieses Kriterium ersetzt durch den *Anteil an Salmoniden*, die größer als 20 cm waren, mit der Überlegung, daß diese Top-Prädatoren stenök sind.

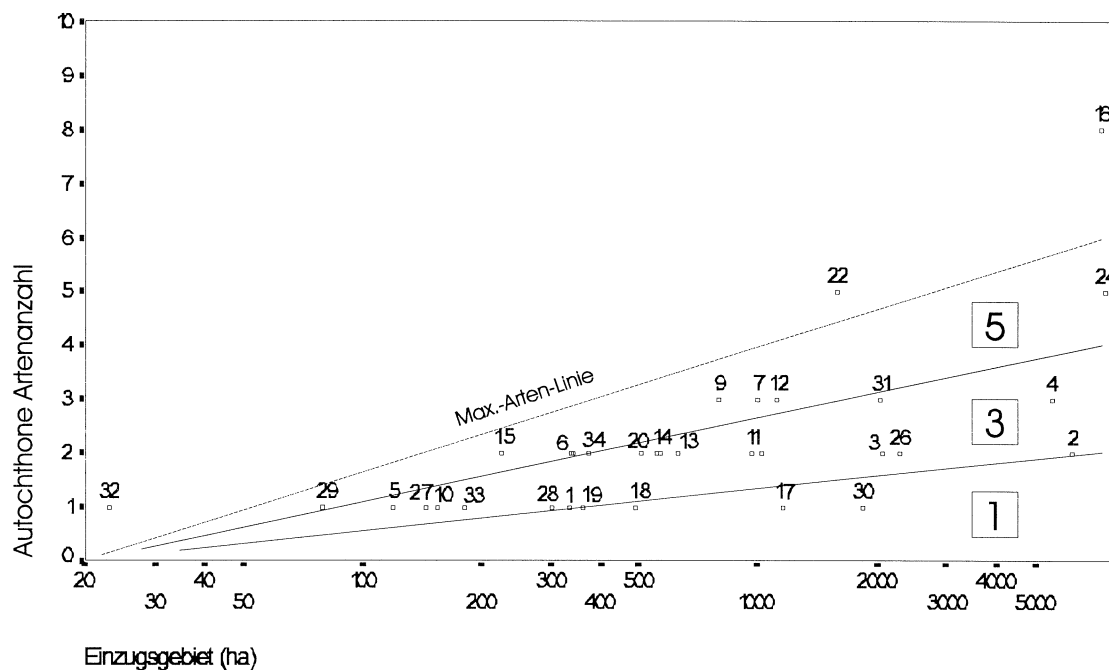
Wegen der oftmals willkürlichen Definition von „*Omnivoren*“ beim Kriterium *Anteil der omnivoren Individuen* (z.B. Arten mit einem Grünfutteranteil von mehr als 20% (Fausch et al. 1984)), schlugen Leonard & Orth (1986) vor, Arten stattdessen zu der trophischen Gruppen „*Generalisten*“ zuzuordnen. Denn sie haben die vorhergesagte Beziehung, daß mit zunehmender Degradation auch der *Anteil der Omnivoren* zunehmen muß, nicht bestätigen können. Jedoch wurde die Hypothese, daß mit zunehmender Degradation der *Anteil an Generalisten* zu- und der an Spezialisten abnimmt, bestätigt. Dies wird damit begründet, daß das Generalisten-Kriterium auch jene Fälle einschließt, in der Arten zwar nicht omnivor sind, jedoch trotzdem Generalisten, z.B. weil sie sich sehr flexibel andere Nahrungsquellen erschließen können („switching“). Gerade letztere Arten dominierten in der Studie aber die am meisten degradierten Flüsse.

Miller et al. (1988) führt an, daß die Ansicht, der *Anteil der Hybriden* würde mit zunehmender Degradation zunehmen, umstritten ist, da in einigen Studien die Hybridenhäufigkeit unabhängig von Umweltdegradationen war (Pflieger 1975; Ohio EPA 1987). Er schlägt vor, daß dieses Kriterium teilweise durch das *Ausmaß der Verdrängung durch Neozoen* ersetzt wird.

3.1.2.3.3 Berücksichtigung des Einzugsgebiets durch „Maximum-Linien“

Bei Karr's (1981) Index kann es zu einer Fehlbewertung einiger Kriterien kommen, da der Einfluß des Einzugsgebietes auf diese nicht berücksichtigt wird. So wird von Thompson & Hunt (1930) auf den Zusammenhang zwischen dem Stromeinzugsgebiet und dem Artenreichtum verwiesen, demzufolge die Artenanzahl mit der geometrischen Steigerung des (logarithmierten) Einzugsgebietes linear zunimmt.

Abb. 11: Beispiel einer Maximum-Arten-Linie (Erklärung siehe Text).



Dieser Zusammenhang kann mittels einer Maximum-Arten-Linie (*Maximum Species Richness Line*) berücksichtigt werden (Fausch et al. 1984). Hierbei wird ein Bezug zwischen der Flußordnung bzw. dem Einzugsgebiet (auf logarithmischer Basis) und der Artenanzahl hergestellt, indem für jede Flußordnung respektive Einzugsgebietsgröße die artenreichste Stelle als Anhaltspunkt für die Linienführung genommen wird. Diese Gerade definiert also eine exzellente Fischlebensgemeinschaft, so daß damit für alle anderen Gemeinschaften eine Wertung entsprechend der Flußordnung für den IBI vorgenommen werden kann. Unter dieser Linie, die graphisch angepaßt wird, sollen ungefähr 95% aller Stellen liegen (Abb. 11). Die Fläche unterhalb dieser Linie wird dann gedrittelt, um die entsprechenden Punktzahlen von 5, 3 bzw. 1 geben zu können. Fausch et al. (1984) schlagen vor, daß eine solche Maximallinie für jede Region anzufertigen ist, um nicht nur zu berücksichtigen, daß mit zunehmender Wasserführung

die Artenanzahl zunimmt, sondern um auch zoogeographische und geomorphologische Unterschiede zwischen den Regionen hinreichend mit einzubeziehen.

Analog nimmt mit zunehmendem Einzugsgebiet die Fischbiomasse und die Individuenanzahl zu bzw. pro Flächeneinheit ab (Thompson & Hunt 1930, Larimore & Smith 1963). Dieser Zusammenhang sollte nach Miller et al.(1988) ebenfalls in Form einer Maximum-Biomasse- bzw. einer Maximum-Dichte-Linie ähnlich der Maximum-Arten-Linie berücksichtigt werden.

3.1.3 Modifikation von Karr's IBI zur Applikation an Mittelgebirgsforellenbächen

3.1.3.1 Voruntersuchungen

Im Rahmen der Voruntersuchungen, die zur Modifikation von Karr's IBI für die Bachforellengewässer nötig waren, wurden folgende Kriterien und Parameter *a priori* auf ihre Eignung beurteilt (Details siehe Klein 1998).

Der für weitere Analysen angenommene signifikante Zusammenhang zwischen Einzugsgebiet eines Gewässers und Größe des Gewässers wurde statistisch überprüft und eine signifikante und hohe Korrelation bestätigt.

Wegen der geringen Parasitenlast aller untersuchten Bachforellen und wegen des Fehlens von offensichtlichen Hybriden in allen untersuchten Populationen und der damit verbundenen geringen Variabilität dieser Maße wurden diese Karr'schen Kriterien verworfen.

Wegen der Schwierigkeit, die Geschlechter von juvenilen und subadulten Bachforellen im Feld zu beurteilen, wurde auch das potentielle Kriterium „Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses“ verworfen.

3.1.3.2 Eine erweiterte Liste von Kriterien für den Forellenbach-IBI

Um das Konzept des Karr'schen IBI auf bayerische Salmonidengewässer anzupassen, wurden die ursprünglichen Kriterien nach intensiver Literaturrecherche und ersten Erfahrungen im Freiland modifiziert und erweitert. Zu den Kriterien aus den Kategorien *Artenreichtum und Zusammensetzung*, *Trophische Zusammensetzung*, und *Fischhäufigkeit und -kondition* wurde die *Struktur der Bachforellenpopulation* wegen der herausragenden Bedeutung dieser Art mit in diesen IBI aufgenommen. Insgesamt elf Kriterien wurden auf ihre Tauglichkeit für die Bewertung bayerischer Salmonidengewässer hin untersucht. Diese Kriterien und ihre Punktbewertung sind in Tabelle 11 zusammengefaßt (Erläuterung siehe untenstehender Text). Die Erstellung der Kriterien und ihre Bewertung beruht auf ökologischen Grundlagen des Bachökosystems, die im folgenden für jedes Kriterium getrennt besprochen werden. Die Intervallgrenzen, die bestimmen, wie ein Bach in einem Kriterium bewertet wird, werden entweder relativ zum Einzugsgebiet

(Maximum-Linien) oder absolut festgelegt. Die Punktwertung von 1 entspricht dem relativ höchsten Belastungsgrad, eine von 5 bzw. 4 dem niedrigsten Belastungsgrad, und eine von 3 bzw. 4 einem intermediären Belastungsgrad in dem jeweiligen Kriterium.

3.1.3.3 Ökologische Grundlagen und Klassierung der erweiterten Kriterienliste

3.1.3.3.1 Kriterium *Anzahl autochthoner Arten*

In den bayerischen Forellenbächen existiert aufgrund ihres hetero- und oligotrophen Charakters nur eine artenarme Fischfauna. Je nach Art und Größe des Baches sind folgende Arten als autochthoner Bestand dieser fischereibiologischen Region anzusehen (vgl. Müller 1983): Bachforelle (*Salmo trutta*), Äsche (*Thymallus thymallus*), Schmerle (*Barbatula barbatula*), Koppe (*Cottus gobio*), Elritze (*Phoxinus phoxinus*), Gründling (*Gobio gobio*), Hasel (*Leuciscus leuciscus*), Aitel (*Leuciscus cephalus*), Bachneunaugen (*Lampetra planeri*) und Quappe (*Lota lota*). Die Fischarten Bachforelle, Koppe, Äsche und Quappe lieben sauerstoffreiche, kiesige Gewässer (Ladiges & Vogt 1979, Müller 1983, Schadt 1993). Die beiden letzteren können als Vertreter der Äschen- bzw. Äschen-/Barbenregion in die Forellenregion hochsteigen, haben dort jedoch nicht ihr Hauptverbreitungsgebiet (Ladiges & Vogt 1979, Hänfling 1996). Hasel und Aitel sind strömungsliebend, haben aber eine höhere Toleranz gegenüber Gewässerbelastungen und damit einhergehende Sauerstoffzehrung. Das Vorkommen der Elritze ist mosaikartig: sie kann sowohl in ruhigen, laminaren und relativ verschmutzten Fließgewässern als auch in naturnahen Bachläufen vorkommen (Schadt 1993). Ähnliches gilt für die Schmerle, die sich außerdem aufgrund ihrer Ernährungsweise bevorzugt auf Feinsubstrat aufhält. Die Larven der Bachneunaugen (Querder) bevorzugen Sandsubstrate, in die sie sich eingraben können, in Bachabschnitten mit geringer laminarer Strömung (Prall- und Gleithänge). Die Neozoen Bachsaibling (*Salvelinus fontinalis*) und Regenbogenforelle (*Onchorhynchus mykiss*) sind in den untersuchten Bächen zwar vergleichsweise häufig anzutreffen, doch handelt es sich bei ihnen meist um Besatzfische. Deswegen und aufgrund ihres Neozoencharakters werden sie bei diesem Kriterium nicht berücksichtigt. Weiterhin nicht berücksichtigt werden typische Vertreter der Barben- und Äschenregion wie Plötze (*Rutilus rutilus*), Schleie (*Tinca tinca*), Nerfling (*Leuciscus idus*), Aal (*Anguilla anguilla*) und Flußbarsch (*Perca fluviatilis*) (Müller 1983, S.10 ff). Sowohl diese Arten als auch der Hecht (*Esox lucius*), ein typischer Vertreter von Stillgewässern, besiedeln Lebensräume, die in Bächen nur nach Degradierungsprozessen entstehen.

Tabelle 11: Potentielle Kriterien für die Evaluation der biotischen Integrität bayerischer Salmonidengewässer. Die Punktevergabe bei den einzelnen Kriterien ist im Text begründet. Die Maximum-Linien wurden jeweils empirisch ermittelt und sind ausführlich in Klein (1998) abgebildet und begründet. Ein Beispiel ist in Abb. 11 dargestellt.

Potentielle Forellenbach-IBI-Kriterien	Vorgeschlagene Punktevergabe
a. Kriterien der Kategorie „Artenreichtum und Artenzusammensetzung“	
Kriterium 1: Anzahl autochthoner Arten	Punktzahlvergabe über Maximum-Arten-Linie
Kriterium 2: Anteil der euryöken und für die Forellenregion untypischen Arten	5 Punkte: Anteil 0%; 3 Punkte: Anteil von 0 bis 25% 1 Punkt: Anteil > 25%
Kriterium 3: Vorkommen der intoleranten Arten <i>Cottus gobio</i> und <i>Lampetra planeri</i>*	4 Punkte: Vorkommen einer oder beider Arten; 2 Punkte: Vorkommen keiner der beiden Arten
Kriterium 4: Anteil der Individuen euryöker Arten	5 Punkte: Anteil < 10% 3 Punkte: Anteil von 10 bis 50% 1 Punkt: Anteil > 50%
b. Kriterien der Kategorie „Trophische Zusammensetzung der Fischgemeinschaft“	
Kriterium 5: Anteil der Generalisten (Individuen)	5 Punkte: Anteil < 5% 3 Punkte: Anteil von 5 bis 20% 1 Punkt: Anteil > 20%
c. Kriterien der Kategorie „Struktur der Bachforellenpopulation“	
Kriterium 6: Altersklassenaufbau	7 Punkte: mindestens 3 Altersklassen präsent 4 Punkte: 2 Altersklassen präsent 1 Punkt: 1 Altersklasse präsent
Kriterium 7: Anteil der Brut an der Gesamtpopulation (Individuen)	5 Punkte: Anteil mindestens 20% 3 Punkte: Anteil zwischen 10% und 20% 1 Punkt: Anteil geringer als 20%
Kriterium 8: Kondition	Punktevergabe über die Maximum-Konditions-Linie
Kriterium 9: Variabilität der Kondition	5 Punkte: Variabilität größer oder gleich 16,9 3 Punkte: Variabilität größer oder gleich 33,3 1 Punkt: Variabilität kleiner 16,9
d. Kriterien der Kategorie „Fischhäufigkeit“	
Kriterium 10: Biomasse (g/100 m)	Punktevergabe über die Maximum-Biomasse-Linie
Kriterium 11: Anzahl Individuen/100 m	Punktevergabe über die Maximum-Individuenhäufigkeits-Linie

*Die Bachneunaugen wurden im Feld nicht auf die Art bestimmt. Im Überschneidungsgebiet von Bachneunauge und Donaubachneunauge sind daher auch Fänge des letzteren (Gattung *Eudontomyzon*) möglich. In Oberfranken ist jedoch nur mit *Lampetra planeri* zu rechnen (Bohl, persönliche Mitteilung). Da in Niederbayern und Oberbayern keine Bachneunaugen gefunden wurden, wird im folgenden *Lampetra planeri* und Bachneunauge synonym verwendet.

Mit der ausschließlichen Berücksichtigung der autochthonen Arten bei diesem Kriterium wird verhindert, daß ein Bachlauf, in den echte Warmwasservertreter einwandern können, zu gut bewertet wird (siehe Kriterium *Anteil euryöker und untypischer Arten*). Bei diesem Kriterium wird die Artenvielfalt in Relation zur Größe des (logarithmierten) Einzugsgebietes gesetzt, da diese gewässergrößen- und damit einzugsgebietsabhängig ist. Damit soll ermöglicht werden, daß sehr nährstoffarme, kleine Gebirgsbäche, in denen natürlicherweise nur *S. trutta* vorkommt, eine Höchstwertung auch in diesem Kriterium erhalten können. Die jeweiligen Untersuchungsstellen mit den höchsten Artenbeständen für ihr Einzugsgebiet werden als die mit der relativ höchsten und damit besten Artenvielfalt angesehen. Durch diese wird graphisch eine Maximum-Arten-Linie gezogen, die die Hypotenuse des gebildeten rechtwinkligen Dreiecks darstellt (Abb. 11). Die Fläche dieses Dreiecks wird gedrittelt und jedes Drittel enthält den jeweiligen Punktwert.

3.1.3.3.2 Kriterium *Anteil der für die Forellenregion untypischen und euryöken Arten*

Dieses Kriterium soll bemessen, wie ursprünglich die Fischlebensgemeinschaft geblieben ist, d.h. ob es verschmutzungsresistenten Arten aus der unteren Äschenregion beziehungsweise oberen Barbenregion oder aber Besatzfischen gelungen ist, für sie untypische Lebensräume zu besiedeln. Eine solche Besiedlung hängt immer auch mit einer Degradierung des Baches zusammen, da die entsprechenden Fischarten im ursprünglichen Zustand entweder keine passenden Lebensbedingungen vorfinden oder aber dem hohen Konkurrenz- und Raubdruck der Bachforelle in diesem für sie suboptimalen Lebensraum nicht gewachsen sind. Da diese Arten toleranter gegenüber vielen Formen der Verschmutzung (v.a. Sauerstoffzehrung und Eutrophierung) sind als die typischen Forellenbachbewohner, verschiebt gerade eine anthropogene Beeinträchtigung des Habitats das Konkurrenzverhältnis zugunsten dieser Einwanderer. So toleriert die Plötze niedrige Sauerstoffsättigungswerte und besiedelt strukturarme Gewässer mit häufigen Pegelschwankungen wie z.B. den Main-Donau-Kanal, meidet aber gewöhnlich sommerkalte und schnellfließende Gewässer. Aitel und Hasel tolerieren Ammoniumwerte bis 5 mg/l, Phosphatwerte bis 2 mg/l und Sauerstoffsättigungswerte von unter 30%, Werte, bei denen die Bachforelle vergiftet wird. Auch die Elritze verträgt hohe Gewässerbelastungen (Phosphat bis 1,5 mg/l, Ammonium bis 4,5 mg/l). Der Flußbarsch ist ein Pionierfisch, der üblicherweise Stillgewässer wie Baggerseen, Stau- und Speicherseen besiedelt. Ansonsten erscheint er noch in langsamfließenden Flüssen, und hält sich dort vorzugsweise in den beruhigten Gewässerabschnitten auf.

Tabelle 12: Trophische Gilden, Ursprünglichkeit und Toleranz der Fischarten, die während dieser Studie gefunden worden sind. Autochthon (A), Neozoen (N)^a, Einwanderer (E)^a; Tolerante Arten (T), Intolerante Arten (IT); Invertivore (I), Detritusfresser (D), Piscivore (P), Omnivore (O), Filterer (FF); Generalist (G), Spezialist (S); Benthos (B), Freiwasserbereich (F)(modifiziert nach Oberdorff und Hughes 1992; Oberdorff und Porcher 1994)

Familie, Art	Ursprünglichkeit	Toleranz	Trophische Gilde		Lebensraum
Petromyzonidae <i>Lampetra planeri</i> / <i>Eudontomyzon</i> sp.	A	IT	FF	- ^b	B
Salmonidae <i>Salmo trutta</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Salvelinus fontinalis</i>	A N N	IT T T	I/P I/P I/P	S S S	F F F
Thymallidae <i>Thymallus thymallus</i>	A	IT	I	S	F
Cyprinidae <i>Leuciscus leuciscus</i> <i>Leuciscus cephalus</i> <i>Leuciscus idus</i> <i>Rutilus rutilus</i> <i>Tinca tinca</i> <i>Phoxinus phoxinus</i> <i>Gobio gobio</i>	A A E E E A A	T T T T T T T	O O I O O O I	G G S G G G S	F F F F B F B
Cobitidae <i>Barbatula barbatula</i>	A	T	I	S	B
Esocidae <i>Esox lucius</i>	E	T	I/P	S	- ^c
Percidae <i>Perca fluviatilis</i>	E	T	I/P	S	F
Cottidae <i>Cottus gobio</i>	A	IT	I	S	B
Gadidae <i>Lota lota</i>	A	IT	I/P	S	B

a) Neozoen: eingeführte Fische aus Nordamerika, E: Einwanderer aus anderen fischbiologischen Zonen Deutschlands

b) *Lampetra planeri* ist weder eindeutig den Spezialisten noch den Generalisten zuzuordnen

c) *Esox lucius* hält sich als Lauerjäger weder im Freiwasserbereich noch im Benthos auf

In der Forellenregion gilt die Bachforelle als der stärkere Kompetitor. Ähnliches gilt für den Hecht, der zudem noch krautigen Uferbewuchs benötigt und dessen Hauptnahrung aus Weißfischen, und zwar in allen Lebensstadien (außer als Brut) besteht. Teilweise wird der Hecht als intolerante Art beschrieben (Oberdorff & Hughes 1992), die auf Gewässerverbauungen sehr empfindlich reagiert (Schadt 1993). Dies liegt in der speziellen Brutbiologie des Hechtes begründet: er laicht an Kraut in überschwemmten Wiesen und Auen ab und ist damit auf Hochwasserphasen angewiesen. Bleiben diese z.B. aufgrund von Begradigungen aus, ist die Reproduktionsleistung des Jahrganges erheblich gemindert. Aus diesem Grunde sind selbstreproduzierende Bestände in Fließgewässern selten geworden. Da er jedoch als eine typische Stillwasserart angesprochen werden kann, die auch stark eutrophe Seen besiedelt, kann er hinsichtlich organischer Belastung als tolerant angesehen werden. Weiterhin ist der Hecht als Lauerjäger eine Art, die die strömungsstarken Forellenbäche gewöhnlich nicht besiedeln kann. Findet man Hechte in dieser Region, muß aus diesem Grunde von Besatz ausgegangen werden. Auch der Nerfling ist ein Bewohner größerer Fließgewässer oder Seen, der im Frühjahr zum Laichen in die Flüsse hochsteigt; gegenüber schlechter Wasserqualität ist er wenig empfindlich. Ebenfalls ein robuster Fisch ist die Schleie, die hohe Sommertemperaturen bis 28 °C bei Sauerstoffsättigungsgraden unter 15% überlebt (Schadt 1993).

Auch die Neozoen Bachsaibling und Regenbogenforelle werden als tolerante Arten angesehen. Deshalb können sie ebenfalls eine Verschlechterung des Lebensraumes anzeigen. Miller et al. (1988) sieht das Kriterium *Anteil der Neozoen-Individuen in einer Lebensgemeinschaft* als geeignet an, das Kriterium *Anteil der Hybridindividuen* zu ersetzen. Die Bachforelle hat in ihrem ursprünglichen Lebensraum eine hohe kompetitive Kraft gegenüber Regenbogenforelle und Bachsaibling (Gatz et al. 1987, Baran et al. 1995). Die Regenbogenforelle ist jedoch warmwasserresistenter als die Bachforelle und toleriert noch Sauerstoffsättigungen um 50%; der Bachsaibling toleriert wesentlich niedrigere pH-Werte, so daß er in versauerten Gewässern oftmals der einzige Salmonide ist (Schadt 1993). Nur wenn sich die Gewässer erwärmen oder versauern, können diese Arten daher langfristig neben der Bachforelle koexistieren bzw. diese sogar verdrängen.

Obwohl Elritze, Schmerle, Gründling, Aitel und Hasel in recht verschmutzten Gewässern leben können (der Gründling verträgt niedrige Sauerstoffwerte unter 40% Sättigung und bis zu 2,5 mg/l Phosphat), handelt es sich bei ihnen um autochthone Arten, die - in geringer Individuenzahl - auch natürlicherweise in der Bachforellenregion vorkommen können.

Die Arten mit negativem Indikatorwert für die Salmonidenbäche sind demnach Schleie, Nerfling, Plötze, Aal, Hecht und Flußbarsch, da sie aus einer anderen fischereibiologischen Region in die

Salmonidenregion eingewandert sind (oder aber eingesetzt wurden), sowie die meist eingesetzten Regenbogenforelle und Bachsaibling. Für die Bewertung muß der Anteil der euryöken und untypischen Arten klassifiziert werden: ein Habitat, das eine Besiedlung dieser Arten nicht ermöglicht, wird als sehr gut angesprochen; als Grenze zwischen mittelguten und schlechten Bächen werden 25%, also eine Fremdart auf drei autochthone Arten, gewählt.

3.1.3.3.3 Kriterium Vorkommen von *Cottus gobio* und *Lampetra planeri*

Nach Angermaier & Karr (1986) sind jene Kriterien am kraftvollsten bei der Unterscheidung von relativ gesunden Flußsystemen, die eine Bewertung der Anwesenheit und Abwesenheit intoleranter Arten vornehmen. Von den im Untersuchungsgebiet vorkommenden autochthonen Arten gelten insbesondere *Cottus gobio* und *Lampetra planeri* als intolerant gegenüber Habitatveränderungen (*Lampetra planeri*) und Wasserqualitätsverschlechterungen (*Cottus gobio*) (Verneaux 1981, Schadt 1993). Oberdorff & Hughes (1992) und Oberdorff & Porcher (1994) geben an, daß benthische Fischarten aufgrund ihrer Lebensweise besonders empfindlich auf Verschlammung und benthische Sauerstoffzehrung reagieren sollten. Dieses Argument ist zwar mit Hinblick auf die sehr toleranten benthischen Arten *Barbatula barbatula* und *Tinca tinca* kritisch zu bewerten, doch gibt schon der starke Rückgang der zwei Zeigerarten im Untersuchungsgebiet einen Hinweis auf ihre Empfindlichkeit.

Müller (1993) führt für Koppen aus, daß bereits eine geringfügige Beeinflussung der chemischen und organischen Belastung der Bergbäche, z.B. durch Veränderungen des Temperatur- und pH-Wertregimes, sowie eine Einschränkung der Migrationsmöglichkeiten der Koppen zu einem zunächst drastischen Abfall der Individuendichte der Art, später zum Verschwinden derselben führt. Diese kaltstenotherme Art bevorzugt schnellfließende Gewässer der Forellenregion oder kalte Seen (Ladiges & Vogt 1979, Müller 1983). Ein Großteil der Bestände ist deshalb auf die Oberläufe der Gewässer, v.a. der Mittelgebirgs- und Alpenregion, beschränkt. Durch Gewässerverschmutzung und Verbauungsmaßnahmen sind große Verbreitungslücken entstanden, so daß die Vernetzung der rezenten Vorkommen nur noch sehr unwahrscheinlich ist (Hänfling 1996). Verstärkt wird diese Tendenz durch die große Immobilität von *Cottus gobio*. Bis jetzt wurden lediglich kleinräumige Ortsbewegungen festgestellt: so beobachtete Waterstraat (1992) flußaufwärts gerichtete Wanderungen bis 150 m, die als Laichwanderungen gedeutet wurden. Downhower et al. (1990) haben bei Markierungsversuchen nur ausnahmsweise zurückgelegte Strecken von 50 m/Jahr festgestellt.

Typische Bachneunaugengewässer sind sommerkühle Bäche bis acht Meter Breite (Bohl 1993). Typisches Wohnsubstrat für die Querder ist Sand mittlerer Korngröße (3 mm) und typisches

Laichsubstrat ist Kies mittlerer Korngröße (ca. 18 mm). Schlamm und Torfe werden als Wohnsubstrate gemieden, die optimale Strömungsgeschwindigkeit für Neunaugenmikrohabitat liegt bei 20-30 cm/sec, einer Geschwindigkeit, bei der das bevorzugte harte Sandsubstrat nicht weggedriftet wird, Schlamm jedoch noch nicht sedimentieren kann.

Durch die Typisierung der Lebensweise der beiden Indikatorarten wird ein Problem bei der Evaluation von Bächen deutlich: ein Bach kann einen Mangel an Mühlkoppen haben, weil dieser aufgrund von anthropogenen Hindernissen nicht mehr (wieder-) besiedelt werden kann (vgl. Bless 1990), oder aber natürliche Hindernisse, z.B. in bergigem Gelände, machen eine Besiedlung unmöglich. In letzterem Falle würde der IBI ein solches Gewässer unterbewerten. Ähnliches gilt für das Bachneunauge: auch hier sind natürliche Gründe für ein Fehlen dieser Indikatorart, v.a. aufgrund der beobachteten Präferenz von Weichwasserbächen (vgl. Bohl 1993), denkbar. Von daher wurde die Punktvergabe mit 2 bzw. 4 zu vergebenden Punkten so gewählt, daß trotz eines unzulässigen Schlechtbewertens dieses Kriteriums die höchste IBI-Klasse bei sonst überragenden Werten immer noch erlangt werden kann, weiterhin aber die Indikatoreigenschaften dieser Tierarten für die Indizierung eines Gewässers genutzt werden. Falls eine dieser beiden Arten anwesend ist, wird der Bach gut bewertet, ansonsten erhält dieser den schlechteren Punktwert.

3.1.3.3.4 Kriterium *Anteil an Individuen euryöker Arten*

Die Erfassung des Anteils von euryöken Arten macht keine Aussagen über die Verteilung dieser Arten im Ökosystem, also über ihre relative Individuendichte. Weiterhin sind auch einige autochthone Arten der Forellenregion sehr tolerant gegenüber Gewässerverschmutzungen. Gründling, Schmerle, Elritze, Aitel und Hasel können in stark verschmutzten Gewässern hohe Bestandsdichten erreichen, da ihre Raubfeinde, vornehmlich Salmoniden, bei hohen Gewässerbelastungen eingehen. Von daher macht der Dominanzgrad dieser Arten eine Aussage über das Ausmaß chemischer Verschmutzungen.

Elritze, Schmerle, Gründling, Aitel und Hasel können in recht verschmutzten Gewässern leben. Der Gründling verträgt niedrige Sauerstoffwerte unter 40% Sättigung und bis zu 2,5 mg/l Phospat. Wüstemann (1991) führt an, daß sprunghaft steigende Haselpopulationen in der Salmonidenregion ein Anzeichen für Degradationsprozesse seien, die oftmals in engem Zusammenhang mit Talsperrenbauungen stehen würden. In Talsperreneinläufen fänden Haseljungfische oftmals optimale Bedingungen für den Aufwuchs (Hochwasserschutz, reichliches Nahrungsangebot): diese Tiere drängten in den Sommermonaten in die Oberläufe, um den dann ungünstig werdenden Bedingungen (Sauerstoffzehrung, hohe pH-Werte) auszuweichen. Hofer & Bucher (1993) bezeichnen Aiteln und Schmerlen zwar als gemeinhin besonders

abwasserresistent, weisen aber darauf hin, daß diese Fischarten, im Gegensatz zu Regenbogenforelle und Äsche, auf Klärwässer einer Zellstofffabrik heftig mit Kiemenschädigungen reagierten. Insgesamt reagierten Cypriniden jedoch v.a. gegenüber Schwermetallbelastungen unempfindlicher als Regenbogenforelle und Mühlkoppe. In dieses Bild paßt auch, daß sowohl die heimischen Cyprinidenarten als auch *Barbatula barbatula* wenig empfindlich auf Eutrophierungsprozesse reagieren. So werden Ammoniumwerte bis 5 mg/l (Aitel, Hasel, Schmerle), Phosphatwerte bis 2 mg/l (Aitel, Hasel, Schmerle) und Sauerstoffsättigungswerte von unter 30% (Aitel, Hasel) toleriert (Schadt 1993). Auch die Elritze verträgt hohe organische Gewässerbelastungen (Phosphat bis 1,5 mg/l, Ammonium bis 4,5 mg/l).

Ein geringer Dominanzanteil dieser Arten ist auch in intakten Ökosystemen zu erwarten. Bäche, die weniger als 10% von Individuen euryöker Arten aufwiesen, wurden als unbelastet angesehen (entspricht 5 Punkte); Bäche, bei denen Individuen dieser Arten eine Dominanz von mehr als 50% hatten, wurden bzgl. dieses Kriteriums als belastet angesehen (entspricht 1 Punkt).

3.1.3.3.5 Kriterium Anteil der Gesamtindividuen als Generalisten

Eine Unterscheidung zwischen Omnivoren, Piscivoren und Insektivoren ist schwierig, da sich die Nahrungsgewohnheiten der Fischarten im Laufe ihrer Lebensgeschichte oftmals ändern. Trotzdem lassen sich Präferenzen erkennen. Unter Berücksichtigung dieser Präferenzen wurden die Arten in Generalisten und Spezialisten eingeordnet, da die Aussagekraft durch diese Unterteilung erhöht wird (siehe oben, vergleiche Leonard & Orth 1986). Durch Eutrophierungsprozesse können sich die autochthonen sowie einwandernde Generalisten wie Schleie und Rotaugen ungewöhnlich stark vermehren, da sie durch starken Pflanzenwuchs und Verschlammlung mit veränderter Invertebratenfauna den spezialisierten Karnivoren gegenüber einen kompetitiven Vorteil erlangen. Eine starke Verschiebung zuungunsten der carnivoren Spezialisten hin zu den Generalisten läßt auf eine Degradierung des Gewässers schließen (Oberdorff & Porcher 1994). Unter den autochthonen Arten der Forellenregion (siehe oben) gibt es keine reinen Pflanzenfresser, da der (in der Regel) spärliche Bewuchs mit Algen und Moosen eine solche Spezialisierung nicht zuläßt, sondern diese bestehen vornehmlich aus carnivoren Spezialisten (also Insektivore und Piscivore) oder den Generalisten Elritze, Aitel, Hasel und Gründling. Letztere sind Generalisten in dem Sinn, daß sie Insekten oder gar Fische (große Hasel) fressen, aber auch pflanzliche Nahrung nicht verschmähen (Schadt 1993; Oberdorff & Porcher 1994). Eine Sonderstellung nehmen Bachneunaugen ein: bei diesen wurde auf eine Unterteilung verzichtet, da man diese Filtrierer mit einiger Spitzfindigkeit sowohl in die eine als auch in die andere Kategorie einordnen könnte.

Die Klassierung dieses Kriteriums erfolgt in engen Grenzen, da die Bestandsdichte der autochthonen Generalisten in intakten Ökosystemen sehr klein ist. Ökosysteme mit einem Generalisten-Dominanzgrad von kleiner als 5% von allen Individuen werden als unbelastet angesehen, solche mit einem von höher als 20% werden als belastet angesehen (1 Punkt).

3.1.3.3.6 Kriterium *Altersklassenaufbau der Bachforelle*

Gerade in Bächen, in denen man nur die Bachforelle findet, ist ein sorgfältiges Studieren der Forellenpopulation notwendig, um die Güte dieser Bäche untereinander noch hinreichend differenzieren zu können. Eine gesunde Altersstruktur mit allen Jahresklassen läßt auf eine gute Reproduktionsleistung der Forellenpopulation, integriert über mehrere Jahrgänge, schließen. Falls eine der ersten beiden Altersklassen fehlt, ist die Reproduktionsleistung dieses oder des letzten Jahrganges vernichtet oder verhindert worden, z.B. wegen Faulschlammabildung während der Laichperiode oder aufgrund von Versauerung. *Salmo trutta* kann als hochgradig polytypische Art verschiedenartigste Lebenszyklen ausprägen: so verbringen die anadromen (wandernden) Formen entweder einen Teil ihres Lebens im Meer (Meeresforelle), im Brackwasser oder im See (Seeforelle), um erst wieder zum Laichen in ihre Geburtsgewässer hochzusteigen; auch die stationären Formen zeigen jedoch begrenztes Migrationsverhalten (Gowan et al. 1994). So ist bekannt, daß gerade größere und damit ältere Tiere oftmals während der Schneeschmelze in die Vorfluter wandern (Gowan et al. 1994). Allen Formen ist jedoch gemeinsam, daß die 0+-Tiere im natalen Gewässer verbleiben (vgl. Elliott 1994, S. 15 ff.). Weiterhin gibt die Altersklassenstruktur einen Hinweis auf Besatzmaßnahmen. Diese führen häufig zu einheitlichen Längen-Häufigkeitsverteilungen, da meist eine Population mit einheitlicher Längenverteilung ausgesetzt oder/und weil durch den erhöhten Fraßdruck die jungen Altersklassen stark vermindert werden.

Von daher hängt es vom Forellentypus und von der Größe des untersuchten Fließgewässers ab, wieviele Altersklassen vorhanden sind. Da in den von uns untersuchten Bächen keine anadromen Formen (in Bayern nur Seeforellen) vorkommen, sollte man typischerweise mindestens drei Altersklassen erwarten. Gewertet wird das Fehlen von juvenilen Altersklassen. Sind 2+-Tiere vorhanden, wird für die Bewertung das Vorkommen der 0+- und 1+- Tiere herangezogen. Fehlen beide juvenilen Altersklassen, wird ein Bachlauf mit einem Punkt bewertet, fehlt einer der beiden juvenilen Altersklassen, wird er mit drei Punkten bewertet, sind schließlich alle beide vorhanden, erhält der Bachlauf fünf Punkte. Mit dieser Bewertungsmethodik wird verhindert, daß ein (sehr kleiner) Bach deshalb eine schlechtere Bewertung erfährt, weil die 2+-Tiere in die unteren Gewässerabschnitte abwandern. Dieses Kriterium wird im Vergleich zu den anderen Kriterien stärker gewichtet (mit 1, 4 und 7 Punkten), da die bisherigen Kriterien dann nicht greifen, wenn ein Bach zwar stark degradiert ist, schlechter migrierende Fischarten als die

Bachforelle wie Schleie oder Rotaugen evtl. natürliche bzw. anthropogene Migrationsbarrieren jedoch nicht überwinden können.

3.1.3.3.7 Kriterium *Anteil der (Bachforellen-)Brut an der Gesamtpopulation*

Kurz nachdem die Larven das Kiesbrutbett verlassen haben, steigt die Mortalität rapide an. Diese Empfindlichkeit der Brut kann mit dem Konzept der kritischen Überlebensperiode erklärt werden. Dieses wurde erstmals in der Meeresbiologie angewendet, da bei den meisten Meeresfischpopulationen eine hohe und plötzliche Larvenmortalität auftritt. Sie wird verursacht durch eine ungenügende Futterversorgung in dieser Phase des Lebenszyklus' der Larven, kurz nachdem diese ihren Dottervorrat aufgebraucht haben (Marr 1956, Morris 1956, Beverton & Holt 1957, May 1974).

Besonders empfindliche Organismen werden allgemein als Indikatoren gegenüber Umwelteinwirkungen verwendet. Die Brut reagiert auf jegliche Störung der Umwelt aufgrund der erhöhten Streßanfälligkeit dieser Lebensphase wesentlich empfindlicher als die Alttiere: von daher eignet sie sich gut als Indikator gegenüber chemischen oder physikalischen Veränderungen des Gewässers (Oberdorff & Porcher 1994). Falls Brut fehlt oder stark dezimiert ist, bedeutet dies eine Störung des Ökosystems im Jahr der Untersuchung.

Um der Elektrofischerei Rechnung zu tragen, bei der eine Schiefelage zugunsten der großen Fische und zuungunsten der kleinen Fische entsteht, wird der optimale Anteil der Brut an der Gesamtpopulation mit einem relativ geringen Anteil von 20% angegeben. Bäche, bei denen der Forellenbrutanteil weniger als 10% der gefangenen Forellen beträgt, werden als belastet definiert.

3.1.3.3.8 Kriterium *Höhe der Kondition*

Der Konditions- oder Korpulenzfaktor gibt die Gewicht-Längen-Beziehung einer Population wieder. Hiermit soll untersucht werden, inwieweit der Konditionsfaktor Aussagen über die Gesundheit oder Genährtheit einer Population treffen kann, da diese Beziehung recht genau den Körpergehalt an Protein und Fetten wiedergibt (Weatherley 1984). Der Konditionsfaktor K bleibt konstant, egal wie groß ein Tier wird, falls die linearen Proportionen (Körperform) konstant bleiben. Von daher kann er nur zwischen Populationen derselben Art verglichen werden, da nur dann die Gleichheit der Körperform gegeben ist (Jens 1980). Da die Bachforelle die Leitart der untersuchten Gewässer darstellt und ausnahmslos vorhanden war, wurden die Konditionswerte der einzelnen *Salmo trutta*-Populationen verglichen. Wenig Forschung wurde bzgl. der ökologischen Bedeutung der Kondition und ihrer Variabilität *zwischen* Bachforellenpopulationen betrieben (vergleiche die Zusammenfassung von Tesch 1968).

Der Ernährungszustand von Bachforellen wird vor allem durch das Nahrungsangebot und die Dichte der Population (wobei die Nahrungsverfügbarkeit auch dichteabhängig sein kann) bestimmt (vgl. Jenkins et al. 1996). Die Populationsdichte könnte die Korpulenz durch höhere Anfälligkeit für Parasiten und Krankheiten und durch indirekte Konkurrenz um Nahrungsressourcen bzw. direkte (Interferenz-) Konkurrenz um energetisch günstige Reviere beeinflussen. Das Nahrungsangebot könnte durch Nährstoffzufuhr positiv bzw. durch Toxifizierungen negativ beeinflusst werden. Es sind also anthropogene Einflüsse (Besatz, Eutrophierung und Toxifizierung) denkbar, die einen sichtbaren Effekt auf die mittlere Kondition haben könnten. Auf der anderen Seite ist es nicht ausgeschlossen, daß natürliche Faktoren wie das standortspezifische Nährstoffangebot, Jahreszeit und geomorphologische Beschaffenheit der Fließgewässer das Nahrungsangebot und damit die Korpulenz so stark beeinflussen, daß die anthropogen bedingten Einflüsse nur schwer zu evaluieren sind. So konnten Brett et al. (1969) zeigen, daß der Anteil von Wasser, Protein und Fetten in *Oncorhynchus nerka*-Brut durch die Größe und Zusammensetzung der Nahrung und durch die Wassertemperatur beeinflusst wurde. Weitere Studien (z.B. Elliott 1984) haben gezeigt, daß Fische in kalten und nährstoffarmen Bächen weniger fressen, weniger schnell abwachsen und folglich auch eine geringere relative Kondition haben sollten. Auch ist denkbar, daß die Strömungsgeschwindigkeit die Kondition beeinflusst in dem Sinne, daß Fische in steilen, schnellfließenden Bergbächen mehr Energie aufwenden müssen für den Standortverbleib und damit weniger gut genährt wären als in vergleichbaren Niederungsbächen.

Um dem Umstand Rechnung zu tragen, daß sich die Trophie eines Gewässers mit zunehmender Größe vergrößert (ausführlich Lampert & Sommer 1993, S. 367 ff), werden auch bei diesem Kriterium die Konditionsmittelwerte der Populationen für die Punktwertung in Relation zum Einzugsgebiet gesetzt (Maximum-Konditions-Linie).

3.1.3.3.9 Kriterium *Variabilität der Kondition*

Der oben beschriebene Konditionsfaktor gibt die mittlere Kondition einer gesamten Population an, macht aber keine Aussage über die Kondition der einzelnen Individuen innerhalb der Population. Schon lange ist jedoch bekannt, daß die Kondition der einzelnen Individuen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, z.B. während des frühen Wachstums, vor und nach dem Ablachen, vor und nach Wanderungsbewegungen etc. bei Salmoniden stark variieren kann. Innerhalb der Mitglieder einer Population besteht eine Variabilität auch hinsichtlich dieses Merkmals, da diese Prozesse nicht zeitgleich bei allen Individuen ablaufen (Weatherley 1984). Das Ausmaß der Variabilität sollte wichtige Informationen über den Zustand der Population enthalten. Diese Information läßt sich für die Bewertung von Ökosystemen heranziehen, sofern die der Variation

zugrundeliegenden ökologischen Mechanismen verstanden sind. Leider ist wenig Anstrengung unternommen worden, Variabilitäten von ökologischen Parametern im allgemeinen und vom Konditionswert im besonderen zu untersuchen, da der Schwerpunkt des Interesses meist auf Mittelwerten gelegen hat, um klare Aussagen aus meist großen Datenmengen zu extrahieren (Elliott 1994, pp. 209 ff).

Für die Bewertung der Variabilität läßt sich folgendes Modell heranziehen, das für die Bachforelle gelten könnte: wenn sich eine Population im Gleichgewicht mit ihrer Umwelt befindet, sollte ihre Dichte so groß sein, daß die Umwelt diese Population gerade ernähren kann („carrying capacity“). Diese hohe Dichte mit einer resultierenden hohen Interaktion zwischen den Individuen sollte zu einer relativ hohen Variabilität führen, da einige wenige Individuen einen großen Ressourcenanteil monopolisieren können, während andere durch dominante Individuen in ungünstigere Teilhabitate verdrängt werden. Die erste Gruppe würde durch einen guten Nahrungsressourcenzugriff dann eine hohe Kondition haben, die zweite jedoch durch einen schlechten Zugriff eine niedrige (es folgt hieraus eine bimodale Verteilung der Kondition). Verstärkt werden sollte dieser Effekt, wenn die Forellenpopulationendichte über die Tragekapazität ansteigt. Dies ist denkbar aufgrund von Besatz oder aufgrund von zwischen den Jahren variierendem Nahrungsangebot (dieses könnte z.B. durch Eutrophierung in vergangenen Jahren, die im Beobachtungsjahr aufgehört hat, induziert werden) mit der Folge einer relativen Überpopulation in einem Jahr geringer Nahrungsversorgung. In toxischen oder halbtöxischen Umwelten sollte die Variabilität der Kondition stark abnehmen, weil unter physiologischem Streß (niedriger pH-Wert, Sauerstoffgehalt; hohe Temperatur etc.) viel Energie für die Aufrechterhaltung der Körperfunktionen verbraucht werden muß, so daß die Kondition verhältnismäßig gering ist. Aus einer erhöhten Mortalitätsrate bzw. geringeren Neurekrutierung würde eine geringere Populationsdichte resultieren und damit weniger Interaktion zwischen den Individuen stattfinden. Dies hätte zur Folge, daß jedes Individuum sein (vom Nahrungsangebot und Genotypen abhängiges) Konditionspotential in den Grenzen, die die Umwelt setzt, dichteunabhängig ausschöpfen kann, so daß die Kondition innerhalb der Population nicht stark variiert.

Dieses Modell macht einige grundlegende Annahmen, die für die Bewertung der Konditionsvariabilität als Kriterium entscheidend sind: einmal müßte eine dichteabhängige Nahrungsressourcenbegrenzung (viele Beutetiere wie Eintagsfliegenlarven reagieren aktiv auf die Forellendichte) vorhanden sein, so daß Interaktionen zwischen Individuen zu einer Änderung der individuellen Kondition führen. Diese Interaktionen müssen positiv dichteabhängig sein, so daß mit zunehmender Dichte die Variabilität zunimmt. Schließlich müssen Interaktionen zwischen Individuen in ungünstigen Umwelten fast ganz zum Erliegen kommen, da Bachforellen in solchen Umwelten keine hohen Dichten erreichen. Dann wäre auch keine oder fast keine

Dichteabhängigkeit mehr zu beobachten. In lebensfeindlichen Umwelten sollten dichteunabhängige Faktoren die dominierende Rolle spielen, in günstigen Umwelten sollten dies dichteabhängige sein.

Gemäß dem vorgeschlagenen Modell erhalten Populationen, die eine sehr geringe Konditionsvariabilität haben, die schlechteste Bewertung. Demgegenüber werden intermediäre Populationen, die sich gemäß dem oben vorgeschlagenen Modell am ehesten in einer Gleichgewichtsphase mit der Umwelt befinden, am besten bewertet. Die Populationen mit der höchsten Variabilität in diesem Merkmal erhalten eine intermediäre Bewertung, da es sich hier um bis vor kurzem gestörte Populationen und/oder um solche mit starkem Besatzeinfluß handeln könnte. Da es sich um ein relatives Merkmal handelt, wird die Obergrenze der erreichten Variabilität graphisch bestimmt und diese angenommene Maximalvarianz in drei verschiedene Gruppen gemäß dieses Bewertungsschemas unterteilt.

3.1.3.3.10 Kriterien *Individuenanzahl und Fischbiomasse*

Die Individuenanzahl und Fischbiomasse enthalten Information über die Dichte einer Fischpopulation, wenn sie in Relation zur Gewässergröße gesetzt werden. Die Individuendichte hat wiederum Einfluß auf ökologische Parameter wie Konkurrenz (um Nahrung, Partner, Laichplätze etc.), Gesundheit (z.B. Parasitenbefall) und Raubdruck. Der Mensch beeinflusst die Fischhäufigkeit entweder direkt durch Besatz oder indirekt durch Eutrophierung des Einzugsgebietes und damit des Gewässers (durch Landwirtschaft, Rohdung etc.). Oftmals geht eine Eutrophierung mit dem Rückgang von empfindlichen Arten einher (Maitland & Lyle 1991), hierbei reagieren Salmoniden besonders sensibel (Maitland 1984). Die Wahrscheinlichkeit ist hoch, daß in einem Gewässer mit sehr hoher Fischdichte -unter Berücksichtigung der natürlichen Verschiedenartigkeit- diese sekundär, d.h. durch anthropogene Einflußnahme, (mit-) beeinflusst wurde. Da Nährstoffeintrag, Primärproduktion und Fischproduktivität generell positiv miteinander korreliert sind (Le Cren & Lowe-McConnel 1980), ist dieses Kriterium die direkteste Maßeinheit für Eutrophierungsprozesse im Ökosystem.

Weiterhin ist ein Bachlauf, der fischbiologisch verödet ist, mit großer Wahrscheinlichkeit anthropogen, z.B. durch chemische (Versauerung, Schwermetalleintragung, Versalzung etc.) oder physikalische Prozesse (Verbauungen von Laich-, Brut oder Wohnhabitaten, Begradigungen, Migrationssperren), beeinflusst worden. Als wichtigste Ursache der chemischen Verödung von Gewässern ist im Untersuchungsgebiet die Versauerung zu nennen, deren Auswirkungen bei „Anteil der Brut an der Gesamtpopulation“ besprochen wurden.

Das Fischhäufigkeitskriterium sollte also verschiedenartige Störungen integrieren können. Ein Bachlauf mit relativ sehr niedriger Fischdichte erhält eine Punktzahl von 1, einer mit sehr hoher

Fischdichte eine Punktzahl von 3 und solche mit mittlerer Dichte eine Punktzahl von 5, da bei diesen Populationen die Wahrscheinlichkeit einer Störung am geringsten ist. Da die Trophie eines Gewässers in Bezug steht zu seiner Größe und damit zu seinem Einzugsgebiet, wird auch diese Bewertung relativ mittels einer Maximum-Biomasse-Linie bzw. einer Maximum-Individuen-Linie durchgeführt.

Die fischökologischen Grundlagen sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

3.1.4 Ermittlung einer IBI-unabhängigen Gesamtgewässergüte der untersuchten Gewässer auf Grundlage der organismischen und chemischen Daten

Auf Grundlage der halbquantitativen und der Cluster-Analyse wurde eine Gesamtgewässergüteabschätzung auf der Basis der IBI-unabhängigen Daten in einer vierstufigen Skala (Punktwert von 1= unbelastet; Punktwert von 4= kritisch belastet) vorgenommen. Dazu wurden die Ergebnisse der Chemiewerte in fünf Belastungsstufen zusammengefasst. Diese sind a) kritisch belastet, b) mäßig belastet, c) mäßig- bis niedrig belastet, d) niedrigbelastet und e) nicht belastet. Die signifikanten Ergebnisse des Saprobienindex⁹ werden zu den vier Klassen zusammengefasst: a) kritisch belastet (= α - bis β - mesosaprob), b) mäßig belastet (= β - mesosaprob), c) gering belastet (= oligo- bis β -mesosaprob) und d) nicht belastet (=oligosaprob). Weiterhin bedeutet ein Säurezustandswert von 3 oder 4 eine Gewässerbelastung, einer von 2 eine geringe Belastung und einer von 1 keine Belastung. Auf die Einzelergebnisse der Messungen kann aus Platzgründen hier nicht eingegangen werden, weswegen wir auf Klein (1998) verweisen.

Diese halbquantitativen Bewertungen werden zu einer einheitlichen Belastungsbewertung zusammengefasst (Tabelle 13).

Tabelle 13: Zuordnung der Bewertungstabellen der Gewässergüte durch organismische Analysen und chemische Messungen.

Belastungsbewertung	Saprobienindex	Chemische Messungen	Säurezustands-klasse
Belastet	kritisch belastet	kritisch belastet	4
	mäßig belastet	mäßig belastet	3
Gering belastet	gering belastet	mäßig bis gering belastet gering belastet	2
Nicht belastet	nicht belastet	nicht belastet	1

Die Güteeinschätzung (in 3 Stufen) zwischen (signifikantem) Saprobienwert und chemischen Messungen wurde korreliert, um die Verlässlichkeit der Datenerhebung zu evaluieren. Unterscheiden sich beide Einschätzungen um zwei Bewertungsstufen, wurden die Ergebnisse für die Bewertung des Forellenbach-IBI's nicht mehr herangezogen (es sei denn, eine Säurebelastung wird nachgewiesen). Für die Gesamtbewertung des Forellenbach-IBI's wurde bei einem Unterschied von einer Bewertungsstufe das Ergebnis des Saprobienindex' herangezogen, da dieser auf der verlässlicheren Methode basiert. Ebenso wurden die Ergebnisse der Säurezustandsanalyse (der Bäche mit einer Säurezustandsklasse von ≥ 2) mit den Ergebnissen der chemischen Güteabschätzungen korreliert. Unabhängig von den chemischen und saprobiellen Ergebnissen führt ein Säurezustand der Klasse 4 zu der schlechtesten Bewertung (kritisch belastet), ein Säurezustand der Klasse 3 zu einer ebenfalls schlechten Bewertung (mäßig belastet), und ein Säurezustand der Klasse 2 zu einer intermediären Bewertung (gering belastet). Untersuchungsstellen ohne signifikante Saprobienindices wurden nur dann - gestützt auf die chemischen Messungen - für die Bewertung des IBI's herangezogen, wenn ihre chemische Einstufung mit der (nicht-signifikanten) Saprobienindex-Einstufung nicht um mehr als eine Gütestufe divergiert. Um die Ergebnisse der halbquantitativen Analysen abzusichern und zu überprüfen, wird eine Clusterung der Daten vorgenommen. Die Clusteranalyse wurde v.a. dazu herangezogen, um Untersuchungsstellen, die bei der Analyse des Makrozoobenthos zu keinem signifikanten Ergebnis geführt haben, anhand der Ergebnisse der chemischen Untersuchung verlässlicher in eine Gütekatgorie einordnen zu können (Details dazu siehe Klein 1998). Die Einzelbewertung der 34 Untersuchungsstellen ist in Tabelle 14 zusammengefasst und bildet zusammen mit der Korrelationsanalyse der Einzelkriterien mit Gewässerparametern die Grundlage für die Evaluation des Forellenbach-IBI's via Vergleich mit IBI-unabhängigen Daten der gleichen Untersuchungsstellen.

Tabelle 14: Gesamtgüteabschätzung aller für die Evaluation des Forellenbach-IBI's untersuchten Gewässer. Durch die Clusteranalyse werden einige Bäche umgruppiert und aufgrund der Ergebnisse der organismischen und chemischen sowie der Clusteranalyse werden drei Bäche als kritisch belastet eingestuft (siehe Text). Bäche, die mit „s“ und mit „c“ gekennzeichnet sind, haben eine Absicherung der Güte durch Saprobienindex + chemische Messungen; solche mit „c“ und „cl“ eine Absicherung durch chemische Messungen und Clusteranalyse und solche mit „z“ eine Absicherung durch die Säurezustandsbestimmung (^sSaprobienindex, ^{s*}nicht-signifikanter Saprobienindex ^cChemie, ^zSäurezustand, ^{cl}Clusteranalyse). Die Güte des Ailsbaches wird noch durch den nicht-signifikanten Saprobienindex (s*) unterstützt; bei Schindelbach I und Langenaubach ist das Ergebnis von saprochemischer Untersuchung und Clusteranalyse widersprüchlich (siehe Text). ** diese Bäche werden bei Güte 1 mit dem Punktwert von 2, bei der Güte 2 mit dem Punktwert von 1 bewertet.

Gewässergüte	Untersuchungsstelle
Kritisch belastet (Punktwert=4)	Ailsbach ^{s*,c,cl} , Krumbachwasser ^{c,cl} , Schindelbach (Ndb.) ^z
Mäßig belastet (Punktwert=3)	Bibersbach ^{s,c} , Haidenaab ^{s,c} , Lamitz ^{c,cl} , Teisnach ^{s,c} , Fornbach ^{s,c} , Zaubach ^{s,c} , Schulmühlbach ^{c,s} , Bibersbach ^{c,s} , Erlachbach ^{s,c} , Muckelbrunnenbach ^{c,s} , Große Ohe ^z , Höllbach II (Rehau) ^z , Mähringsbach ^z
Gering belastet (Punktwert=2)	Kirnbach ^{s,c} , Grümpelbach ^{s,c} , Kremnitz ^{s,c} , Mathelbach ^{s,c} , Steinselb ^z , Haaraauer Seige ^z , Forellenbach ^z , Kalte Moldau ^z , Mönchsbach ^{s,c} , Schindelbach I (Obfr.) ^{s,c,cl,**} , Langenaubach ^{s,c,cl,**}
Nicht belastet (Punktwert=1)	Mühlbach ^{c,cl} , Höllbach I ^{c,cl} , Kohlgraben ^{s,c} , Wolfertsrieder Bach ^{s,c} , Dreierherrenbrunnen ^{c,cl}

3.1.4.1 Analyse und Bewertung einzelner Kriterien für einen Forellenbach-IBI entsprechend der Ergebnisse der Befischungen

Auf detaillierte Einzelergebnisse der Befischungen und die Ergebnisse einzelner Korrelationsanalysen soll in diesem Bericht nicht eingegangen werden, weswegen wir auf Klein (1998) verweisen. Tabelle 15 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Korrelationsanalysen der IBI-Kriterien aus den Befischungen mit denen der IBI-unabhängigen Kriterien. Diese Tabelle 15 bildet die Basis für die nachfolgende Diskussion der Einzelkriterien auf ihre Verwertbarkeit innerhalb eines für Forellenbäche modifizierten IBI's.

Tabelle 15: Korrelation jedes IBI-Kriteriums mit der Gesamtgüteabschätzung, basierend auf Säuregüteklassifizierung, Saprobienindex und chemischen Stichprobenmessungen; Variabilitätskoeffizient (CV); Schiefemaß; Test auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) (Güte2 ist die Gesamtgütebewertung mit Besserbewertung von Schindelbach und Langenaubach; arcsin und sqrt sind arcsin- und Quadratwurzel-Transformationen der Daten; alle anderen Daten sind für Pearson- und bei Kolmogorov-Smirnov- Tests lg-transformiert; *signifikant, **hoch signifikant). Anzahl der Stichproben ist 31.

Kriterium	Güte Spearman's	Pearson's	Güte Spearman's 2	Pearson's	CV	Schiefe	Nor- mal
Artenreichtum	0,394 p=0,028*	0,396 p=0,027*	0,398 p=0,027*	0,403 p=0,02*	,69	2,38	0,05
Euryöke Arten	0,197 p=0,28	-	0,171 p=0,35	-	1,49	1,11	0,00
ohne Salmo- nide	0,413 p=0,021*	-	0,410 p=0,022*	-	2,32	2,32	0,00
Intolerante Arten	0,164 p=0,37	-	0,156 p=0,40	-	,958	,60	0,00
Mühlkoppe	0,114 p=0,539	-	0,106 p=0,57	-	1,07	,12	0,00
Bachneunauge	0,09 p=0,95	-	0,118 p=0,52	-	2,19	1,77	0,00
Euryöke Ind.	0,462 p=0,009**	0,501^{arsin} p=0,004**	0,446 p=0,012*	0,500^{arsin} p=0,004**	7,80	2,44	0,00
Generalisten (Ind.)	0,48 p=0,006**	-	0,48 p=0,006**	-	2,19	2,32	0,00
Altersklassen- struktur	-0,314 p=0,08	-	-0,331 p=0,06	-	,43	-2,36	0,00
ohne Grümpelbach	-0,328 p=0,04*	-	-0,391 p=0,03*	-	,25	-2,66	0,00
Brutanteil	-0,262 p=0,154	-0,263 ^{arsin} p=0,15	-0,304 p=0,09	-0,291 ^{arsin} p=0,11	,83	,43	0,71
Kondition	0,163 p=0,38	0,175 p=0,345	0,096 p=0,60	0,114 p=0,53	,60	1,94	0,98
Variabilität	-0,299 p= 0,1	-0,323 p=0,076	-0,358 p=0,048*	-0,362 p=0,045*	,50	2,32	0,81
Biomasse	0,198 p=0,28	0,203 p=0,272	0,213 p=0,24	0,220 0,23	1,21	2,28	0,97
ohne Korrekturfaktor	0,211 p=0,253	0,199 p=0,28	0,225 p=0,22	0,207 p=0,26	1,15	1,75	0,93
Gesamtind.	-0,141 p=0,44	-0,119 ^{sqrt} p=0,52	-0,134 p=0,47	-0,10 ^{sqrt} p=56	,75	1,3	0,84

Zur Statistik in Tabelle 15: Nur das Kriterium „Altersklassenstruktur“ hat eine extrem rechtsschiefe Verteilung (Schiefe = -2,36) und eine geringe Variabilität, da bei fast allen Untersuchungsstellen beide Altersklassen vorhanden waren (Tabelle 20). Die Verteilung von fast allen anderen Kriterien ist stark linksschief mit Schiefe-Statistiken über 1,5. Dies bedeutet, daß die Masse der Untersuchungsstellen Werte links auf der Skala haben, mit starken Abweichungen von einigen statistischen Ausreißern. Diese starken Abweichungen machen sich wiederum in der durchgängig starken Variabilität von meist weit über 50% bemerkbar. Die Verteilungen mit der extremsten Schiefe, nämlich die der Kriterien „Anteil der euryöken Arten“, „Generalisten“ und „Altersklassenstruktur“, mit vielen Werten am äußersten Ende der Skala, können nicht normalisiert werden. Von daher wurden hier nur nicht-parametrische Tests durchgeführt. Gleiches gilt für das Kriterium „Anzahl der intoleranten Arten“, da hier nur zwei Klassen („vorhanden“ und „nicht vorhanden“) möglich waren. Da sich diese Klassen gleichmäßig verteilen, ist dieses Kriterium relativ symmetrisch (Schiefe nahe null). Ebenso symmetrische Verteilungen sind „Vorhandensein der Mühlkoppe“ und „Brutanteil“. Die Verteilungen der transformierten Daten, die am ehesten einer Normalverteilung entsprechen, sind „Gesamtindividuen“, „Biomasse“ (mit und ohne Korrektur), „Variabilität“, „Kondition“ und „Brutanteil“. Auch „Artenreichtum“ wird als normalverteilt angesehen, da das Signifikanzniveau von 0,01 (zur Ablehnung der Nullhypothese, daß keine Normalverteilung vorhanden ist) nicht erreicht wird.

3.1.4.1.1 Kriterium Anzahl autochthonen Arten

Überraschend ist die leichte und positive Korrelation des autochthonen Artenreichtums mit der Gesamtgewässergüte. Dies bedeutet, daß mit zunehmendem Artenreichtum die saprochemische Güte abnimmt. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß die meisten Arten in größeren Gewässern vorgefunden wurden, und daß diese aufgrund des größeren Einzugsgebietes meist auch eine höhere chemische Belastung aufwiesen. Diese Beziehung zeigt sich, wenn die Untersuchungsstellen willkürlich in Bäche mit Einzugsgebieten größer und kleiner 1000 ha unterteilt werden. Die erste Gruppe hat eine mittlere Güte von 2,21, die zweite eine von 2,75 (t-Test auf Gleichheit der Mittelwerte: $p=0,099$; $n=31$). Noch deutlicher wird der Unterschied, wenn die mittlere korrigierte Güte (= Güte 2) (2,10 bzw. 2,75; $p=0,065$; $n=31$) als Gütemaß verwendet wird. Dieses Kriterium sollte in der Lage sein, Umweltverschlechterungen jenseits von Veränderungen der chemischen Wassergüte aufzuzeigen. So beeinflussen Migrationsbarrieren, Gewässerbegradigungen mit Veränderung des Fließregimes, Verschlammungen und andere Faktoren maßgeblich den Artenreichtum. Da beim Dreiherrnbrunnen keine chemischen Belastungen gefunden worden sind, und dieser trotzdem über eine sehr geringe Artenzahl verfügt, ist es möglich, daß die biotische Integrität des gesamten Gewässersystems herabgesetzt ist. So ist von *Cottus gobio* bekannt, daß viele taugliche Gewässer nicht (wieder-) besiedelt werden können, weil diese Art im jeweiligen Vorfluter nicht vorhanden ist bzw. der Vorfluter keine günstigen Lebensbedingungen für diese Art enthält (vgl. Hänfling 1996). Auch bei der Haide-naab kann die Erklärung für die geringe Artenzahl in nicht-chemischen anthropogenen Belastungen liegen, da dieser Bach im Zuge einer Flurbereinigung begradigt und ausgebaggert wurde. Hierdurch gehen aber gerade Nischen für Kleinfische, die nötig sind, um dem Raubdruck der Bachforelle zu entgehen, verloren. Auf der anderen Seite stehen die stark verschmutzten Untersuchungsstellen Ailsbach und Schindelbach (Ndb.), die die Bestwertung in diesem

Kriterium erhalten. Da der Bachmuschelbach Ailsbach trotz seines hohen Verschmutzungsgrades einer kleinen Mühlkopfenpopulation Lebensraum gibt, könnte es sein, daß der Prozess der Habitatsverschlechterung noch nicht abgeschlossen ist. Eine andere Situation liegt beim Schindelbach vor. Diese Untersuchungsstelle „profitiert“ von seinem kleinen Einzugsgebiet, weshalb es die Bestwertung erhält, obwohl nur *Salmo trutta* angetroffen wurde. Bei diesem Bach existiert eine starke Migrationsbarriere in Form eines 50 m langen Rohres durch einen Eisenbahndamm, so daß zu vermuten ist, daß selbst die Bachforellen-Migration wesentlich beeinträchtigt ist. Andere Arten wie Mühlkopfen können diese Barriere jedoch nicht überschreiten. Hier wäre also die schlechteste Bewertung angemessen. Dieses Kriterium wird trotz der gegensätzlichen Beziehung mit der chemischen Güte in den Forellenbach-IBI aufgenommen, weil eine hohe Korrelation mit der Gewässergüte nicht erwartet wird. Um dieses Kriterium und die Maximum-Arten-Linie besser abzusichern, wäre eine größere Datenmenge, also mehr Untersuchungsstellen, erforderlich. Das gilt für jedes Kriterium, bei dem die Bewertung relativ mittels einer Maximum-Linie vorgenommen wurde.

3.1.4.1.2 Kriterium Anteil der euryöken und für die Forellenregion untypischen Arten

Dieses Kriterium sollte sensibel auf chemische Umweltdegradierungen reagieren und von daher eine feststellbare Korrelation mit der saprochemischen Gewässergüte aufweisen. Hier zeigt es sich, daß eine solche nur gegeben ist, wenn die allochthonen Salmoniden herausgenommen werden. Die dann resultierende mittelstarke und positive Korrelation von 41% zeigt, daß v.a. der Cyprinidenanteil in dieser fischbiologischen Region hohen Indikatorwert hat. Interessant ist auch, daß in keinem versauerten Gewässer Bachsaiblinge vorgefunden wurden, obwohl diese als versauerungsresistentere Arten gelten. Weiterhin waren die Bestandsdichten der vorgefundenen Fremdsalmoniden immer so gering, daß fraglich ist, ob diese Arten auch in unvorteilhaften Habitaten mit der Bachforelle konkurrieren können. Meist handelt es sich bei ihnen wohl um Fischzuchtflüchtlinge, die keinen meßbaren Effekt auf die biotische Integrität haben.

3.1.4.1.3 Kriterium Vorkommen der intoleranten Arten *Cottus gobio* und *Lampetra planeri*

Auch bei diesem Kriterium wird eine Sensibilität der Arten gegenüber chemischer Gewässerverschlechterung erwartet. Es besteht jedoch nur eine nicht-signifikante schwach-positive Korrelation von 16,4% zwischen dem Vorkommen einer von beiden Arten und der Gewässergüte. Dies bedeutet, daß die Gewässergüte eher schlechter wird, wenn eine dieser beiden Arten anwesend ist. Diese Beziehung wird auch dadurch angezeigt, daß die Untersuchungsstellen mit Indikatorart im Durchschnitt schlechter waren als solche ohne Indikatorart. Man erhält den gleichen Befund, wenn nur die Mühlkoppe oder nur Bachneunaugen alleine betrachtet werden

(Tabelle 15). Von daher können diese Arten innerhalb der untersuchten Belastungsbandbreite keine Verschlechterung indizieren. Dieses Kriterium wird nicht in den IBI aufgenommen.

3.1.4.1.4 Kriterium *Anteil der Individuen euryöker Arten*

Dieses Kriterium ist geeignet, chemische Gewässerdegradationen anzuzeigen, da es mit der Gewässergüte zu 50% korreliert. Eine stärkere Korrelation ist nicht zu erwarten, da die Möglichkeit dieser Arten, ein Gewässer zu besiedeln, auch von anderen Faktoren als dem Gewässerchemismus bestimmt wird. Ein solcher Faktor könnten z.B. Migrationsbarrieren sein. Falls ein Bach stark verschmutzt ist, Arten der unteren fischereibiologischen Zonen jedoch nicht hochwandern können, würde dieses Kriterium den Bach überbewerten. (Gleiches gilt für den Anteil der Generalisten und für den Anteil der euryöken und für die Forellenregion untypischen Arten).

3.1.4.1.5 Kriterium *Anteil der Generalisten (Individuen)*

Da eine Korrelation von 48% mit der chemischen Gewässergüte besteht, vermag auch dieses Kriterium, chemische Gewässergüteverschlechterungen anzuzeigen.

3.1.4.1.6 Kriterien *Altersklassenaufbau und Brutanteil*

Der Altersklassenaufbau zeigt eine leichte Korrelation mit der Gewässergüte (Tabelle 15), welche annähernd signifikant wird, wenn Schindelbach (Obfr.) und Langenaubach besser bewertet werden. Da es wahrscheinlich ist, daß Brut beim Grümpelbach vorhanden ist, wird dieser Bach besser bewertet. Wird dieser Bach nicht mit berücksichtigt, erhöht sich die (nun signifikante) Korrelation mit der Gewässergüte auf annähernd 40%. Diese Korrelation zeigt, daß eine erhöhte Empfindlichkeit der juvenilen Altersklassen, v.a. der Brut, gegenüber chemischen Belastungsfaktoren vorhanden ist. Auf der anderen Seite sollte gerade die Brut auch auf biologische Interaktionen stark reagieren. Von daher sollte der Wert des Gesamt-IBIs mit dem Brutaufkommen eines Baches stark korreliert sein. Eine ähnliche, nicht ganz so starke (und nicht-signifikante) Korrelation ergibt sich beim Kriterium „Brutanteil“.

Aufgrund der starken Wechselwirkungen, die auch mit anderen (abiotischen und biotischen) Faktoren bestehen, und aufgrund der negativen, teilweise signifikanten, Korrelationen mit der Gewässergüte, sind diese beiden Kriterien geeignet, Umweltverschlechterungen aufzuzeigen.

3.1.4.1.7 Kriterium *Konditionsmittelwert*

Die Konditionsmittelwerte korrelieren schwach und nicht signifikant mit der Gewässergüte (Tabelle 15). Das Kriterium ist nicht geeignet, ungiftige Eutropierungen anzuzeigen, es besitzt jedoch eine gewisse Sensibilität gegenüber Umweltgiften. Da natürliche Gegebenheiten, v.a. das Nahrungsangebot (welches wiederum nicht mit Belastungsparametern korreliert) den

Konditionsmittelwert jedoch hauptsächlich beeinflussen, ist keine hohe Trennschärfe zwischen (anthropogenen) Störungen und natürlicher Variabilität gegeben. Damit scheidet der Konditionsmittelwert einer Bachforellenpopulation als Forellenbach-IBI-Indikationskriterium aus.

3.1.4.1.8 Kriterium *Variabilität der Kondition*

Zur Dichteabhängigkeit von Bachforellenpopulationen

Als regulierende, dichteabhängige Kräfte werden im allgemeinen indirekte intraspezifische Konkurrenz um Nahrungsressourcen, direkte intraspezifische Konkurrenz um Laich- oder Wohnplätze, Predation und Krankheiten genannt (vgl. Milne 1957, 1962; Sinclair 1989). Wynne-Edwards (1962; 1986; 1991) führt weiterhin aus, daß die Nahrungsgrundlagen die ultimative Ressource sind, die die Tragekapazität einer Umwelt bestimmen. Backiel & Le Cren (1978) wiesen in Aquarien- und Teichversuchen nach, daß das Wachstum zumindest unter Versuchsbedingungen dichteabhängig ist. Auch wurde dichteabhängiges Wachstum in Gehegen (damit ähnliche Situation wie bei den Versuchen von Backiel & Le Cren 1978) in einem nordenglischen Fluß gezeigt (Le Cren 1962, 1965). Schnelle Wachstumsraten von Forellen in Fließgewässern konnten dort gezeigt werden, wo Laichplatzlimitationen zu einer geringen Brutproduktion trotz der Existenz großer Futtergründe führte (Horton et al. 1968; Fahy 1985). Weiterhin wiesen Jenkins et al. (1996) sowohl in Freilandversuchen als auch in Rinnenexperimenten stark dichteabhängiges Wachstum nach. Elliott (1994, p.118) faßt jedoch in einem Resumée zusammen, daß das durchschnittliche Wachstum von Bachforellen insgesamt dichteunabhängig zu sein scheint, bis auf vielleicht sehr geringe anfängliche Larvendichten von ca. 2-30 Fischen/m². Demgegenüber vertreten Jenkins et al. (1996) die Ansicht, daß Dichteabhängigkeit -gerade in Ökosystemen mit hoher Forellendichte (bei der die Wachstums-Dichte-Relation abflacht) mit deskriptiven Daten zwar schwer nachzuweisen sei, gleichwohl trotzdem vorhanden ist. Daher ist es nicht unwahrscheinlich, daß der mit der Wachstumsrate verbundene Konditionsfaktor ebenfalls dichteabhängig ist.

In den von uns untersuchten Bächen mit lebensfeindlichen Bedingungen wurde keine Dichteabhängigkeit der Konditionsvariabilität vorgefunden. Dieser Befund stützt die Hypothese von Haldane (1956), der annimmt, daß in lebensfeindlichen Umwelten die Populationsdichte v.a. durch dichteunabhängige Faktoren und in günstigen Umwelten die Populationsdichte v.a. dichteabhängig reguliert wird. Andererseits wurde jedoch in den als günstig definierten Habitaten ebenfalls keine signifikante Dichteabhängigkeit vorgefunden.

Somit ist die Vorhersage des diesem Kriterium zugrundeliegenden Erklärungsmodells bestätigt worden, daß in lebensfeindlichen Umwelten v.a. dichteunabhängige Faktoren wirken. Weiterhin

ist eine generelle positive Dichteabhängigkeit der Konditionsvariabilität aufgezeigt worden. Diese Beziehung ist jedoch nicht mehr signifikant, wenn man nur günstige Habitate betrachtet.

Dichteabhängigkeit der Brut

Die Ausrichtung der beobachteten Beziehung ändert sich grundlegend, wenn nur die Brut betrachtet wird, da dann eine negative Dichteabhängigkeit beobachtet wird. Dieses Resultat steht in Einklang mit den Studien von Elliott (1984; 1985), der auch die dichteabhängige Variabilität einer ökologischen Variablen, in diesem Fall die Größen (in Länge und Gewicht) der einzelnen Jahresklassen, in einem nordenglischen Flußsystem untersuchte. Er verzeichnete eine stark negative Dichteabhängigkeit der Variabilität der Größe und erklärt dies mit einer negativ dichteabhängigen Größenselektion im Larvenstadium. Danach beginnen die Larven sehr bald, Territorien zu etablieren. Einer überdurchschnittlich großen Mortalität seien jedoch jene Larven ausgesetzt, die keine Territorien besetzen konnten, da sie weniger gute Versteckmöglichkeiten vor Predatoren und nicht ausreichend Nahrungsressourcen zur Verfügung hätten. Sehr große Tiere hätten andererseits Probleme, ihre größeren Territorien zu verteidigen und würden einer größeren Erschöpfungsmortalität erliegen. Diese Hypothese ist nicht sehr stimmig, da es wahrscheinlich ist, daß große Tiere einfach mit kleineren Revieren vorliebnehmen, als daß sie vor Erschöpfung sterben. Eine Erklärung für die von Elliott (1994) beobachtete stabilisierende Selektion der Brutkondition in dichten Forellenpopulationen könnte sein, daß ab einer bestimmten Schwellendichte territoriales Verhalten aufgegeben wird, so daß die Futterressourcen relativ gleichmäßiger zwischen den Einzelindividuen aufgeteilt werden. Ein solches Verhalten kennt man von Cichliden und Salmoniden, die in unterschiedlichen Dichten in Aquarienversuchen gehalten wurden.

Durch die Daten ist das Modell insoweit bestätigt worden, als in lebensfeindlichen Habitaten eine Dichteabhängigkeit der Konditionsvariabilität nicht gezeigt werden konnte. In günstigen Habitaten scheinen dichteunabhängige Faktoren jedoch immer noch die dominierende Kraft zu sein, die auf die Forellenpopulation einwirkt, da auch hier keine signifikante Dichteabhängigkeit der Konditionsvariabilität nachgewiesen werden kann, wenn auch das Vorzeichen der Korrelation auf dichteabhängige Kräfte hinweist. Da die Konditionsvariabilität in günstigen Habitaten jedoch höher ist als in ungünstigen, weist dies auf erhöhte Interaktionen zwischen den Individuen hin. Da über alle Habitate hinweg eine signifikante Dichteabhängigkeit beobachtet werden konnte, ist die Interpretation am wahrscheinlichsten, daß ein signifikanter Unterschied in der Forellendichte zwischen guten und schlechten Habitaten besteht. Dies in Verbindung mit einem ebenso signifikanten Unterschied in der Konditionsvariabilität würde dann zu dieser Korrelation führen, auch ohne daß die Konditionsvariabilität und die Dichte ursächlich miteinander verbunden sein müssen. Vielmehr sind abiotische Faktoren wie die Konzentration von Fischgiften (Ammoniak,

hohe Wasserstoffionenkonz. etc.) möglich, die einen Effekt auf sowohl die Dichte als auch auf die Kondition haben. Tatsächlich geht die Korrelation zwischen der Variabilität und der Fischdichte zurück, wenn die Gewässergüte als kontrollierende Variable verwendet wird (partielle Korrelation = 0,3681; $p < 0,05$, $n = 28$).

Die Vermutung wird jedoch durch die Daten gestützt, daß für die Zunahme der Variabilität (von einem schlechten Habitat in ein gutes) v.a. die relative Mehrgewichtung biotischer Faktoren wie z.B. Interferenz-Konkurrenz verantwortlich ist, welche wiederum dichteabhängig sein können. Diese Interpretation der Daten wird durch die vorhandene (signifikant) schwache Korrelation zwischen Konditionsvariabilität und Kondition unterstützt, wenn der Einfluß der chemischen Gewässergüte herausgerechnet wird.

Bewertung des Kriteriums Konditionsvariabilität

Dieses Kriterium ist in der Lage, Habitatsdegradationen anzuzeigen. Es besteht eine leichte, negative Korrelation von 36,2% ($p = 0,045$; siehe Tabelle 15) zwischen der Gewässergüte und diesem Kriterium. Da die Gütebewertung dieses Kriteriums nicht linear ist (d.h., die bestbewerteten Bäche haben mittlere Konditionsvariabilitäten), weist die negative Korrelation darauf hin, daß die beobachtete Beziehung am stärksten ist zwischen niedrigen Variabilitäten und hohen Variabilitäten (und nicht zwischen hohen und sehr hohen). In der Tat haben alle Bäche der IBI-Klasse 1 einen mittleren Gütewert von 2,91 ($n = 12$), die der IBI-Klasse 3 jedoch eine Güte von 2,0 ($n = 6$) (t-Test: $p = 0,041$). Andererseits haben Bäche der IBI-Klasse 5 ($n = 13$) mit 2,0 die gleiche Durchschnittsgüte wie die der IBI-Klasse 3. Aufgrund dieser Beobachtung und da keine signifikante Dichteabhängigkeit bei günstigen Habitaten gefunden wurde, werden die Bäche der bisherigen IBI-Klassen 3 und 5 zu einem einheitlichen Wert von 4 zusammengefaßt. Damit läßt sich die Grundlage der Evaluation folgendermaßen zusammenfassen: Bäche, deren Bachforellenpopulationen sehr geringe Konditionsvariabilitäten haben, sind suboptimal für *Salmo trutta* (dies aufgrund von toxischen Einflüssen oder Nahrungsmangel) und bekommen daher die schlechteste Wertung. Individuen mit relativ hoher Variabilität sind ein Anzeichen dafür, daß dichteabhängige Kräfte zwischen den Individuen greifen, welche vergleichsweise stärker in relativ intakten Ökosystemen wirken. Um diesen Zusammenhängen Rechnung zu tragen, werden die Untersuchungsstellen mit hoher Konditionsvariabilität (Bäche mit bisheriger Bewertung von 3 bzw. 5) zusammengefaßt und erhalten eine Bewertung von 4 Punkten. Die Bäche mit der geringsten Konditionsvariabilität behalten die bisherige Bewertung bei (1 Punkt). Diese Bäche sind im Durchschnitt fast eine Güteklasse schlechter als solche mit Populationen hoher Variabilität ($x_4 = 2,00$, $n = 19$; $x_1 = 2,92$, $n = 12$; t-Test: $p < 0,001$). Die nun hochsignifikante, negative Korrelation dieser Bewertung der Konditionsvariabilität mit der korrigierten Gewässergüte

(Spearman's φ : -0,455; $p < 0,01$, $n=31$) zeigt, daß die Konditionsvariabilität die Fähigkeit besitzt, Umweltverschlechterungen zu indizieren.

3.1.4.1.9 Kriterium *Biomasse*

Die Biomasse zeigt nur eine geringe, positive Korrelation mit der Gewässergüte. Eine starke Korrelation wird jedoch nicht erwartet, da die Gütebewertung dieses Kriteriums ebenfalls nicht linear ist. Gleiches gilt für die Gesamtindividuenanzahl. Die Bäche mit der besseren Bewertung sollten jedoch eine bessere mittlere Gewässergüte haben als solche mit einer schlechteren, da die von diesem Kriterium indizierten Umwelteinflüsse in der Theorie v.a. chemischer Natur sind (Versauerung und Eutrophierung). Die Bäche mit sehr guter Bewertung haben eine schlechtere mittlere Gewässergüte als die mit schlechter Bewertung im Kriterium Biomasse (Güte: $x_1^1=2,0$ ($n=2$), $x_5=2,37$ ($n=8$); t-Test: $p=0,35$. Güte 2²: $x_1=2,0$ ($n=2$), $x_5=2,25$ ($n=8$); t-Test: $p=0,56$). Daher gibt es keine Anzeichen dafür, daß dieses Kriterium toxische Einflüsse bemißt. Dafür spricht auch, daß der Mittelwert der Gewässergüte der „belasteten“ Untersuchungsstellen mit 2,0 sehr niedrig ist.

Weiterhin haben die Bäche mit der Bestwertung eine etwas bessere (nicht signifikante) mittlere Gesamtbewertung bzgl. ihrer chemischen Gewässergüte als die mit intermediärer Bewertung (Güte: $x_5=2,375$ ($n=8$), $x_3=2,47$ ($n=21$); t-Test: $p=0,79$. Güte 2: $x_5=2,25$ ($n=8$), $x_3=2,42$ ($n=21$); t-Test: $p=0,66$). Da der Unterschied jedoch sehr klein ist, und da die Bäche mit intermediärer Bewertung eine schlechtere mittlere Güte haben als die mit schlechter Bewertung (Güte: t-Test: $p=0,02$. Güte2: t-Test: $p=0,047$), ist dieses Kriterium nicht geeignet, toxische Einflüsse oder Nährstoffbelastungen zuverlässig anzugeben. Dafür spricht auch, daß zwei Untersuchungsstellen mit hoher Belastung an reduzierten Stickstoffverbindungen (Fornbach und Krumbachwasser) bei diesem Kriterium in die beste Kategorie eingeordnet wurden. Dieses Kriterium wird daher nicht angewendet.

3.1.4.1.10 Kriterium *Gesamtindividuenanzahl*

Die Gesamtindividuenanzahl korreliert negativ mit der Gewässergüte, d.h. mit zunehmender Individuenzahl nimmt die Gewässergüte zu. Diese Beziehung gilt nur für die Unterscheidung zwischen toxisch belasteten und naturbelassenen Gewässern. Da die mittlere Gewässergüte der sehr guten Gewässer mit einer Güte von 2,36 besser ist als die der schlechten Gewässer (2,7), stimmt die Richtung der Beziehung, wenn diese auch nicht signifikant ist (t-Test: $p=0,33$). Andererseits haben jedoch die intermediären Gewässer mit einem Durchschnittswert von 2,0 ($n=8$) eine bessere Bewertung als die Gewässer, die nach diesem Kriterium als sehr gut

¹ die Indices bedeuten den jeweiligen Punktwert bei diesem Kriterium: so ist x_1 die Menge aller Bäche, die in diesem Kriterium mit einem Punkt bewertet wurden.

² mit besserer Bewertung von Schindelbach (Obfr.) und Langenaubach

eingestuft werden. Deshalb und wegen der sehr schwachen Korrelation mit der Gewässergüte ist auch dieses Kriterium nicht in der Lage, chemische Umweltdegradationen zu bewerten. Diese Unfähigkeit wird insbesondere daraus resultieren, daß Bäche mit hohem Brutanteil als eutroph und tendenziell zu schlecht bewertet werden.

3.1.5 Erstellung und Charakterisierung eines Forellenbach-IBIs mit 7 Kriterien

3.1.5.1 Abschließende Charakterisierung des Forellenbach-IBI's

Aufgrund der Einzelanalysen für die Korrelation der einzelne Kriterien mit IBI-unabhängigen Umweltdaten, wird ein modifizierter IBI für bayerische Salmonidenbäche vorgeschlagen, der sich aus sieben Kriterien zusammensetzt (Tabelle 16). Im Kriterium „Anteil der euryöken und für die Forellenregion untypischer Arten“ wurden allochthone Salmonidenarten, also Regenbogenforelle oder Bachsaibling, nicht berücksichtigt, da sie nicht robuster gegenüber Umweltstörungen zu reagieren scheinen als die einheimische Bachforelle.

Tabelle 16: Kriterien, die über die ökologische Güte von bayerischen Forellenbächen eine fundierte Aussage treffen.

Kategorie	Kriterium	Punktzahlvergabe		
		5	3	1
Artenreichtum und Zusammensetzung	(1) Anzahl an autochthonen Arten	<i>Maximum-Arten-Linie</i>		
	(2) Anteil der euryöken und für die Forellenregion untypischen Arten	0%	>25%	>25%
	(3) Anteil der Individuen euryöker Arten	<10%	10-50%	>50%
Trophische Zusammensetzung	(4) Anteil der Generalisten (Individuen)	<5%	>5% <20%	>20%
	(5) Altersklassenaufbau: juvenile Altersklassen	2	1	0
Struktur der <i>Salmo trutta</i>-Population	(6) Anteil der Brut an der Gesamtpopulation (Individuen)	>20%	>10% <20%	<10%
		<i>Punktzahlvergabe</i>		
		0		1
	(7) Variabilität der Kondition	≥16,3		<16,3

Der modifizierte IBI ist fähig, die Untersuchungsstellen unterschiedlich zu bewerten: er verfügt über eine Bewertungsspannweite von 22 Punkten oder 61,1%. Es ist zu erkennen, daß mit zunehmender Kriterienanzahl der Index deutlich ausdifferenzierter und variabler wird. Gleichzeitig ist bei sehr vielen Bächen eine Grundtendenz der Bewertung schon nach wenigen Kriterien sichtbar.

3.1.5.2 Gesamtbewertung des Forellenbach-Index'

Um die Güte des Forellenbach-IBI abzuschätzen, wurde dieser mit der Gesamtwassergüte, die auf chemischen und organismischen Weg bestimmt wurde, korreliert. Die Korrelation wurde parametrisch mit dem Pearson's Korrelationskoeffizient (r) durchgeführt, wenn sich die Daten normalisieren ließen, andernfalls wurde der nicht-parametrische Spearman's Korrelationskoeffizient (ϕ) angewandt. Bei einem Wert von null (r oder $\phi = 0$) besteht keine Korrelation, falls der Wert 1 oder -1 beträgt (je nach der Ausrichtung der Korrelation) besteht eine völlige lineare (statistische) Abhängigkeit. Falls vermutet wurde, daß eine andere Hintergrundvariable eine Scheinkorrelation zwischen zwei Variablen verursacht, wurde mit einer partiellen Korrelationsanalyse die resultierende Korrelation ermittelt. Weiterhin wird eine Clusteranalyse mit der Gesamtgewässergüte und dem Forellenbach-IBI durchgeführt, und mit dem Manteltest auf Ähnlichkeit zwischen beiden Dendrogrammen geprüft. Für die statistischen Analysen wurde das Programm SPSS für Windows, Version 6.1.3 S, verwendet. Falls nicht anders angegeben, gilt die Ablehnung einer Nullhypothese mit einer Wahrscheinlichkeit (p) von 0,05 als signifikant, mit $p < 0,01$ als hochsignifikant und mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ als höchstsignifikant (Tabelle 17).

Tabelle 17: Korrelationsmatrix (Spearman's Korrelationskoeffizient ϕ) zwischen dem modifizierten IBI ohne Konditionsvariabilität (IBI_6), mit Konditionsvariabilität (IBI_7), Gewässergüte (Güte) und Gewässergüte mit Korrektur bei Schindelbach und Langenaubach (Güte2).

	Güte	Güte2	IBI ₆
Güte 2	0,975 $p < 0,001$; $n=31$		
IBI ₆	-0,449 $p=0,011$; $n=31$	-0,489 $p=0,005$; $n=31$	
IBI ₇	-0,519 $p=0,003$; $n=31$	-0,558 $p=0,001$; $n=31$	0,949 $p < 0,001$; $n=34$

3.1.5.3 Eigenschaften des Forellenbach-IBI's

Eine multiple Regressionsanalyse wurde ausgeführt, um den Faktor zu bestimmen, der die meiste Variation erklärt. Da die extrem links- bzw. rechtsschiefen Verteilungen in den Kriterien „Anteil der euryöken Individuen“, „Anteil der untypischen und euryöken Arten“, „Anteil der Generalisten“ und „Altersklassenstruktur“ nicht zu normalisieren waren, wurden die Untersuchungsstellen aufgetrennt in solche, bei denen tolerante oder generalistische Individuen aufgefunden wurden (=Gruppe 1), und solche, bei denen dies nicht der Fall war (=Gruppe 2), so daß in der ersten Gruppe alle Variablen Normal verteilt waren (Kolmogorov-Smirnov-Test: jeweils $p > 0,1$). In der zweiten Gruppe ist neben diesen beiden Variablen nur noch die Anzahl autochthoner Arten in die Analyse einbezogen worden (die anderen vier Variablen hatten in dieser Gruppe entweder keine Varianz oder waren nicht normalisierbar (Altersstruktur)).

Bei Bächen mit euryöken oder generalistischen Individuen wird 52,4% der Varianz durch die Höhe des Brutanteils erklärt. Falls nur stenöke autochthone Individuen anwesend sind, erklärt dieses Kriterium immer noch 14,2% der Varianz, der Hauptteil von 42,6% der Varianz werden bei diesen Bächen durch die Konditionsvariabilität erklärt. Da die Verteilungen vieler Kriterien nicht zu normalisieren waren, ist nicht zu klären, wieviel der relative Beitrag dieser Kriterien ausmacht, wenn alle Bäche berücksichtigt werden. Doch ist der Brutanteil von offensichtlicher Bedeutung, so daß die reproduktive Situation einer Bachforellenpopulation viel über die Güte bzw. Nicht-Güte eines Fließgewässers aussagt.

Wie gezeigt werden konnte, besitzt das Kriterium der Konditionsvariabilität die Fähigkeit, zwischen für die Bachforelle lebensfeindlichen und günstigen Habitaten zu unterscheiden. Daß 42,6% der Varianz des IBI's in solchen Gewässern, die nur aus stenöken autochthonen Arten bestehen, durch die Konditionsvariabilität erklärt wird, zeigt die Wichtigkeit dieses Kriteriums. Ein Grund dafür könnte z.B. sein, daß Degradationen von allochthonen und/oder euryöken Arten nicht angezeigt werden können, weil (anthropogene oder natürliche) Migrationsbarrieren ein Einwandern dieser Arten verhindert. In diesem Fall ist die Konditionsvariabilität offensichtlich sogar noch ein wirkungsvolleres Instrumentarium, schwerwiegende Veränderungen anzuzeigen, als der Brutanteil.

Der Forellenbach-IBI korreliert höchstsignifikant zu negativen 49,5% mit dem Einzugsgebiet (Pearson's r : $p < 0,001$; ln-transformiert). Dies bedeutet, daß die Variabilität des Forellenbach-IBI's zu 24,5% durch das Einzugsgebiet erklärt werden kann.

3.1.5.4 Evaluation des Forellenbach-IBI's

Der Forellenbach-IBI korreliert mittelstark und negativ (55,8%) mit der korrigierten Gesamtgüteabschätzung (= Güte 2). Mit zunehmendem IBI-Wert nimmt damit die Gewässergüte auf hohem Niveau signifikant zu. Das Kriterium „Konditionsvariabilität“ enthält sichtbare Information über den Gewässergütezustand eines Baches, da durch Einbeziehen dieses Kriteriums in den Biotischen Integritätsindex sowohl die Korrelation mit der Gewässergüte als auch die Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit dieser Korrelation zunimmt.

Tabelle 18: Güteklassen des Forellenbach-IBI's und ihre Bedeutung. Auch innerhalb der Güteklassen bestehen graduelle Unterschiede je nach Höhe der Punktevergabe, die sich verbal ausdrücken ließen, d.h. für die am unteren Ende der jeweiligen Güteklasse angesiedelten Gewässer treffen bereits einige der Merkmale der niedrigeren Güteklasse zu.

Güteklasse	Bedeutung
Exzellent (33-36 Punkte)	Keine anthropogene Beeinflussung feststellbar. Diese Bäche verfügen über ein hohes autochthones Artenaufkommen, es sind keine Einwanderer aus anderen fischbiologischen Zonen feststellbar und die ökologischen Eigenschaften der Bachforellenpopulation ist optimal.
Gut (27-32 Punkte)	Euryöke Individuen bzw. Arten können vermehrt ansiedeln. Bachforellenpopulation zeigt erste Streßsymptome wie eine geringere Neurekrutierungsrate.
Ausreichend (21-26 Punkte)	Euryöke Individuen nun in großer Zahl vorhanden. Auch Generalisten nehmen deutlich zu. Variabilität der Bachforellenkondition und Neurekrutierung nimmt deutlich ab.
Schlecht (15-20 Punkte)	Euryöke Arten nehmen Überhand und verdrängen mehr und mehr autochthone Arten. Ebenso ist der Anteil der Generalisten höher als der der Spezialisten. Bachforellenpopulation zeigt Ausfälle der Neurekrutierung und deutliche Streßanzeichen wie geringe Konditionsvariabilität.
Sehr schlecht (< 13 Punkte)	Keine autochthonen Arten vorhanden.

Noch höher ist die Übereinstimmung des IBI mit der Gewässergüte, wenn man nur toxisch belastete Gewässer betrachtet. Bei Bächen, die eine mittlere Ammonium-/ Ammoniakkonz. von größer als 0,01 mg/l, eine mittlere Nitrit-Belastung von größer als 0,1 mg/l und einen mittleren Sauerstoffgehalt von kleiner als 9 mg/l hatten, erhöht sich die Korrelation mit der Gewässergüte auf signifikante -0,7068 (Spearman's, während bei Bächen ohne solche toxischen Bedingungen auf -0,50 abnimmt (Spearman's ϕ : $p=0,022$; $n=20$)). Bei den am meisten belasteten Bächen

(Ammoniak-/Ammoniumkonz. > 0,025 mg/l; Nitritkonz. > 0,25 mg/l ; Sauerstoffkonz. < 9 mg/l) beträgt die Korrelation sogar (nicht-signifikant) 0,8944 (Spearman's ρ : $p=0,10$; $n=4$).

Die Gesamtgüteabschätzung ist bei elf Untersuchungsstellen besser als die IBI-Bewertung, während der Forellenbach-IBI in 4 Fällen eine bessere Bewertung vornimmt als die Gesamtgüteabschätzung. Die Korrelation zwischen der Güteklassierung durch den IBI und durch die Gesamtgüteabschätzung beträgt höchstsignifikante 60,1% ($p<0,001$, $n=28$); dies zeigt, daß die vorgenommene Einteilung der IBI-Werte in Gütekategorien die Gewässergüte gut anzeigen kann.

Ein ähnliches Ergebnis ergibt sich aus der Clusteranalyse (nicht gezeigt).

3.1.5.5 Anwendbarkeit des erarbeiteten IBI auf das vorliegende Projekt

Ziel dieser Vorarbeit war es, ein Evaluationswerkzeug für eine artenarme und kleinräumige Biozönose zu entwickeln, welches sowohl empfindlich genug ist, geringe Degradationen aufzuspüren, als auch gravierende Habitatsveränderungen kenntlich zu machen. Auf diese Art sollten die Gewässer der genetisch untersuchten Bachforellenpopulationen auf ihre ökologische Belastung hin untersucht werden und eine Klassifizierung aller Populationen - auch solcher die für die Erarbeitung des Indexes nicht berücksichtigt wurden - zu ermöglichen. Dazu musste ein für kleine Forellenbäche geeigneter Index erarbeitet werden und evaluiert werden. Da die Leitart *Salmo trutta* in allen Bächen dieser fischbiologischen Region (theoretisch) vorhanden ist, ist bei der Ausarbeitung dieses Index' viel Wert darauf gelegt worden, die spezielle Ökologie dieser Art ausreichend zu berücksichtigen, und infolgedessen wurde die neue Bewertungskategorie „Struktur der Bachforellenpopulation“ entwickelt. Die Kriterien dieser Kategorie eignen sich dazu, v.a. jene Bäche in sehr gute und weniger gute Gewässer aufzutrennen, bei denen nur stenöke autochthone Arten vorgefunden wurden. Weiterhin zeigen insbesondere die Kriterien „Altersklassenstruktur“ und „Anteil der Brut“ schwerwiegende Habitatsveränderungen auch dann an, wenn euryöke Individuen aufgrund von Migrationsbarrieren nicht einwandern können. Die Kategorien „Artenzahl und -zusammensetzung“ und „Trophische Zusammensetzung“ wiederum zeigen sehr schwerwiegende Habitatsveränderungen an, da solche in der Regel eng mit dem Einwandern und Einnischen euryöker Arten verbunden sind. Das Kriterium der „Anzahl autochthoner Arten“ verhielt sich in der Auswertung recht indifferent. Es wurde vorläufig trotzdem in den Bachforellen-IBI integriert, da es in der Theorie eine hohe Aussagekraft bzgl. schwer zu evaluierender physikalischer Habitatsveränderungen haben sollte, die die Einnischung von Arten beeinflussen. Das vorliegende Ergebnis war ermutigend, da auch bei den Bächen, die im exzellenten und guten Bereich liegen, eine gute Auftrennung der Gewässergüte durch diesen Index erfolgt. Andererseits zeigt die hohe Bewertungsbandbreite von 22 Punkten oder 61,1%

(schlechtester Bach = 14 Punkte, bester = 36), daß auch Gewässer minderer Güte durch den Bachforellen-IBI erfaßt werden. Der erarbeitete Index konnte daher guten Gewissens für die Charakterisierung der Belastung aller untersuchten Gewässer genutzt werden. Die Ergebnisse der IBI-Bewertung aller genetisch beprobten Gewässer, die auf den zusätzlichen Befischungsdaten und einer neuen Berechnung von Maximum-Artenlinien beruht sind in Tabelle 19 dargestellt.

3.1.5.6 Potential des Forellenbach-IBI über das vorliegende Projekt hinaus

In dieser Arbeit konnten klare Hinweise aufgezeigt werden, daß der vorgestellte Forellenbach-IBI ein taugliches Instrument sein könnte, um die biologische Güte von Forellenbächen im allgemeinen zu evaluieren. Der vorliegende Befund legt auch die Vermutung nahe, daß dieser Index im gegebenen Belastungsrahmen über eine größere Sensibilität für Umweltverschlechterungen verfügt als etwa der Saprobienindex, da er in der Lage ist, eine größere Anzahl von Degradationsformen zu integrieren. Da er die Fischlebensgemeinschaft als Indikationsgemeinschaft heranzieht, ist damit gleichzeitig der Rahmen für die Sensibilität des Forellenbach-Index nach unten gesetzt: sehr kleinräumige Veränderungen und/oder sehr geringfügige Veränderungen, die z.B. schon zu lokalen Extinktionen von einigen Insektenarten führen können, kann der Forellenbach-IBI vermutlich nicht evaluieren. Doch ist die Interpretation, daß ein Bach mit einer exzellenten Fischlebensgemeinschaft naturnah ist, intuitiv richtig.

Um dieses Evaluationsinstrument zu etablieren, sollte in weiteren Forschungen der Einfluß von Jahreszeit, Region und verschiedenen Jahren abgeschätzt werden, gerade auch, um zu sehen, wie robust sich der Forellenbach-IBI gegenüber Zufallsprozessen verhält. Weiterhin ist es wichtig, über die ökologische Grundlage der einzelnen Kriterien mehr zu verstehen, insbesondere hinsichtlich der Autökologie vieler Kleinfischarten und bzgl. der Wechselwirkungen in Forellenpopulationen. Auch der Einfluß von Migrationsbarrieren auf das Verhalten des Index sollte abgeschätzt werden. Sowohl das Kriterium „Parasitenlast“ als auch ein Kriterium „Anwesenheit von *Cottus gobio*“ sind evtl. in der Lage, bei einer größeren Anzahl von sehr schlechten Bächen Evaluationspotential zu entwickeln.

Hinsichtlich der durchgeführten Methodik sollte der Effekt einer größeren Forellenanzahl (bzgl. der Genauigkeit der Petersenmethode) und einer längeren befischten Strecke (bzgl. der Artenanzahl) auf den Forellenbach-IBI evaluiert werden.

Dieser Index ist für Mittelgebirgsbäche in Bayern konzipiert worden. Es ist anzunehmen, daß er auch andere Mittelgebirgsbäche in Deutschland zu evaluieren imstande ist. Er müßte jedoch modifiziert werden, wenn sich die zu bewertende Biozönose stark von den in dieser Arbeit

untersuchten abweicht. Dies ist insbesondere in Norddeutschland der Fall, wo sich sowohl die Fischfauna stark ändert als auch Meeresforellen angetroffen wurden, deren Biologie sich von der stationären Form wesentlich unterscheidet, so daß die ökologischen Annahmen, auf die der vorgestellte Index fußt, nicht mehr zutreffen könnten.

Um eine umfassende Anwendbarkeit des Forellenbach-Index zu ermöglichen, ist eine großflächige Befischung von unterschiedlichen Bächen in unterschiedlichen Regionen wünschenswert. Die Ergebnisse könnten in einer Datenbank gespeichert werden, so daß für eine bestimmte Region und/oder Jahreszeit Vergleichswerte, die v.a. für das Artenanzahlskriterium von entscheidender Bedeutung sind, vorhanden wären. Für ein solches Projekt wäre behördliche Unterstützung, v.a. in bezug auf die Elektrofischerei, unumgänglich. Da gerade die Kleingewässer auch aus Kosten- und Effizienzgründen wenig für flächige Gewässerbewertungen beachtet werden, obwohl sie ein Gros des Gesamteinzugsgebietes ausmachen, ist der Forellenbach-Index ein effizientes und preiswertes Instrument für eine aussagekräftige Evaluation heimischer Gewässer.

3.1.6 Zusammenfassung der nicht-genetischen Daten zur Bewertung aller in die Gesamtanalyse eingegangenen Bäche

In der folgenden Tabelle 19 sind die Klassifikationen zu allen untersuchten Bächen nach den Kriterien des Forellenbach-IBIs aufgelistet. Zusätzlich aufgelistet sind die anderen in die Gesamtanalyse (v.a. Kanonische Korrespondenzanalyse) eingegangenen Umweltdaten Höhe über dem Meeresspiegel (NN), Einzugsgebiet oberhalb der Befischungsstelle und der korrigierte Besatzscore aus der Abschätzung der Besatzeinflußwahrscheinlichkeit an der Befischungsstelle.

Tabelle 19: IBI-Bewertung aller untersuchten Bäche und anderen Umweltdaten, die in die Gesamtanalyse miteingegangen sind.

**) die Angaben stammen von Herrn Gerhard Woschitz und sind sehr zuverlässig. Daher konnte der Bach mit berücksichtigt werden, obwohl keine Befischungsdaten vorlagen*

***) Der Grenzbach führte zur Befischungszeit Hochwasser, weshalb nur ein einziger Jungfisch erbeutet wurde. Da aber nach visueller Einschätzung mehr vorhanden waren, wurde der IBI-Wert nach oben korrigiert*

****) Der Weisse Main führte zur Befischungszeit Hochwasser. Da aber zu den Befischungsdaten noch zuverlässige Informationen von der Fischereifachberatung Oberfranken vorlagen, wurde der Wert auf der Basis der Befischungsdaten leicht modifiziert*

Bach	Korr Score	Einzugsgebiet (ha)	Höhe über NN (m)	Forellenbach- IBI	Bemerkungen
WIE	4	410	720	29	
GEI	3	170	710	27	
RTB	6	580	700	12	
KAL	3	181	700	32	
HAI	3	493	490	32	
TAU	3	1165	520	21	
WOL	6	365	850	36	
TEI	3	7540	465	20	
BAI	4	6413	370	28	
MUH	5	23	560	36	
SLI	2	230	650	27	
STG	5	195	600	27	
KOH	8	374	600	36	
RTT	8	1700	570	25	
MIC	8	1400	580	27	
ERL	5	555	600	32	
HAA	0	302	900	29	
FOR	1	144	800	36	
OHE	2	2280	750	29	
KIR	3	2058	480	28	
BLU	1	3087	800	27	
SAG	4	1000	600	27	IBI geschätzt*
GOL	1	226	550	31	
LAM	8	7323	525	29	
HOL	4	627	580	24	
MAH	4	568	552	26	
STE	4	1124	530	36	
BIB	7	972	540	30	
GRE	3	450	830	29	IBI korrigiert**
SWA	1	180	860	26	
HAR	4	200	870	29	
KRU	3	1025	270	14	
FRN	3	1007	330	20	
MBB	7	799	450	31	
KRE	9	5508	390	29	
GRU	8	2064	390	26	
THI	2	119	550	30	
LAN	1	341	470	36	
SCH	3	334	334	34	
WEM	7	6369	450	23	IBI korrigiert***
SHU	1	510	440	34	
MAT	3	81	460	36	
DRE	6	361	375	32	
MON	6	155	297	32	
MAI	6	230	765	26	
KAP	6	410	660	29	

3.1.7 Zusammenfassung Ergebnisse zum Forellenbach-IBI

Um den Grad forellenbachspezifischer biotischer Integrität zu messen, wurde im Rahmen eines Teilprojekts ein „Index of Biotic Integrity“ (IBI) entwickelt. Dieser sollte im Gegensatz zu bereits existierenden Integritätsindices, v.a. Karr's IBI (1981), in der Lage sein, die kleinräumige und artenarme Biozönose bayerischer Mittelgebirgsbäche auf der Basis ihrer Fischartengemeinschaft zu bewerten. Auf der Grundlage von Literaturangaben und ersten Beobachtungen im Freiland wurden potentielle Kriterien für einen „Forellenbach-IBI“ entwickelt, wobei Kriterien, die die Struktur der Population der Leitart (Bachforellen) berücksichtigen, besonderes Gewicht erhielten.

Um die Aussagekraft eines Forellenbach-IBI zu studieren, wurden 34 Mittelgebirgsbäche in Bayern befischt und beprobt und 10 Kriterien der Fischartengemeinschaft und Populationsstruktur der Bachforelle bestimmt. Zur befischungsunabhängigen Bewertung der biotischen Integrität dieser Gewässer wurde von jeder Untersuchungsstelle zusätzlich der Saprobienindex, der Säurezustand und die chemische Belastung nach standardisierten Kriterien bestimmt. Mittels Korrelationsanalyse und qualitativer Bewertung wurde jedes der 10 potentiellen Kriterien eines Forellenbach-IBI auf seine Tauglichkeit, Habitatsverschlechterung anzuzeigen, überprüft. Aus den 7 der ursprünglich 10 Kriterien, die einen positiven Zusammenhang mit der Gewässergüte erkennen ließen, wurde ein modifizierter Forellenbach-IBI konstruiert, der seinerseits mit der Gesamtgewässergüte, die sich aus den unabhängig gewonnenen Gewässerbewertungen errechnete, in Beziehung gesetzt wurde.

Dieser überprüfte Forellenbach-IBI korrelierte mit 55,8% mit der Gesamtgewässergüte (Spearman's Korrelation $p < 0,001$, $n = 31$). Diese Korrelation erhöhte sich auf signifikante 60,1%, wenn die IBI-Bewertungsklassen klassiert (4 Klassen) und nicht kontinuierlich in die Analyse eingingen. Er erhöhte sich auf 70,6%, wenn nur organisch-toxisch belastete Bäche berücksichtigt wurden. Damit konnte gezeigt werden, daß der Forellenbach-IBI auf anthropogen verursachte Gewässergüteverschlechterungen anspricht. Entsprechend wurden alle in die Untersuchung des Besatzeinflusses eingegangenen Bäche mit diesem Evaluierungsinstrument bewertet. Um es jedoch als allgemein nutzbares Evaluationsinstrument zu etablieren, sollte in weiterer Forschung der Einfluß von Jahreszeit, Region und interannuellen Schwankungen abgeschätzt werden.

3.2 Genetische Biodiversität und Besatzeinfluß auf Bachforellenpopulationen

3.2.1 Mitochondriale Diversität

Wie in der Einleitung besprochen, sollte neben den rekombinierenden Mikrosatellitenmarkern auch die mitochondriale Diversität zur Beurteilung der phylogeographischen Struktur der bayerischen Bachforellenpopulationen berücksichtigt werden. Dazu wurden soweit als möglich alle beprobten Individuen mit Hilfe der für die Bachforelle etablierten ND5/6-RFLP-Technik (Hansen & Loeschke, 1996) so charakterisiert, daß einerseits ein Maximum an Diversität mit verhältnismäßig geringem Aufwand kartiert werden konnte, andererseits die erhobenen Daten in die bereits bekannten Daten zur Phylogeographie der Bachforelle eingepasst werden konnten. In diesem Zusammenhang wurden von allen ermittelten ND5/6-RFLP Haplotypen eine oder mehrere Proben auch für den mitochondrialen D-Loop sequenziert, weil auf diesem Wege die Zuordnung der ND5/6-Haplotypen zu den bekannten mitochondrialen Linien der Bachforelle in Europa möglich war. Über die mitochondriale Diversität innerhalb der Populationen und Gewässersysteme, die phylogenetische Verwandtschaft der Linien untereinander und den Bezug zu bereits bekannten Daten sollte es möglich sein, einen essentiellen Beitrag zur bisher unbekannten Phylogeographie der Bachforelle in der oberen Donau zu leisten zu können und entsprechend den Besatzeinfluß auf die mitochondriale Diversität korrekt zu beurteilen.

3.2.1.1 Charakterisierung der ND5/6 RFLP Bandenmuster

Bei der Auswertung der RFLP-Gele wurde jedes Fragmentmuster eines Restriktionsenzymys mit einem Großbuchstaben benannt. Dabei variierte die Anzahl der gefundenen Schnittmuster von zwei (MbolI) bis neun (AluI). Zunächst wurde die Fragmentgröße der einzelnen Banden mit Hilfe der Markerspuren an den Rändern des Gels abgeschätzt. Mit der RFLP-Methode konnten Fragmente mit einer Basenzahl von unter 150bp nicht mehr genau, unter 80bp gar nicht mehr detektiert werden. Beides wurde erst durch eine nachfolgende Sequenzanalyse des ND5/6 Fragments möglich. Aus der Kombination der vier Schnittmuster in der Reihenfolge der Enzyme AluI, Avall, MbolI und TaqI ergab sich dann ein „zusammengesetzter Haplotyp“, kurz RFLP-Haplotyp (z.B. DAAB für die verschiedenen Schnittmuster der vier Enzyme).

So konnten 12 verschiedene Haplotypen in Bayern, zwei weitere in Populationen im angrenzenden Österreich detektiert werden. Mit Hilfe der Sequenzanalyse des D-Loops sollten die ND5/6 RFLP-Haplotypen den bereits publizierten phylogenetischen mtDNA-Gruppierungen (Bernatchez et al. 1992) zugeordnet werden. Dazu wurde von jedem RFLP-Haplotyp mindestens einer aus jedem Einzugsgebiet ausgewählt, insgesamt wurden 48 Proben sequenziert. Wie nicht anders erwartet wurden nur D-Loops der Gruppen III (Danubisch) und IV (Atlantisch) gefunden.

Nachdem alle Tiere mit Hilfe der RFLP-Methode typisiert waren, wurden einige repräsentative Proben ausgewählt, um das ND5/6-Fragment auch auf Sequenzebene zu untersuchen. Dabei sollten mit möglichst wenigen Individuen möglichst viele der beobachteten Schnittstellen detektiert werden. Die Sequenzen der fünf Haplotypen ADBA, BCAC, CBBB, DABD, JABA wurden zusammen mit der des Lachses (*Salmo salar*, erhältlich aus dem Internet, GeneBank accession no. U12143) so untereinander angeordnet („aligned“), daß homologe Positionen miteinander verglichen werden konnten. Mit dieser Vorlage wurde eine genaue Kartierung der Schnittstellen vorgenommen.

3.2.1.2 Phylogenetische Verwandtschaft der RFLP-Haplotypen

Für die phylogenetische Analyse der RFLP-Haplotypen war es notwendig, die Schnittmuster zu tabellarisieren (Daten im Anhang 3). Daraus wurde dann eine 1/0 - Kodierungsmatrix für die variablen Schnittstellen eines jeden Restriktionsenzym erstellt, woraus sich die Kodierung für die 15 „zusammengesetzten RFLP-Haplotypen“ ergab. Ausgehend von dieser Kodierung wurde ein sogenanntes „median joining“ Netzwerk der RFLP-Haplotypen errechnet (Programm Network 1.8). Zunächst wurden für die Netzwerkanalyse alle in der Untersuchung der Bachforellen gefundenen Haplotypen verwendet, danach wurde auch der Haplotyp des Lachses miteinbezogen. In beiden Varianten fiel die strikte Trennung der danubischen Haplotypen von den atlantischen Haplotypen auf. Zwischen der atlantischen und der danubischen Gruppe liegen vier Mutationsschritte. Untereinander sind die danubischen und atlantischen Haplotypen jedoch eng verwandt. Alle sechs Da-Typen gehen im Ein-Schritt-Abstand auseinander hervor. Auch die neun At-Typen bilden eine Gruppe mit nur zwei Unterbrechungen des Ein-Schritt-Abstands.

Tabelle 20: ND5/6 RFLP-Haplotypenverteilung der einzelnen Populationen. Die Zuordnung der Haplotypen zu atlantischen oder danubischen Linien erfolgt nach Sequenzierung des D-Loops repräsentativer Tiere aus den drei Einzugsgebieten (mit * bezeichnete Haplotypen).

Bach	Danubische Haplotypen						Atlantische Haplotypen								n Haplotypen
	DAAA	DAAB	DAAD	DABD	EAAD	FAAD	ACAC	BABC	BBBA	BBBB	BBBC	BCAC	CBBB	KABC	
Donau-Einzugsgebiet	WIE									29	1				30/2
	RTB		1*	1*						16	10				28/4
	GEI							2		19		8			29/3
	KAL	3			3*					14	1	21*			42/5
	HAI	6*								26		4			36/3
	TAU									21		1			22/2
	WOL	1		2						14	2	7			26/5
	TEI	4*		2				1		13	4	7			31/6
	LBG									27		4			31/2
	BAI			7*				1		15		1			24/4
	MUH							5		26*			1		31/2
	SLI									24		6			30/2
	STG									24		1			25/2
	KOH	2		4	1					19		1			27/5
	RTT		1*	4						18		3			26/4
	MIC			5*				5		13		1			24/4
	ZWI	1						18*		25	2	4		1*	51/6
	ERL	3*								3		31			37/3
	HAA	9						4		12		9*			34/4
	FOR								7*	9	10*	4			30/4
	OHE	7*						11		5		5			28/4
	KIR	1							1	11	3	13			29/5
BLU	11		16*		6				1					35/5	
SAG	2					28*			1		3			34/4	
Elbe-Einzugsgebiet	GOL									20*	8*	6			34/3
	LAM							3		16	4	6			29/4
	HOL							3*		20	2	12			37/4
	MAH									10	1	19			30/3
	STE									23	3	3			29/3
	BIB			1*						21		8			30/3
	MOL									9		1			10/2
	SHI									1		6			7/2
	GRE	1*								9		12*			22/3
	SWA									3		23			26/2
	HAR							1		7		20			28/3
Rhein-Einzugsgebiet	KRU									28		2			30/2
	FRN									15	2	1			18/3
	MBB				4*					21		2			27/3
	KRE							2*		11	14	1			28/4
	GRU									2	16				18/2
	THI								2	16	14*		2*		34/4
	LAN								10*	1	8*	8*			27/4
	SCH									15		3			18/2
	WEM	1*								17	3	6			27/4
	SHU									25					25/1
	MAT									33*					33/1
	AIL									3	5	2			10/3
	AUF									41	4	3			48/3
	DRE									36	1	2			39/3
	MON									32	4				36/2
	KAP									28	1	1			30/3
	MAI									25		5			30/2
	Summen	52	2	42	8	6	28	15	49	13	873	123	286	2	1

Tabelle 21: Übersicht über die 13 im Rahmen der Studie detektierten Bachforellen-D-Loop-Haplotypen repräsentativer Tiere (555 Basenpaare) mit ihren 22 potentiell variablen Positionen sowie ihre Zuordnung zu ND5/6 RFLP-Haplotypen unterer Teil der Tabelle, vergleiche mit Tabelle 15). Die Bezeichnung und Numerierung der Haplotypen nach DA und AT beziehen sich auf die bereits bekannten Haplotypen nach im Text zitierten Arbeiten (z.B. DA 1 = danubischer Haplotyp 1, AT 1 = atlantischer Haplotyp 1). X-Haplotypen geben in dieser Studie neu gefundene Haplotypen an. Numerierungen mit "Dezimalstellen", z.B. AT 1.1 gibt an, daß der mit anderen Studien vergleichbare Sequenzabschnitt dem Haplotyp AT 1 entspricht, daß aber wegen der in dieser Studie vorliegenden längeren Sequenz weitere variable Positionen identifiziert werden konnten, die zum Beispiel eine Unterteilung des Haplotyps AT 1 in 4 Untertypen zulassen (AT 1.1 bis AT 1.4). Punkte unterhalb der Nukleotide für Haplotyp DA 1.1 kennzeichnen eine identische Base des jeweiligen Haplotyps an dieser Stelle. Ein Bindestrich (-) bedeutet dass an der homologen Stelle bekannter Sequenzen eine Deletion vorliegt, die Position also verloren gegangen ist.

D-Loop Haplotype	Position																					

D-Loop Haplotyp	entspricht folgenden ND5/6 Haployp(en)
DA 1.1	DAAA; DAAB
DA 1.2	DABC
DA 1.3	DABD
DA 1.4	DAAA
DA 1.5	FAAD
DA 2.1	DAAA
DA 2.2	DAAD; FAAD
DA X.1	DAAD
DA X.2	DAAD
AT 1.1	BCAC
AT 1.2	BBBC
AT 1.4	BBBB; BCAC; CBBB
AT 1.3	BABC; ACAC; BBBA; BBBB; BCAC; KABC

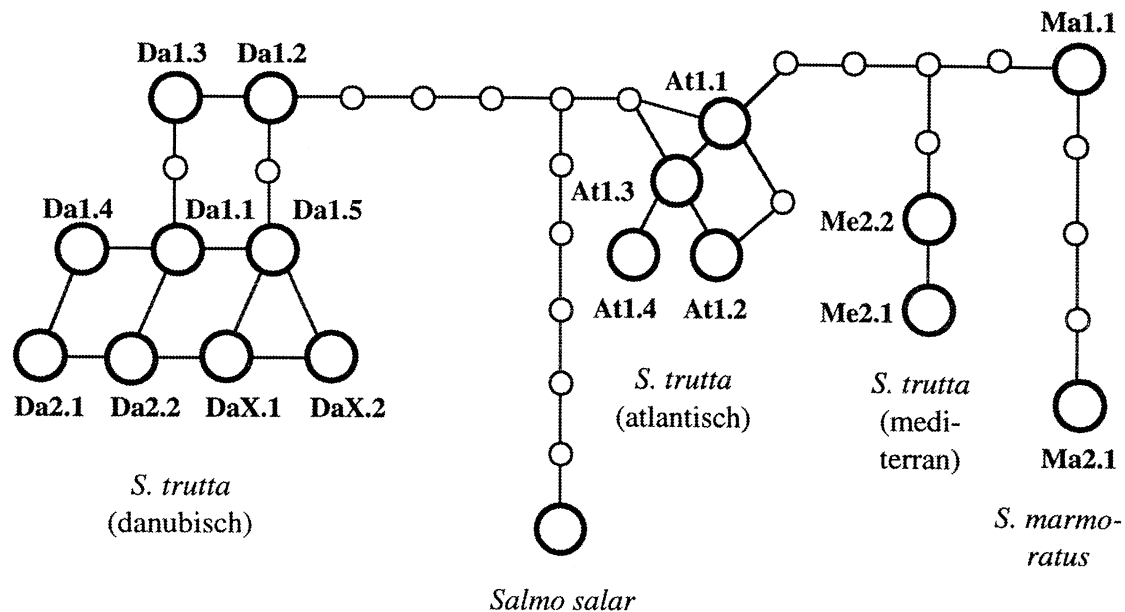
3.2.1.3 Phylogenetische Verwandtschaft der D-Loop Haplotypen

Zur Einteilung der Haplotypen in die von Bernatchez et al. (1992) beschriebenen phylogenetischen Gruppen war es notwendig geworden, den Anfang des D-Loops zu sequenzieren. Insgesamt wurde dabei von 48 Proben ein Fragment von 555 bp Länge auf Sequenzvariabilität untersucht (Sequenzen im Anhang 4). Dabei wurden 22 variable Positionen entdeckt (Tabelle 21). Weil sich die von Bernatchez et al. (1992) publizierte Typisierung nur auf die ersten 320bp des D-Loops bezog, mußte der Code dahingehend erweitert werden, daß auch die Unterschiede in den restlichen 235bp einbezogen werden konnten. Bei der alleinigen Betrachtung der ersten 320bp wurden unter den bayerischen und österreichischen Proben nur drei bereits definierte Typen (zwei danubische, Da1 und Da2, und ein atlantischer, At1) und drei bislang nicht publizierte Typen gefunden. Betrachtet man aber alle 555 bp, so finden sich insgesamt 14 verschiedene D-Loop Haplotypen (Tabelle 21). Der Typ At1 spaltete sich auf in vier Untertypen allein in Bayern, und einen zusätzlichen unter den Proben von Michael M. Hansen. Hinter Da1 verbargen sich ebenfalls fünf, hinter Da2 zwei Typen.

Aus dieser Sequenzinformation wurde das Netzwerk der D-Loop Haplotypen erstellt, um das Resultat mit den phylogenetischen Zusammenhängen im ND5/6 RFLP-Haplotypen zu vergleichen (Abb. 12). Dafür wurden die 22 variablen Positionen des D-Loops in einer DNA-Matrix kodiert. Nachdem das Computerprogramm Network 1.8 keine Deletionen in der DNA-Matrix zuläßt, wurde jede Deletion als Transition angegeben. Zusätzlich wurden Transversionen/Transitionen wie 2/1 gewichtet. Als Außengruppe wurde wieder die homologe Sequenz des Lachses herangezogen.

Das resultierende Netzwerk entspricht in seiner Topologie dem der RFLP-Haplotypen. Wieder bilden sich zwei distinkte Gruppen aus danubischen und atlantischen Haplotypen aus. Die atlantische und danubische Gruppe liegen sechs Schritte auseinander, innerhalb beider Gruppen sind die Haplotypen sehr eng verwandt (Abb. 12).

Abb. 12: Median-Joining Netzwerk der gefundenen Bachforellen-D-loop Haplotypen. Es wurde mit einem Transitions:Transversionsverhältnis von 1:2 berechnet. Die einzelnen Knotenpunkte bezeichnen trotzdem jeweils einen Nukleotidaustausch. Der Anschaulichkeit halber sind mit aufgenommen im Vergleich weitere Haplotypen aus dem Mediterran und von der nahe verwandten *Salmo marmorata* aus Norditalien und Slowenien.



3.2.1.4 Geographische Verteilung der RFLP Haplotypen

Im bayerischen und österreichischen Probenmaterial konnten 15 ND5/6 RFLP Haplotypen gefunden werden. Dabei fanden sich in den Proben aus Österreich zwei danubische Haplotypen, die nur dort vorkommen (EAAD und FAAD). Begrenzt man das Untersuchungsgebiet auf die untersuchten Gewässer des Freistaates Bayern, so kommen hier also nur noch 13 Haplotypen vor, davon wiederum einer nur in der Zuchtanstalt Wielenbach. Von 1302 dem Freiland entstammenden bayerischen Forellenproben entfielen also lediglich 74 auf die danubische Gruppe, 1228 Proben gehörten dem atlantischen Typ an. Die offensichtliche Frage, ob es sich bei den vielen atlantischen Haplotypen im oberen Donauraum um das Ergebnis von massivem Besatz handelt, oder ob es auf natürliche Art zu einer Vermischung von atlantischen und danubischen Haplotypen kam, sei auf die Gesamtanalyse des Besatzeinflusses verschoben, in der die Besatzeinflusswahrscheinlichkeit auf die RFLP-Haplotypenfrequenzen und die Mikrosatellitenallelfrequenzen zusammen analysiert und diskutiert wird.

Im gegebenen Zusammenhang fällt aber dennoch auf, daß im Ilz-Einzug der Donau ein atlantischer Haplotyp vorkommt, der bisher in keiner anderen Bachforellen-Population detektiert wurde. Weiterhin auffallend ist die Tatsache zwei der At-Typen (BBBB und BCAC) in allen Einzugsgebieten überdurchschnittlich häufig vorkommen und mindestens einer der beiden in jeder Population präsent ist (Tabelle 20). Dennoch zeigt sich im Vergleich zum atlantischen Einzugsgebiet im Donaauraum eine Häufung der danubischen Typen mit 26% (ohne österreichische

Populationen noch 11%) gegenüber dem Elbe- und Rheineinzug mit jeweils 1% danubischen Typen (Tabelle 20). Betrachtet man die Haplotypenfrequenzen mehrerer Populationen einzelner Vorfluter, erkennt man auch gewisse Ähnlichkeiten im Abundanzmuster der Haplotypen. So kommen beispielsweise im Rheineinzugsgebiet in den Vorflutern Ebrach und Wiesent dieselben drei Haplotypen in ähnlicher Häufigkeit vor (Tabelle 20). Exklusive, nur in einem Einzugsgebiet vorkommende Haplotypen findet man gehäuft im Donauraum mit vier danubischen (DAAB, DABD, EAAD, FAAD) und einem atlantischen Typ (ACAC). In den Elbezuflüssen konnte kein exklusiver Haplotyp nachgewiesen werden, im Rheineinzug ein atlantischer (CBBB) (Tabelle 20).

Unterschiedlich ist auch die Anzahl der vorkommenden Haplotypen, denn im bayerischen und den zwei Populationen aus dem österreichischem Donauraum kommen 12, im Rheineinzug 8 und im Elbeeinzug 6 verschiedene Haplotypen vor. Die Anzahl verschiedener Haplotypen in einer Population schwankt von einem Typ (Mathelbach und Schulmühlbach im Rheineinzug) bis zu sechs (Teisnach und Kirnbach im Donaeinzug), generell ist die Diversität der Populationen im Donaeinzug größer (zwei bis sechs Haplotypen pro Population) als in den beiden der Nordsee zufließenden Elbe- und Rheineinzugsgebieten (zwei bis vier bzw. eins bis vier Haplotypen pro Population).

3.2.2 Diversität auf Mikrosatelliten-Ebene

Die deskriptiven Daten zur Mikrosatellitendiversität von fast 1600 Individuen, die sich auf annähernd 50 Populationen verteilen, sind in Tabelle 22a und b zusammengefasst. Die fünf nach einer Vorauswahl eingesetzten Mikrosatellitenmarker zeigten eine mittlere bis sehr hohe Variabilität. Die Anzahl der Allele über alle Bachforellen-Populationen lag zwischen 10 (Locus SSA85) und 32 (MST85). Dabei schwankte die Anzahl von Allelen pro Population von 1 (Langenaubach für SSA85) bis 14 (Tauritzbach TAU für MST85). Sie unterschied sich zwischen atlantischen und danubischen Populationen (siehe Ergebnisse der Kanonischen Korrespondenzanalyse). Die individuellen Genotypen aller untersuchten Individuen sind in Anhang 5 zu finden.

Private „geographische“ Allele, also solche die nur innerhalb einer Population oder eines kleineren Vorfluters vorkamen, waren auf den ersten Blick selten, aber dennoch in einigen Fällen vorhanden. Besonders auffallend in dieser Hinsicht waren die Allele 195, 205 und 207 des Locus MST 85, die ausschließlich in Populationen der Ilz vorkamen, sowie die Allele 121 und 123 des Locus SFO8, die auf Bäche des Wiesent-Einzuges beschränkt waren.

LOCUS SS485

WIE	GEI	RTB	KAL	HAI	TAU	WOL	TEI	LBG	BAI	MIH	SJC	KOH	RTT	MIC	ZWI	ERL	HAA	FOR	HE	KIR	BLU	SAG	GOL	LAW	HOL	MAH	STE	BIB	MOL	SH	GRE	SWA	HARKRU	FRB	KRE	GRU	THI	LAN	SCH	WEM	SHU	MAY	AYL	AUF	DRE	MON	MAI	KAP	
30	30	30	30	34	38	35	26	30	35	28	31	30	30	28	30	52	31	21	22	28	29	32	32	33	41	36	28	35	10	7	20	30	30	28	18	28	32	35	28	37	30	29	28	10	46	40	36	30	30

n

[illegible][illegible][illegible]

WIE	GEI	RTB	KAL	HAI	TAU	WOL	TEI	LEG	BAI	MAH	SUJ	STG	KOH	RTI	MAC	ZWI	ERL	HAA	FOR	OHE	KIR	BLU	SAG	GOL	LAM	HOL	MAH	STE	BOL	SHI	GRE	SWA	HAB	KRU	FRN	MOB	KRE	GUR	THI	LAN	SCH	WEM	SHU	MAT	AUF	DRE	MON	MAI	KAN
30	30	29	39	37	35	28	26	30	30	27	27	27	27	27	27	29	31	33	40	35	29	35	36	9	7	15	27	30	28	16	28	32	34	26	24	36	30	29	27	10	34	32	30	30					
n	0.05																																																

[illegible]

Beobachtete (H_o) und erwartete (H_e) Heterozygotien pro Locus und pro Population sind in den Tabellen für die einzelnen Loci jeweils unten zu finden. Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurden untersucht, jedoch wichen nur wenige Populationen bei einzelnen Loci von der erwarteten Heterozygotie auf einem Signifikanzniveau von 0,01 ab, wenn sie mit dem Programm GENEPOP 3.1C mit Permutationstests daraufhin untersucht wurden: Für den Locus 543 AE war es die "Population" der Zucht Lindbergmühle (LBG), für den Locus SSA 85 die des Wolfertsriederbaches (WOL), des Steingrabens (STG) und des Blühnbaches (BLU), für den Locus SFO8 der Kalte Bach (KAL), das Krummbachwasser (KRU) und der Schindelbach (SCH). Schließlich wichen beim Locus BS131 der Weiße Main (WEM), das Krummbachwasser (KRU) und der Dreiherrnbrunnen (DRE) vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab. Zwar fällt auf, daß die 9 signifikanten Abweichungen bei einzelnen Loci in Zuchtanlagen (1x), oder aus mittel bis stark besetzten Gewässern (7x), aber nur 1x in kaum oder gar nicht besetzten Gewässern detektiert wurden. Wegen der mosaikartig auftretenden und nur in geringer Frequenz auftretenden Abweichungen ließen diese Daten aber keine sinnvolle statistische Analyse zu.

3.2.2.1 Paarweise Populationsvergleiche

Das Maß der Populationsdifferenzierung zwischen allen Populationen wurde ebenfalls mit dem Programm GENEPOP 3.1C berechnet. In einer Tabelle im Anhang 6 sind alle theta-Werte für die paarweisen Populationsvergleiche aufgelistet. Da der Absolutwert dieser Werte für sich keine hohe Aussagekraft hat, werden die paarweisen theta-Werte für alle Populationsvergleiche im Anhang wiedergegeben. Zum Verständnis der theta-Werte siehe unter Material und Methoden. An dieser Stelle sei jedoch noch einmal erwähnt, daß die errechneten paarweisen theta-Werte ein Maß für den Genfluss und die allelische Verwandtschaft zwischen zwei Populationen ist. An dieser Stelle sei aber wegen der Übersichtlichkeit das aus diesen Werten berechnete mit UPGMA berechnete Dendrogramm wiedergegeben (Abb. 13). Dieses Diagramm visualisiert die Größe und/oder die allelische Verwandtschaft zwischen zwei Populationen dadurch, daß zwei Populationen im "Stammbaum" benachbart zu liegen kommen, die sich in ihrer allelischen Ausstattung ähnlich sind.

Da benachbarte Populationen eher miteinander Genfluss haben sollten als weiter entfernte, sollten die entsprechenden Populationsvergleiche auch durch niedrigere theta-Werte gekennzeichnet sein, also im Stammbaum benachbart sein. Dies gilt allerdings nur solange, als der Besatzeinfluß die jeweiligen phylogeographisch gewachsenen Eigenheiten der untersuchten Populationen nicht schon teilweise zerstört hat. Auf Mikrosatellitenbasis wurde dies für die Bachforelle bereits gezeigt (Estoup et al. 1997).

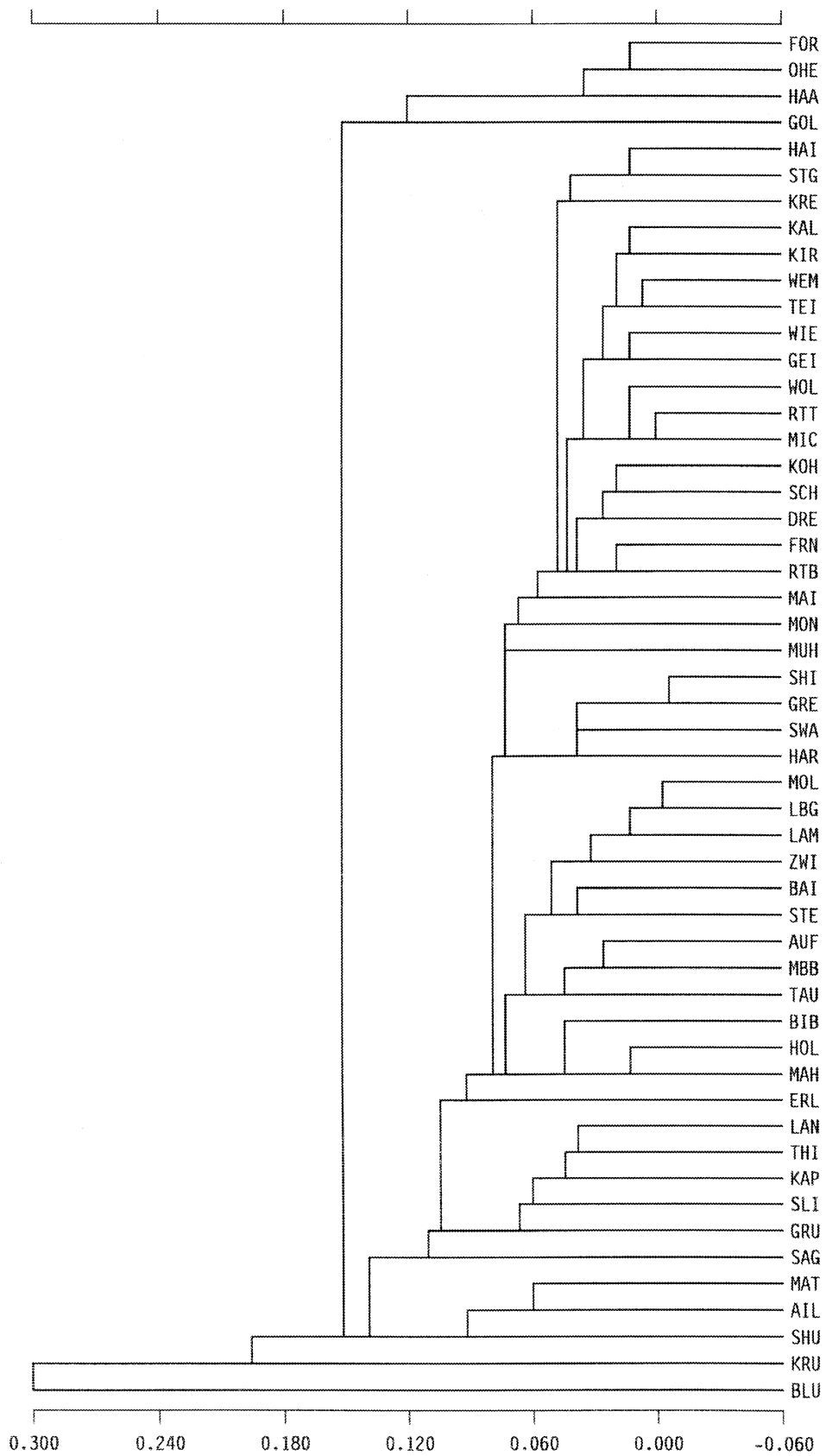


Abb. 13: UPGMA-Dendrogramm aller beprobten Populationen und Zuchten, dessen Topologie aus den paarweisen theta-Werten berechnet wurde (Erklärung siehe Text). Die Skalierung gibt ein relatives Maß für die genetische Distanz, die durch die Astlängen ausgedrückt wird.

Interessanterweise finden sich im theta-Baum nur wenige eindeutig phylogeographisch zu erwartende Gruppierungen (vergleiche mit Abb. 8):

- (1) die Populationen der niederbayerischen Ilz, also Forellenbach (FOR), Große Ohe (OHE) und die Haaraus Seige (HAA) gruppieren erwartungsgemäß miteinander und sind klar von allen anderen Populationen getrennt (erkennbar an der "Astlänge" der genetischen Distanz, die diese Populationen von anderen trennt).
- (2) die Populationen des Einzugsgebietes der Kalten Moldau in Niederbayern gruppieren miteinander, also der Schindelbach (SHI), der Grenzbach (GRE), der Schwarzbach (SWA) und der Harlandtbach (HAR). Hier fällt auf, daß die untersuchten 10 Tiere der Kalten Moldau selbst (MOL) nicht in diesen Cluster hineinfallen.
- (3) die drei Populationen des Wiesent-Einzugs in Oberfranken, der Mathelbach (MAT), der Schulmühlbach (SHU) und der Ailsbach (AIL) clustern entsprechend zusammen.
- (4) die beiden Populationen im Einzugsbereich der Schwesnitz: Höllbach (HÖL) und Mähringsbach (MAH)
- (5) schließlich ergaben sich zwei Paarungen von Bächen, die zwar im gleichen Einzugsgebiet liegen, denen aber auch noch weitere Bäche aus diesem Einzugsgebiet hätten zugeordnet werden müssen. Das sind einmal die Bäche Thiemitz (THI) und Langenaubach (LAN) im Einzugs der Rodach, und zum anderen die beiden Bäche Michelbach (MIC) und Rott (RTT) im Einzugs der Rott.

Bei der Betrachtung dieser Gruppierungen fällt auf, daß außer der Paarung Michelbach (MIC) und Rott (RTT) alle Bäche durch eine vergleichsweise niedrige Besatzeinflußwahrscheinlichkeit zwischen 0 und 4 gekennzeichnet sind. Es liegt also der Verdacht nahe, daß diese dem Gewässernetz entsprechenden Gruppierungen deswegen erhalten blieben, weil der Besatzeinfluß ihre phylogeographische Integrität zerstört hat. Der Ausnahmefall der Gruppierung zweier stark besetzter Bäche (KorrScor = 8) Michelbach und Rottbach mag daraufhin zurückzuführen sein, daß beide Bäche über Jahre intensiv aus der gleichen Zucht besetzt wurden.

3.2.2.2 Ergebnisse der Selbstklassifikationsanalyse

Wie im Methodenteil besprochen ist es möglich, Individuen entsprechend ihres Mikrosatelliten-Genotyps daraufhin zu untersuchen, welcher der fast 50 beprobten Populationen sie aufgrund ihrer Ähnlichkeit zugeordnet würden. Mit dem Programm GENECLASS 1.02 wurden deshalb Zuordnungstests für alle Individuen vorgenommen, von denen mindestens 4 der 5 Mikrosatellitenloci typisiert waren. Dazu wurde die direkte bayesianische Zuordnungsmethode aus dem Programm-Menü gewählt, der eine Wahrscheinlichkeitsberechnung für die Zuordnung eines Individuums zu einer Population zugrundeliegt (Rannala & Mountain 1997). Individuen aus durch Besatz wenig beeinflussten Populationen sollten in dieser Analyse mit einer höheren Wahrscheinlichkeit ihrer eigenen oder einer ebenfalls weitestgehend unbeeinflussten benachbarten Population zugeordnet werden, als einer im Gewässernetz entfernter liegenden.

Zusätzlich wurden mit Hilfe von Permutationstests nicht nur direkte Zuordnungen entsprechend der größten genetischen Ähnlichkeit zu einer Population berechnet, sondern auch die Wahrscheinlichkeiten, mit der sie als Mitglieder anderen genetisch nicht so ähnlichen Populationen zugeordnet werden könnten. Da die Ergebnisse sich in ihrer Aussagekraft nicht wesentlich unterscheiden, sind sie nur im Anhang 7 dargestellt.

Die Ergebnisse dieser Selbstklassifikationsanalyse sind in Tabelle 23a und b dargestellt.

Bei der Betrachtung der Tabelle fällt auf, daß die Zuordnungswerte zwischen Populationen extrem stark differieren. Die Zuordnungswerte zur eigenen Population oder zu einer geographisch im gleichen Vorfluter benachbarten Population reichen von 2,4 bis 93,8%. Dass dieser Wert nicht 100% bei hochwahrscheinlich unbesetzten Populationen erreicht, mag verwundern, erscheint aber als logische Konsequenz der immer noch begrenzten Anzahl typisierter Mikro-satellitenloci. Erst mit einer noch höheren Anzahl hochpolymorpher Loci wäre damit zu rechnen, daß die Zuordnungssicherheit etwa 100% erreicht.

Auf den ersten Blick fällt auf, daß hohe Zuordnungswerte (70 bis 93,1%) ausschließlich für Individuen aus Bächen erreicht werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit unbesetzt sind. Auf der anderen Seite gehören die schlechteren Zuordnungen (unter 70%) zu Bächen mit hoher Besatzeinflußwahrscheinlichkeit. Im Vergleich zu den paarweisen Populationsvergleichen fällt dabei besonders auf, daß viele Bäche, die dort phylogeographisch korrekt gruppiert wurden, auch hohe Zuordnungswerte erhalten (zum Beispiel die oben genannte Ilz und Kalte Moldau-Zuflüsse), außer den beiden stark besetzten aber dennoch korrekt zugeordneten Bäche Michelbach (MIC) und Rott (RTT). Das bestätigt die Annahme, daß die phylogeographische Integrität durch Besatz verfälscht wird.

Die „falschen“ Zuordnungen zu einer Population aus einem nicht im gleichen Flußsystem, aber immer noch im gleichen Stromsystem gelegenen Bach reichen von 0,0 bis 43,2%, die zu einem Bach außerhalb des populationseigenen Stromsystems von 0,0 bis 58,0% (Tabelle 23a). In diesem Vergleich nicht berücksichtigt ist die Zuordnung von Individuen aus Zuchtstationen oder aus Populationen mit niedriger Stichprobenzahl (Tabelle 23b). Dennoch fiel bei den Zuchten auf, daß die Selbstklassifikationswerte recht niedrig lagen, und deshalb auch nicht erwartet werden konnte, daß Individuen aus Gewässern, die mit Bachforellen aus diesen Zuchten besetzt waren, auch als solche erkannt werden würden (siehe Tabelle 23b).

Entsprechend der Populationsbiologie der Bachforelle (siehe Einleitung) erscheint der wichtigste Wert für die Beurteilung der phylogeographischen Integrität der Wert der "Zuordnung zur eigenen Population oder zu einer nahe benachbarten aus dem gleichen Vorfluter". Dies, weil es sowohl zur Laichzeit der Bachforellen lokal zu Laichwanderungen bachaufwärts kommt, als auch weil ältere und große Forellen aus kleinen Bächen dazu tendieren, bachabwärts zum Teil in den Vorfluter zu wandern. Wegen dieses Zusammenhangs wurde in der Gesamtanalyse ausschließlich dieser Wert berücksichtigt. Vergleicht man mit einem statistischen Testverfahren wahrscheinlich kaum oder gar nicht besetzte Gewässer mit solchen, die wahrscheinlich mittel oder stark besetzt wurden, so ist der Zusammenhang zwischen Besatzeinflußwahrscheinlichkeit und Zuordnung von Individuen zu einer Population aus dem eigenen Vorflutersystem hochsignifikant (Abb. 14).

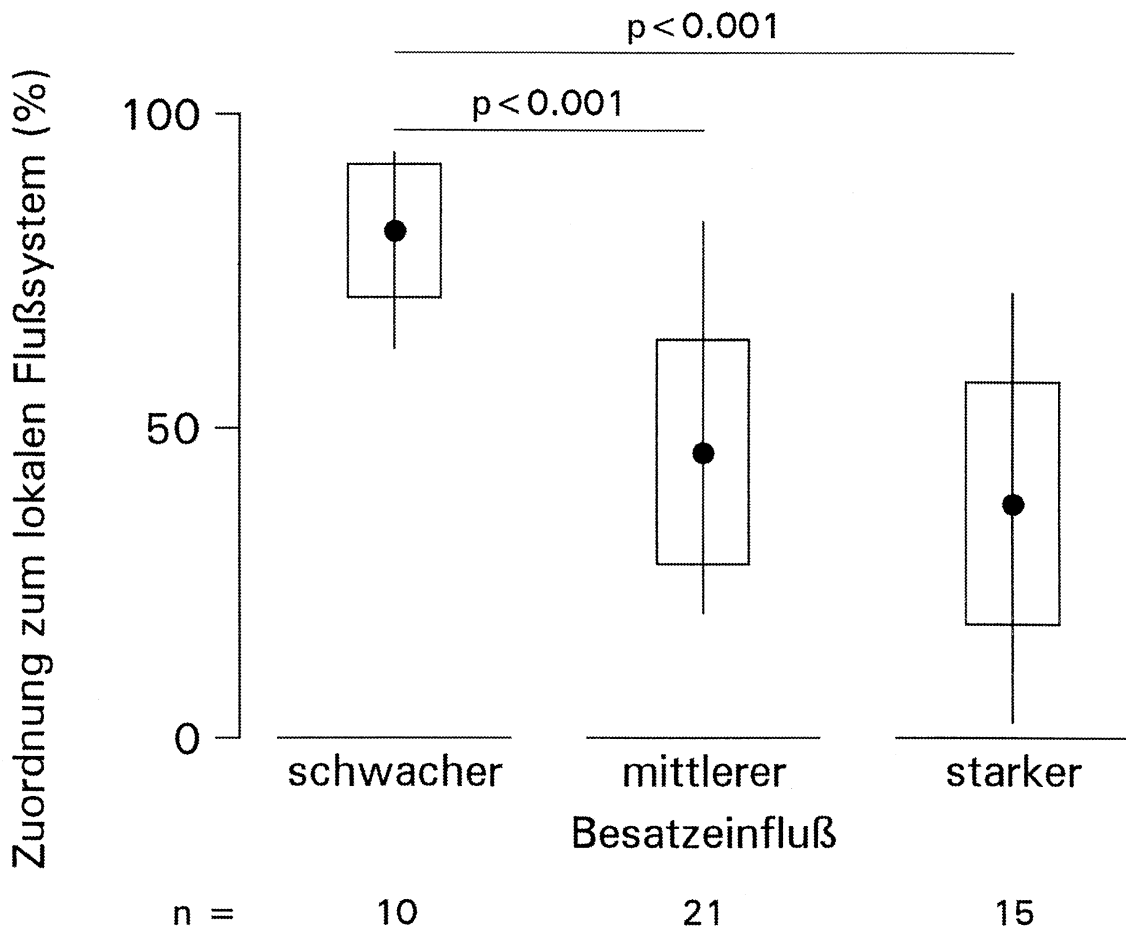


Abb. 14: Ergebnisse der Analyse auf signifikante Unterschiede in Selbstklassifikation von Individuen zu einer Population aus ihrem eigenen Vorfluter aufgrund ihrer Mikrosatelliten-Genotypen in Abhängigkeit von ihrer Besatzeinflußwahrscheinlichkeit (schwache Wahrscheinlichkeit KorrScore 0-2, mittlere Wahrscheinlichkeit KorrScor 3-6, hohe Wahrscheinlichkeit KorrScor 7-9). Der Kruskal-Wallis-Test ergab auf hochsignifikantem Niveau ($p < 0,00001$), daß die drei verschiedenen Besatzgruppen bezüglich ihrer Selbstklassifikation nicht aus einer Grundgesamtheit stammen. Entsprechend wurde mit einem multiplen Vergleich nach Conover überprüft, welche der drei Gruppen sich signifikant von den jeweils anderen beiden unterscheiden. Es ergaben sich hochsignifikante Unterschiede zwischen schwach und mittelstark und schwach und stark besetzten Gruppen. Ein signifikanter Unterschied zwischen mittel und stark besetzten Populationen in der Rückordnungswahrscheinlichkeit lies sich aber nicht nachweisen. Dieses Ergebnis läßt den Rückschluß zu, daß bereits mittlerer Besatzeinfluß die phylogeographische Integrität genauso stark beeinflusst, wie starker. Dies gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, daß keine anderen Faktoren eine Rolle spielen, was mit Hilfe der Kanonischen Korrespondenzanalyse überprüft wurde (siehe unten).

Tabelle 23a: Ergebnisse der Geneclass-Selbstklassifikationsanalyse für natürliche Gewässer mit ausreichender Stichprobengröße (weitere Erklärung siehe Text)

		Zuordnung in der Selbstklassifikationsanalyse								
POP	n	zur eigenen Population		insgesamt zu lokalem Flußsystem		außerhalb lok. Fluß-, aber zu lokalem Stromsystem		zu fremdem Stromsystem		zu einer der drei Zuchten
		abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.
Wie	30	6	20,0	6	20,0	10	33,3	14	46,7	0
RTB	30	13	43,3	15	50,0	4	13,3	10	33,3	1
GEI	29	7	24,1	9	31,0	9	31,0	10	34,5	1
KAL	41	6	14,6	10	24,4	10	24,4	20	48,8	1
HAI	38	10	26,3	10	26,3	15	39,5	11	29,0	2
TAU	35	14	40,0	14	40,0	6	17,1	15	42,9	0
WOL	26	6	23,1	7	26,9	10	38,5	8	30,8	1
TEI	30	10	33,3	13	43,3	6	20,0	9	30,0	2
BAI	28	7	25,0	7	25,0	6	21,4	13	46,4	2
MUH	31	12	38,7	16	51,6	6	19,4	8	25,8	1
SLI	30	19	63,3	21	70,0	3	10,0	6	20,0	0
STG	30	13	43,3	18	60,0	5	16,7	6	20,0	1
KOH	28	4	14,3	7	25,0	9	32,1	11	39,3	1
RTT	30	8	26,7	13	43,3	6	20,0	9	30,0	2
MIC	30	2	6,7	7	23,3	8	26,7	15	50,0	0
ERL	33	21	63,6	21	63,6	4	12,1	8	24,2	0
HAA	25	18	72,0	23	92,0	1	4,0	1	4,0	0
FOR	30	20	66,7	26	86,7	0	0,0	4	13,3	0
OHE	28	10	35,7	22	78,6	2	7,1	3	10,7	1
KIR	29	10	34,5	10	34,5	7	24,1	12	41,4	0
BLU	32	30	93,8	30	93,8	1	3,1	1	3,1	0
SAG	32	20	62,5	20	62,5	7	21,9	4	12,5	1
GOL	34	22	64,7	25	73,5	3	8,8	6	17,7	0
LAM	41	1	2,4	1	2,4	6	14,6	24	58,5	10
HOL	36	10	27,8	16	44,5	9	25,	11	30,6	0
MÄH	29	11	37,9	13	44,8	8	27,6	7	24,1	1
STE	35	12	34,3	13	37,2	7	20,0	14	40,0	1
BIB	34	17	50,0	19	55,9	7	20,6	6	17,7	2
GRE	20	4	20,0	12	60,0	1	5,0	7	35,0	0
SWA	30	20	66,7	24	80,0	2	6,7	4	13,3	0
HAR	30	13	43,3	21	70,0	2	6,7	7	23,3	0
KRU	28	20	71,4	21	75,0	2	7,1	5	17,9	0
FRN	18	7	38,9	7	38,9	6	33,3	4	22,2	1
MBB	28	7	25,0	7	25,0	8	28,6	8	28,6	5
KRE	32	8	25,0	14	43,8	11	34,4	6	18,8	1
GRU	35	18	51,4	25	71,4	7	20,0	3	8,6	0
THI	31	16	51,6	26	83,9	1	3,2	4	12,9	0
LAN	29	4	13,8	18	62,1	4	13,8	5	17,2	2
SCH	37	11	29,7	11	29,7	16	43,2	9	24,3	1
WEM	30	1	3,3	1	3,3	10	33,3	16	53,3	3
SHU	29	26	89,7	27	93,1	2	6,9	0	0,0	0
MAT	29	23	79,3	24	82,8	2	6,9	2	6,9	1
DRE	40	22	55,0	22	55,0	6	15,0	12	30,0	0
MON	36	19	52,8	19	52,8	8	22,2	8	22,2	1
KAP	30	12	40,0	12	40,0	8	26,7	10	33,3	0
MAI	30	13	43,3	14	46,7	8	26,7	8	26,7	0

Tabelle 23b: Ergebnisse der Geneclass-Selbstklassifikationsanalyse für Zuchtstationen und natürliche Gewässer mit niedriger Stichprobengröße (weitere Erklärung siehe Text)

		Zuordnung in der Selbstklassifikationsanalyse								
POP	n	zu lokaler Population		insgesamt zu lokalem Flußsystem		außerhalb lok. Fluß-, aber zu lokalem Stromsystem		zu fremdem Stromsystem		zu einer der drei Zuchten
		abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.
Zucht										
LBG	35	15	42,9	15	42,9	9	25,7	8	22,9	3
ZWI	52	32	61,5	32	61,5	9	17,3	10	19,2	1
AUF	46	23	50,0	23	50,0	14	30,4	7	15,2	2
Bäche										
SHI	7	3	42,9	6	85,7	0	0,0	1	14,3	0
MOL	10	1	10,0	1	10,0	0	0,0	5	50,0	4
AIL	10	5	50,0	8	80,0	1	10,0	1	10,0	0

3.2.2.3 Ergebnisse der Kanonischen Korrespondenzanalyse zur Quantifizierung des Einflusses von Gewässernetz, Umweltfaktoren und Besatz auf die typisierte mitochondriale und nukleäre genetische Diversität der Bachforelle

Trotz der starken Indizien, die sich vor allem aus den Ergebnissen der Selbstklassifikationsanalyse für die Existenz eines negativen Besatzeinflusses ergeben haben, ist es auf dieser Basis alleine nicht möglich, eine eventuell zerstörte phylogeographische Integrität einzelner Populationen auf Besatzeinfluss alleine zurückzuführen. Vielmehr müssen zur Abschätzung des tatsächlichen Besatzeinflusses andere Faktoren (mit)berücksichtigt werden, die die molekular-genetischen Befunde ebenfalls (mit)erklären könnten.

So könnte es durchaus sein, daß Populationen einen hohen Selbstklassifikationsanteil erreichen, weil sie eine andere Eigenschaft unabhängig vom Besatzeinfluss gemeinsam haben. Um dies auszuschließen, wurde die Kanonische Korrespondenzanalyse (CCA bzw PCCA) als am besten geeignetes multivariates Verfahren angewendet (siehe Methodenteil), weil sie geeignet ist, gleichzeitig und unter Berücksichtigung der jeweils anderen möglichen Parameter den Einfluss des Gewässernetzes, der Höhe über NN, des Einzugsgebietes oberhalb der Befischungsstelle, der biotischen Integrität und des Besatzeinflusses auf die populationsgenetischen Eigenschaften zu untersuchen.

Wie im Methodenteil aufgezeigt, wurden dazu die Daten in Matrizenform aufbereitet und der Einfluß der unabhängigen Parameter auf die potentiell abhängigen genetischen Parameter getestet. Neben der Quantifizierung der Größe des Einflusses einzelner Parameter auf die

genetische Diversität ist es mit dem Programm CANOCO 4.0 auch möglich mit Permutations-tests zu überprüfen, ob ein detektierter Einfluß auch statistisch signifikant nachweisbar ist. Die Ergebnisse, die im folgenden dargestellt und erklärt werden, sind tabellarisch in den Tabellen 24a und 24b zusammengefasst. Es werden nur solche Einflußgrößen diskutiert, die in einer partiellen Kanonischen Korrespondenzanalyse (PCCA) als signifikante Größen identifiziert wurden und für die auch das P-Modell für die Gesamtvarianz signifikant oder annähernd signifikant war.

3.2.2.3.1 Einflusses des Gewässernetzes auf die beobachtete genetische Varianz

Die Wahrscheinlichkeiten dafür, daß das statistische Modell zur Erklärung des Zusammenhangs zwischen Gewässernetz und Mikrosatellitenallelfrequenzen korrekt ist (PCCA), ist für die Loci 543AE, BS131 und SSA 85 hoch (p -Werte zwischen 0,001 und 0,01). Gerade nicht mehr signifikant war das P-Modell (PCCA) für den Locus MST85 ($p < 0,06$), soll aber dennoch diskutiert werden, zumal es auf CCA-Niveau (Tabelle 24b III.a) noch mit $p < 0,04$ signifikant war. Auf alle Fälle nicht signifikant war der Zusammenhang für den Locus SFO8. Das P-Modell für den Zusammenhang zwischen Gewässernetz und RFLP-Daten war nur auf CCA-Niveau mit $p < 0,036$ signifikant, auf PCCA-Niveau gerade nicht mehr mit $p < 0,075$. Schließlich waren das Modell für Zusammenhänge zwischen Zuordnungswahrscheinlichkeit, Heterozygotiegrad und Gewässernetz signifikant, das für die Anzahl der Allele nicht. Entsprechend dieser Ergebnisse werden keine signifikante Einzelergebnisse für den Locus SFO8 und die Anzahl Allele diskutiert.

Wie aus den Punkten I und III der Tabelle 24a und 24b hervorgeht, erklärt der Vernetzungsgrad der Gewässer und damit die aktuelle geographische Distanz (auf dem Wasserweg) der Bachforellenpopulationen zueinander den Löwenanteil der genetischen Varianz, unabhängig davon, welche Variable betrachtet wird. So geht aus Tabelle 24b (III.b) hervor, daß zwischen 52,77 und 77,97% der gesamten genetischen Varianz einzelner Mikrosatellitenloci durch die Gewässerknoten alleine erklärt werden kann. Dazu kommt noch ein Anteil zwischen 0 und 12,55%, der durch beide, geographische und Umweltfaktoren zusammen, erklärt werden kann (geteilte Varianz). Unterteilt man diese geographisch erklärte Varianz weiter in unspezifische und spezifische Komponenten, so zeigt sich, daß ein größerer Teil der Varianz durch einzeln identifizierbare Gewässerknoten erklärt werden kann, also solche, die für sich genommen einen signifikanten Beitrag zur Gesamtvarianz liefern (Details dazu siehe Tabelle 24a, Punkt I). Mit anderen Worten, einzelne Strom-, Fluß- und Bachsysteme besitzen einen prozentualen Eigenanteil phylogeographischer Integrität, der nicht durch die untersuchten Umweltfaktoren oder anthropogenen Einflüsse erklärt werden kann.

Tabelle 24a: Ergebnisse der Kanonischen Korrespondenzanalyse: Einfluß des Gewässernetzes (Erklärung siehe Text)

I. Einfluß der Phylogeographie auf die Genetik		543AE	BS131	MST85	SFO8	SSA85	RFLPs	Zuordng.	Heterozyg.	Anz. Allele
Gesamte Varianz im Datensatz		1,769	1,145	0,936	2,168	0,649	3,011	0,251	0,042	0,047
Summe "unconstrained" Eigenvalues (PCCA)		1,435	0,872	0,818	1,866	0,597	2,698	0,169	0,037	0,039
Summe kanonische Eigenvalues (PCCA)		1,134	0,784	0,602	1,144	0,506	2,168	0,141	0,028	0,027
Varianz (%) erklärt durch alle Gewässerknoten (PCCA)		64,10	68,47	64,32	52,77	77,97	72,00	56,18	66,67	57,45
Summe signifikanter Eigenvalues (PCCA)		0,630	0,480	0,320	0,330	0,330	1,370	0,110	0,010	0,010
Varianz (%) erklärt durch signifikante Gewässerknoten (PCCA)		35,61	41,92	34,19	15,22	50,85	45,50	43,82	23,81	21,28
Eigenvalue 1. Achse (PCCA)		0,282	0,192	0,144	0,356	0,143	0,820	0,119	0,013	0,010
Eigenvalue 2. Achse (PCCA)		0,198	0,167	0,097	0,262	0,124	0,375	0,021	0,009	0,007
Gen-Gewässer-Korrelation 1. Achse (PCCA)		0,966	0,975	0,960	0,705	0,978	1,000	0,929	0,907	0,940
Gen-Gewässer-Korrelation 2. Achse (PCCA)		0,898	0,922	0,912	0,906	0,981	0,955	0,834	0,884	0,898
Varianz (%) Gen-Gewässer-Korrelation 1. Achse (PCCA)		24,80	24,50	23,80	31,10	28,40	37,80	85,00	46,00	37,00
Varianz (%) Gen-Gewässer-Korrelation 2. Achse (PCCA)		17,50	21,30	16,20	22,90	24,40	17,30	15,00	30,80	23,70
P-Modell (PCCA)		0,012	0,002	0,060	0,781	0,001	0,075	0,010	0,050	0,365
Summe kanonische Eigenvalues (CCA)		1,356	0,864	0,643	1,260	0,505	2,307	0,177	0,029	0,032
P-Modell (CCA)		0,012	0,001	0,040	0,564	0,001	0,036	0,144	0,122	0,118
Varianz (%) erklärt durch Gewässer als einzige Variable (CCA)		76,65	75,46	68,70	58,12	77,81	76,62	57,37	69,05	68,09
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 2**		10,18					13,62			
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 3**		4,52					14,61			
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 4**			11,35			3,08	6,31		23,81	21,28
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 6*			4,37							0,00
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 7*		3,96								
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 8*				3,21		15,41				
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 10*				4,27				0,00		
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 13**				4,27				15,94		
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 14**										
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 16**										
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 17*										
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 18**										
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 21*		3,96								
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 22**		5,65								
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 24**			6,99	9,62		3,08		3,98		
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 27*				3,21						
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 29*			2,62							
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 30*			4,37	6,41						
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 32*										
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 36**										
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 37**					15,22	18,49		7,97		
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 38**										0,00
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 41**		7,35								
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 43*			3,49			4,62				
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 44**						3,08				
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 45**						3,08			0,00	
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 46*			3,49					3,98		
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 47**				3,21			10,96			
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 48**								11,95		
Signifikante Varianz (%) von Gewässerknoten (PCCA) 49**										0,00

Tabelle 24b: Ergebnisse der Kanonischen Korrespondenzanalyse: Einfluß der Umweltfaktoren und Analyse der Gesamtvarianz (Erklärung siehe Text)

II. Einfluß der Umweltfaktoren auf die Genetik									
	543AE	BS131	MST85	SFO8	SSAB5	RFLPs	Zuordnung	Heterozyg.	Anzahl Allele
Summe 'unconstrained' Eigenvalues (PCCA)	0,413	0,281	0,294	0,908	0,144	0,704	0,074	0,013	0,015
Summe kanonische Eigenvalues (PCCA)	0,111	0,093	0,078	0,166	0,052	0,173	0,048	0,005	0,003
Varianz (%) erklärt durch alle Umweltfaktoren (PCCA)	6,27	8,12	8,33	7,66	8,01	5,75	19,21	11,90	6,38
Summe signifikanter Eigenvalues (PCCA)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000
Varianz (%) erklärt durch signifikante Umweltfaktoren (PCCA)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	15,94	0,00	0,00
Eigenvalue 1. Achse (PCCA)	0,079	0,054	0,035	0,105	0,027	0,114	0,040	0,003	0,002
Eigenvalue 2. Achse (PCCA)	0,022	0,022	0,019	0,037	0,016	0,043	0,008	0,002	0,001
Gen-Umwelt-Korrelation 1. Achse (PCCA)	0,809	0,856	0,790	0,805	0,910	0,741	0,823	0,815	0,706
Gen-Umwelt-Korrelation 2. Achse (PCCA)	0,591	0,826	0,760	0,314	0,654	0,653	0,714	0,617	0,523
P-Modell (PCCA)	0,320	0,075	0,287	0,597	0,053	0,423	0,006	0,060	0,548
Summe kanonische Eigenvalues (CCA)	0,394	0,173	0,119	0,282	0,052	0,312	0,082	0,006	0,008
P-Modell (CCA)	0,002	0,009	0,027	0,170	0,605	0,253	0,002	0,104	0,016
Signifikante Varianz (%) des Besatzeinflusses (PCCA) **	18,9	15,11	12,71	13,01	8,01	10,36	32,67	14,29	17,02
Signifikante Varianz (%) des Gewässergüte (IBI) (PCCA) *							7,97		
Signifikante Varianz (%) des Einzugsgebietes (PCCA) *							3,98		
							3,98		
III. Analyse der Gesamtvarianz									
III.a Berechnungen des Gesamteinflusses aller Parameter auf die Genetik									
Summe kanonische Eigenvalues	1,468	0,96	0,72	1,43	0,56	2,48	0,225	0,034	0,035
Varianz (%) erklärt durch beide Variablensets	82,98	83,58	76,92	65,77	85,98	82,36	89,64	80,95	74,47
P-Modell	0,016	0,001	0,037	0,6773	0,001	0,0539	0,004	0,030	0,201
III.b Analyse der Gesamtvarianz									
Varianz (%) erklärt durch alle Gewässerknoten (PCCA)	64,10	68,47	64,32	52,77	77,97	72,00	56,97	66,67	57,45
Varianz (%) erklärt durch signifikante Gewässerknoten (PCCA)	35,61	41,92	34,19	15,22	50,85	45,50	43,82	23,81	21,28
Varianz (%) erklärt durch alle Umweltfaktoren (PCCA)	6,27	8,12	8,33	7,66	8,01	5,75	19,21	11,90	6,38
Varianz (%) erklärt durch signifikante Umweltfaktoren (PCCA)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	15,94	0,00	0,00
Geteilte Varianz (%)	12,55	6,99	4,49	5,35	-0,15	4,62	13,46	2,38	10,64
Un erklärte Varianz (%)	17,07	16,42	22,86	34,23	14,18	8,40	10,36	19,05	25,53

Abkürzungen

CCA: Kanonische Korrespondenzanalyse

PCCA: Partielle Kanonische Korrespondenzanalyse

* : mindestens signifikant auf p<0.05 - Niveau

** : mindestens einmal signifikant auf p< 0.01 Niveau

Dieser signifikante Eigenanteil einzelner Gewässerknoten kann mit niedrigen Prozentwerten um 0 vergleichsweise unbedeutend sein, aber auch Werte für einzelne Loci von 15 bis 20% annehmen, z.B. 18,49% (Locus SSA-85) für den Gewässerknoten 38, der die Bäche und die Zuchtstation des Wiesenteinzuges in Oberfranken zusammenfasst.

Auch die mitochondriale Diversität wird mit 76,62% zu einem großen Anteil über die Gewässerknoten erklärt, allerdings erklärt sich diese Varianz zu fast zwei Dritteln aus den signifikanten Einzelbeiträgen von nur vier Gewässerknoten. Zwei dieser Knoten liegen basal im Gewässernetz und trennen das atlantische vom danubischen System bzw. die untere Donau von der oberen Donau). Die zwei weiteren Knoten charakterisieren die drei beprobten Gewässer des Ilz-Systems in Niederbayern und des Rodachsystems in Oberfranken.

Die Varianz des populationsgenetischen Kennwertes "Heterozygotie" wird zu fast 70% über das Gewässernetz erklärt, allerdings lassen sich hier bis auf den Gewässerknoten des Ilzsystems keine signifikanten und bedeutenden Einzelbeiträge herausfiltern.

Anders verhält es sich mit dem Einfluß des Gewässernetzes auf die Zuordnungswahrscheinlichkeit einzelner Individuen auf der Basis ihres Mikrosatellitengenotyps zu Populationen aus ihrem eigenen Vorflutersystem. Hier werden 57,37% der Varianz durch die Gewässerstruktur erklärt, allerdings werden diese Beiträge spezifisch und zum größten Teil von 6 Gewässerknoten signifikant unterstützt, die bis auf eine Ausnahme nicht durch andere herausstehende genetische Eigenheiten charakterisiert sind. Dabei fallen besonders ins Gewicht der etwas artifiziell wirkende Knoten 18, der das stark besetzte Naab- mit dem Lechsystem verbindet (15,94%), und mit 11,95% Beitrag der Knoten des ebenfalls stark besetzten Systems der Kremnitz. Es lohnt daher zu spekulieren, daß die identifizierte geographische Komponente der Zuordnungswahrscheinlichkeiten nicht durch phylogeographische Zustände kommt, sondern durch andere, bisher nicht identifizierte Faktoren, zum Beispiel Besatz aus der gleichen oder ähnlichen Quelle.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mehrere einzelne Gewässerknoten in bedeutendem Maß zur Varianz in Mikrosatelliten- und RFLP-Haplotypenfrequenzen beitragen. Da der potentielle Besatzeinfluss und Umweltfaktoren mittels der PCCA bereits herausgerechnet wurden, können diese Gewässerknoten zur Identifizierung phylogeographisch eigenständiger Regionen (ECU'S) dienen, deren genetische Identität auf natürliche Weise entstanden ist. Diese für den Naturschutz bedeutenden Knoten sind folgende:

Knoten 02: Eigenständigkeit der atlantischen und danubischen Gruppierungen

Knoten 03: Eigenständigkeit der oberen Donau

Knoten 04: Ilzsystem (hohe Beiträge von Locus BS 131, RFLP's, Heterozygotie)

Knoten 24: Elbe-System (hohe Beiträge von Loci BS 131 und MST 85)

Knoten 38: Wiesensystem (hoher Beitrag von Locus SSA 85)

Knoten 47: Rodachsystem (hohe Beitrag von RFLP's)

Zu diesen Knoten kommen noch weitere, die durch kleinere Beiträge zur Gesamtvarianz auffallen und nach der Bonferroni-Korrektur herausfielen. Mit diesen Ergebnissen aus der CCA, die sich mit den unabhängigen Betrachtungen und Analysen zur mitochondrialen und nukleären Diversität problemlos in Einklang bringen lassen, ist die Anwendbarkeit der PCCA auf diesen Datensatz gezeigt, und kann daher auch im Umkehrverfahren auf den Einfluß der Umweltfaktoren und des Besatzes angewandt werden.

3.2.2.3.2 Einfluss der Umweltdaten unter Berücksichtigung des Einflusses des Gewässernetzes

Die Wahrscheinlichkeiten dafür, daß das statistische Modell zur Erklärung des Zusammenhangs zwischen Umweltdaten und Mikrosatellitenallelfrequenzen korrekt ist (PCCA), ist nur für den Mikrosatellitenlocus SSA85 ($p < 0,05$) und für die Zuordnungswahrscheinlichkeit ($p < 0,006$) signifikant. Lediglich ein weiterer Zusammenhang für den Locus BS131 war auszumachen, der auf PCCA-Niveau annähernd signifikant war ($p < 0,075$) aber auf CCA-Niveau hochsignifikant ($p < 0,001$). Wie aus den Tabellen 24a und 24b (unter Punkt II und III) hervorgeht, erklären die zusammengefaßten Umweltdaten nur einen kleinen Teil der genetischen Varianz, wie sie durch die Mikrosatellitenallele, RFLP-Haplotypenfrequenzen oder populationsgenetische Kennwerte ausgedrückt wird. Die Prozent-Werte liegen zwischen 5,75 und 11,90. Einzige Ausnahme bildet der Wert der Zuordnung von Individuen zu einer Population aus dem eigenen Vorflutersystem auf der Basis aller Mikrosatellitenallelfrequenzen. Dieser Wert beträgt 19,21%.

Der Zuordnungswert ist auch der einzige, für den mit Hilfe der „Forward-Selection“-Routine im Programm CANOCO 4.0 der Beitrag auf die Varianz von einzelnen Umweltvariablen gemessen und auf ihre Signifikanz hin untersucht werden konnte. Demnach trug der Besatzeinfluß mit fast 8% hochsignifikant dazu bei, ob Individuen einer Population zu einer Population aus ihrem Gewässersystem zugeordnet wurden oder nicht. Mit jeweils etwa 4 Prozent spielten die Rolle des Einzugsgebietes und die Gewässergüte ebenfalls eine signifikante Rolle bei der Zuordnungswahrscheinlichkeit. Diese Ergebnisse der PCCA sind in Abb. 15 visualisiert und erklärt.

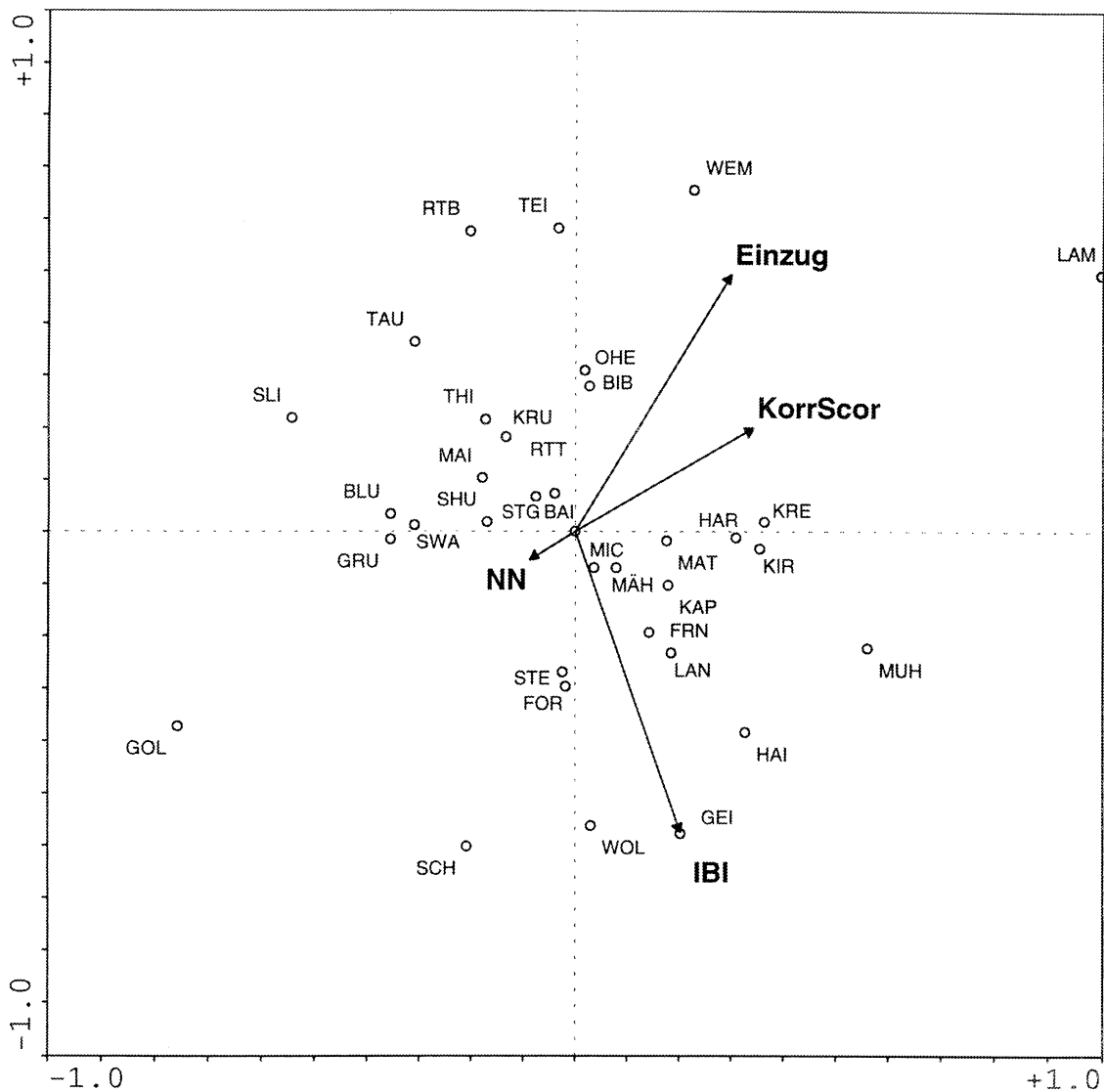


Abb. 15: Visuelle Darstellung der partiellen Kanonischen Korrespondenzanalyse (PCCA), mit der getestet wurde, in welchem Maße Umweltparameter auf die Rückordnungswahrscheinlichkeit von Individuen wirken, wenn man die geographische Komponente herausrechnet (IBI = Forellenbach-IBI, NN = Höhe über dem Meeresspiegel, Einzug = Einzugsgebiet oberhalb der Befischungstelle, und KorrScor = Besatzeinflußwahrscheinlichkeit). Die Abbildung macht deutlich, daß der IBI nicht in die gleiche Richtung auf die Rückordnungswahrscheinlichkeit wirkt wie KorrScor und Einzug. Entsprechend werden z.B. Einzelergebnisse der PCCA für größere Gewässer mit hoher Besatzeinflußwahrscheinlichkeit in ähnlicher Richtung angeordnet (z.B. Lamitz (LAM) und Weisser Main (WEM)). NN ist signifikant, was durch geringe Vektorenlänge bestätigt wird. Welche linearen Zusammenhänge wirken, wurde in einer multifaktoriellen linearen Regression (siehe unten) berechnet.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß nach Berücksichtigung des Einflusses des Gewässernetzes auf die genetische Diversität von Bachforellen meßbare Auswirkungen der Umweltparameter ausschließlich für die Zuordnungswahrscheinlichkeit festzustellen sind. Da die Kanonische Korrespondenzanalyse auch nichtlineare Zusammenhänge in ihrer Analysetechnik berücksichtigt, ist mit diesem Ergebnis zwar festgestellt, daß es signifikante Zusammenhänge zwischen Umweltparametern und Zuordnungswahrscheinlichkeit gibt, nicht aber, ob diese Zusammenhänge linear verlaufen. Entsprechend schwierig sind auch die Prozentwerte für den Einfluß der Umweltparameter auf die Zuordnungswahrscheinlichkeit zu bewerten. Für die abschließende Bewertung der Bedeutung der identifizierten Zusammenhänge muß daher überprüft werden, ob auch lineare Zusammenhänge eine Rolle spielen. Nur so läßt sich zum Beispiel angeben, ob mit zunehmender Besatzintensität auch eine stärkere Bedrohung der phylogeographischen Integrität von Bachforellen gegeben ist. Die von der CCA identifizierten und signifikant wirksamen Umweltparameter, sollten daher in einem multivariaten Verfahren auf einen linearen Zusammenhang mit der Zuordnungswahrscheinlichkeit überprüft werden.

3.2.2.4 Ergebnisse einer multifaktoriellen Regressionsanalyse zur Überprüfung eines linearen Zusammenhangs zwischen Umweltparametern und phylogenetischer Integrität

Mit Hilfe einer „Analysis of Variance“ (ANOVA), so wie es im Statistik-Programm Paket SYSTAT implementiert ist, wurde untersucht, ob die analysierten Umweltfaktoren einen linearen Einfluß auf die Zuordnungswahrscheinlichkeit ausüben. Dabei wurden alle Umweltvariablen in das Modell integriert: Besatzeinflußwahrscheinlichkeiten von 0 bis 9 (10 Kategorien), die IBI-Werte in ihrem detektierten Bereich von 12 bis 36 (zusammengefasst in 16 Kategorien), Einzugsgebiet oberhalb der Befischungsstelle und Höhe über NN jeweils als kontinuierliche Variablen.

Aus der Analyse und der Abbildung (siehe Abb. 16 mit Erklärungen) geht klar hervor, daß es einen linearen Zusammenhang zwischen Besatzeinflußwahrscheinlichkeit und Zuordnungswahrscheinlichkeit zur eigenen Population gibt. Da die anderen Umweltfaktoren Höhe über NN, IBI und Einzugsgebiet oberhalb der Befischungsstelle entweder mit Hilfe der Kanonische Korrespondenzanalyse als nicht signifikant bewertet wurden (Höhe über NN), oder aber mit Hilfe der ANOVA (IBI, Einzugsgebiet) in keine linearen Zusammenhang mit Zuordnungswahrscheinlichkeit gebracht werden können, ist davon auszugehen, daß die Zerstörung der phylogeographischen Integrität von Bachforellenpopulationen hauptsächlich auf Besatzmaßnahmen zurückzuführen ist. Dies insbesondere, da der natürlich gewachsene geographische Einfluß mit Hilfe der partiellen Kanonischen Korrespondenzanalyse in der Gesamtanalyse berücksichtigt wurde.

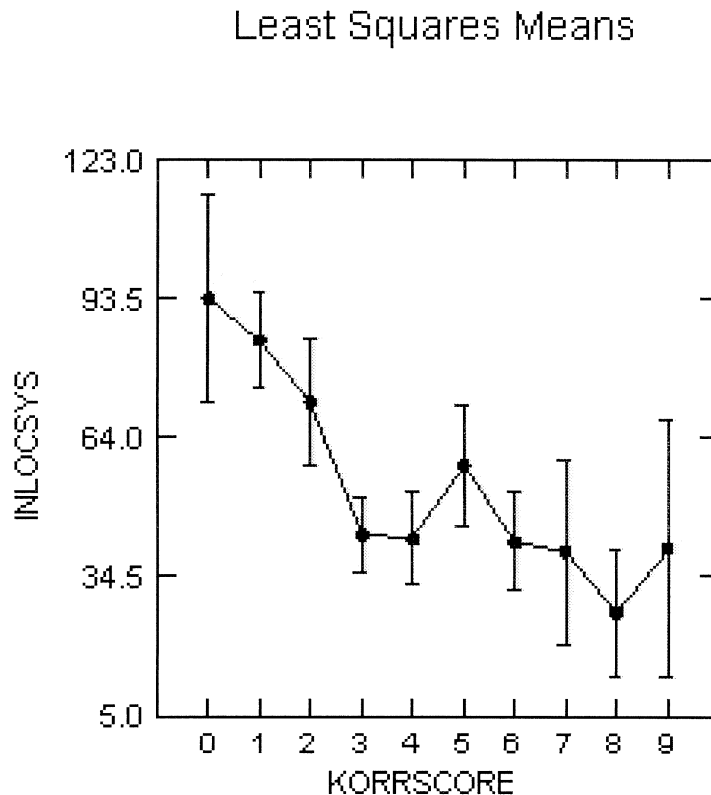


Abb. 16: Ergebnis der multifaktoriellen Analysis of Variance (ANOVA), die Zuordnungswahrscheinlichkeiten von Bachforellenindividuen zur ihrer eigenen Population oder einer aus dem gleichen lokalen Einzugsgebiet (INLOCSYS) in Abhängigkeit des geschätzten Besatzeinflusses (KORRSORE) darstellt. Die Gesamtanalyse der Rückführung der Varianz (ausgedrückt in den "Least Square Means", ergab lediglich für die Besatzeinflußwahrscheinlichkeit einen signifikanten linearen Zusammenhang mit $p < 0,02383$. Der IBI, Höhe über NN und Einzugsgebiet waren klar nicht signifikant (P -Werte von 0,042 bis 0,91). Demnach liegt die Zuordnungswahrscheinlichkeit in nicht oder kaum beeinflussten Gewässern zwischen etwa 70 und 95%, während, in mittel bis stark besetzten Gewässern im Schnitt weniger als die Hälfte der Individuen phylogeographisch korrekt zugeordnet werden.

Als alternative Erklärungen für das Ergebnis können daher nur andere, bisher nicht berücksichtigte Faktoren eine Rolle für die Zerstörung der phylogeographischen Integrität eine Rolle spielen. Interessanterweise ist der Besatzeinfluß auf die phylogeographische Integrität (gemessen in der Rückordnungswahrscheinlichkeit) trotz seines vergleichsweise geringen Einflusses auf die gesamte genetische Varianz aller Bachforellenpopulationen massiv, denn schon offensichtlich geringe Varianzänderungen in Mikrosatellitenallelfrequenzen können zu einer Zerstörung der

phylogeographischen Integrität von Bachforellenpopulationen führen (siehe Abb. 16 und vergleiche mit Abb. 14).

3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bis zu 1612 Bachforellenindividuen aus fast 50 Populationen und Zuchtanstalten wurden genetisch typisiert, um einerseits die phylogeographische Struktur bayerischer Bachforellen zu verstehen, und entsprechend den Verlust, der durch Besatz entstehen kann einzuschätzen, und andererseits potentielle Besatzeinflüsse auf die phylogeographische Integrität einzelner Populationen quantifizieren zu können.

Für die mitochondriale Analyse wurden die beiden Techniken der Restriktionslängenpolymorphismen (RFLP) und Sequenzanalyse angewendet, erstmals für die Bachforelle auch in Kombination. Die Ergebnisse bestätigen die bereits publizierten Vorkommen von nur zwei von fünf beschriebenen mitochondrialen Linien in Bayern, nämlich der atlantischen und der danubischen. Auch gleichzeitiges Vorkommen beider Typen innerhalb einer Population wurde wiedergefunden. Durch die große Probenzahl war es möglich, die drei großen Einzugsgebiete Bayerns (Main/Rhein, Elbe, Donau) hinsichtlich der genetischen Ausstattung ihrer Bachforellenpopulationen gegenüberzustellen und statistische Verfahren zur Detektion von Verteilungshäufigkeiten der Haplotypen anzuwenden. Es fanden sich in allen untersuchten Stromgebieten sowohl atlantische als auch danubische Linien, wobei auf RFLP-Ebene 14 Haplotypen festgestellt werden konnten, die sich auf der D-Loop-Sequenzebene auf 13 Haplotypen verteilten. Danubische Haplotypen waren nur wenig im atlantischen Einzugsbereich vorhanden, während umgekehrt atlantische Haplotypen auch im danubischen Einzugsbereich dominierten. In der Besatzeinflußanalyse (siehe unten) stellte sich als wahrscheinlich heraus, daß sich in Bayern eine sekundäre Kontaktzone der beiden mitochondrialen Linien befindet. Dies, weil (1) auch nicht oder mit hoher Wahrscheinlichkeit kaum besetzte Gewässer im danubischen Einzugsbereich atlantische Haplotypen in großer Frequenz aufwiesen, und (2) im Ilz-Einzug Haplotypen aufzufinden waren, die phylogenetisch dem atlantischen Typ zuzuordnen waren, dennoch über eigene Charakteristika verfügten. Der Besatzeinfluß auf die mitochondriale Diversität wurde zusammen mit den Typisierungen der zweiten Qualität genetischer Marker, der Mikrosatelliten, vorgenommen.

Zu diesem Zweck wurde der größte Teil der 1600 Bachforellenindividuen aus den gleichen Populationen mit 5 diskreten Mikrosatellitenmarkern typisiert und die allelische Vielfalt beschrieben. Diese war erwartungsgemäß wesentlich größer als bei den mitochondrialen RFLP's. Neben verschiedenen anderen Analysen wurden individuelle Mikrosatellitengenotypen einer Selbstklassifikationsanalyse unterworfen, wobei Genotypen entsprechend einer für jede

Population berechneten Wahrscheinlichkeit zu ihrer eigenen oder einer anderen Population zugeordnet werden. Der Grad, mit dem Individuen "korrekt" zugeordnet wurden, konnte somit als ein Maß für die phylogeographische Integrität einer Population angesehen werden, das neben anderen genetischen Parametern mit Besatzeinfluß und Umweltparametern und geographischen Einflüssen in Bezug gesetzt werden konnte.

Mit Hilfe der kanonischen Korrespondenzanalyse wurde analysiert, welche Parameter auf die gesamte genetische Varianz der Populationen Einfluß hatten.

Es stellte sich heraus, daß mehrere geographische Subregionen eine eigene genetische Integrität unabhängig vom Besatzeinfluß und anderen Umweltparametern aufwiesen. Sie sind unterscheidbar und deshalb zur Definition von ECU's geeignet. Diese ECU's beziehen sich auf Bachforellen der folgenden Einzugsgebiete: Auf Stromebene unterschieden sich die drei großen Flußsysteme Elbe, Donau und Rhein-Main signifikant. Innerhalb der Stromsysteme ließen sich signifikant das obere Donauebiet vom unteren Donauebiet, der Ilz-Einzug im Bayerischen Wald, das der Wiesent-Einzug im Maingebiet (Oberfranken), und der Rodach-Einzug im Main-Einzug des Fichtelgebirges unterscheiden. Inwieweit noch anderen Regionen spezifisch unterscheidbar waren, aber durch Besatzeinfluß soweit verfälscht sind, daß sie ihre phylogenetische Integrität verloren haben läßt sich nicht eindeutig sagen. Dennoch ist die Wahrscheinlichkeit hoch.

Dies geht aus der Analyse des Besatzeinflusses hervor, der mit der Kanonischen Korrespondenzanalyse vorgenommen wurden. Unabhängig von geographische und anderen Umweltparametern konnte mit hoher Signifikanz gezeigt werden, daß bereits mittlerer bis starker Besatzeinfluß (gemessen als Besatzeinflußwahrscheinlichkeit) zu einer Zerstörung der phylogeographischen Integrität von Bachforellenpopulationen führen kann. So waren in wahrscheinlich nicht oder kaum besetzten Gewässern die meisten Individuen ihrer eigenen Population oder einer aus dem gleichen Vorfluter zuzuordnen (zwischen 70 und 95%), aber bereits bei mittleren bis starkem Besatzeinfluß sank dieser Wert auf niedrige Werte, die bis fast auf 0% zurückgehen konnten. Dieses Ergebnis wurde durch mehrere Analysen abgesichert. Besonders erstaunlich war die Tatsache, daß diese drastischen Werte erreicht wurden, obwohl der Besatzeinfluß auf die gesamtgenetische Varianz mit etwa 8% gering ausfiel. Daraus ist zu schließen, daß bereits geringe Introgression zur großem Verlust phylogeographischer Identität führen kann. Die Konsequenzen daraus werden im Kapitel „Diskussion der erzielten Ergebnisse“ und „Empfehlungen“ behandelt.

3.3 Phylogeographie der Koppe (*Cottus gobio*) als Vergleichssystem

3.3.1 Sequenzvariation

523 bp der Kontrollregion der mt-DNA wurden von 408 Tieren sequenziert. Der untersuchte Abschnitt liegt zwischen dem Gen für die Pro-tRNA und dem Ende des konservierten Bereichs der Kontrollregion. Das Alignment aller Sequenzen, ausgenommen die der Außengruppe, ergab 46 verschiedene Haplotypen (H1-H46). Die Gesamtsequenzen aller Haplotypen sind in Anhang 8 dargestellt. Die verschiedenen Haplotypen variieren an 48 Positionen, einschließlich sechs Insertionen bzw. Deletionen („*indels*“). Das geschätzte Verhältnis von Transitionen zu Transversionen beträgt 4.02:1. Die Frequenzen der Nukleotide sind: p(A)=31%, p(C)=19,6%, p(G)=18,5% und p(T)=30,9%. Die meisten Haplotypen sind spezifisch für ein Flußsystem oder wurden oftmals nur in einem Bach gefunden. Die Verbreitung der verschiedenen Haplotypen ist in Tabelle 25 aufgelistet und in Abb. 17 visualisiert. Nur vier Haplotypen wurden in mehr als einem Strom- oder Flußsystem gefunden. H1 kommt in Populationen in der oberen Donau und in den zwei Populationen aus dem Oberrhein vor, H4 in der oberen Donau und dem unteren Rhein, H8 im Main und der unteren Donau, und H22 in der Weser und dem finnischen Tornionjoki.

3.3.2 „Median-joining network“ Analyse und geographische Verteilung der Haplotypen

Die 46 Haplotypen wurden einer „*Median-joining network*“ Analyse unterzogen, um deren phylogenetische Beziehungen und evolutionäre Geschichte darzustellen zu können. Wie aus Anhang 10 zu sehen ist, haben vier Positionen mehr als zwei Zustände. Diese wurden, wie im Methodenteil beschrieben, aus dem Datensatz entfernt. Dadurch wurden die eigentlich verschiedenen Haplotypen H36 und H39 identisch. Wie in Abb. 18 zu sehen, können die meisten Haplotypen sechs Hauptgruppen zugewiesen werden, die durch die relative Lage der Haplotypen im Netzwerk und die geographische Herkunft definiert sind.

Die Gruppe I ist die größte und heterogenste. Sie beinhaltet H1 bis H27, ohne H11 und H23, die weiter entfernt liegen. H23 wurde zusammen mit H22 und H24 in der finnischen Population gefunden und gehört zu einer Gruppe, die in Finnland sehr häufig ist (pers. Mitt. Kontula & Väniölä). Die meisten Haplotypen der Gruppe I wurden in Populationen zentraleuropäischer bzw. östlicher Regionen gefunden, die für den Vergleich mit den in dieser Studie erhobenen Bachforellendaten von Bedeutung ist. Sie stammen aus der oberen und unteren Donau, dem Main, der Elbe, aber auch aus Finnland, und dem östlichsten untersuchten unteren Rheinzufuß,

dem Giertshagener Bach (Pop-Nr. 49) (Tabelle 25). Auffallend ist, daß die Haplotypen der Arten *C. ferrugineus* aus der Timavo-Quelle (H25) und *C. petiti* aus dem Lez (H26 und H27) sehr nah zusammen liegen und erstaunlicherweise auch in die Gruppe I fallen.

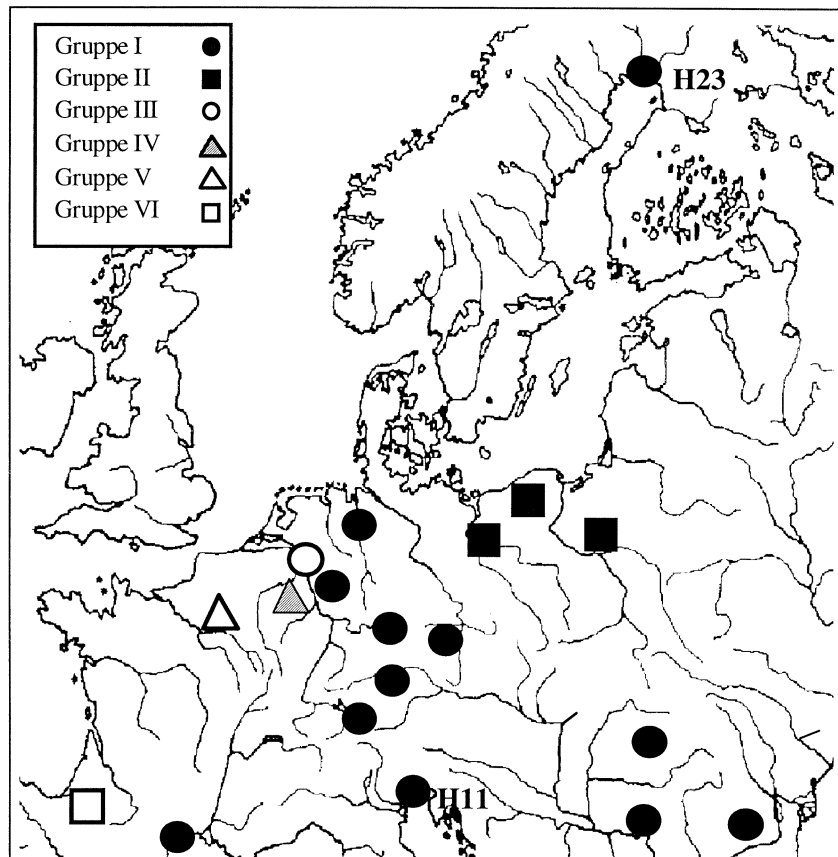


Abb. 17: Verteilung der sechs detektierten Mühlenkopfen-Haplotyp-Gruppen über Europa. Es ist deutlich zu erkennen, daß Haplotypen der Gruppe I am weitesten verbreitet sind, was der Annahme entspricht, daß sie am nächsten mit der Linie verwandt sind, die Europa ursprünglich besiedelte. H1-H6 und H12 bis H21 kamen in Bächen vor, in denen auch Bachforellen für die Analyse des Besatzeinflusses gesammelt wurden. Diese Haplotypen gehören alle zur Gruppe I. H11 und H23 sind extra aufgeführt, da sie phylogenetisch weiter von Haplotypen der Gruppe I entfernt sind.

Weil das Netzwerk (Abb. 18) der Gruppe I komplex ist, können noch weitere Strukturen erkannt werden, sobald man die Herkunft der Proben mit in Betracht zieht. Wie in Abb. 18 durch unterschiedliche Schattierungen hervorgehoben, liegen die Haplotypen aus dem Main, der oberen Donau und der Elbe jeweils zusammen. Haplotypen, die in der unteren Donau gefunden wurden, sind dagegen über das ganze Netzwerk der Gruppe I verteilt.

Tabelle 25: Beprobtte Gewässer mit Probennummern, die Flußsysteme, in denen sie liegen, Anzahl der Proben pro Gewässer (N) und Nummern der Haplotypen, die gefunden wurden. Fettgedruckt sind solche Gewässer aus denen auch Bachforellen beprobt wurden: Der Kürzel für das jeweilige Gewässer bezieht sich auf die im Bachforellen verwendeten Bezeichnungen.

Proben-No	Flußsystem	Gewässer	Kürzel	Probenzahl	Haplotypen-No
1	Obere Donau	Große Ohe	OHE	9	H1
2	Obere Donau	Erlachbach	ERL	10	H1
3	Obere Donau	Teisnach	TEI	5	H2, H3
4	Obere Donau	Wolfertsrieder B.	WOL	9	H1
5	Obere Donau	Kirnbach	KIR	8	H1, H2, H3
6	Obere Donau	Königssee	-	47	H3, H4, H5, H6
7	Obere Donau	Inn	-	4	H3
8	Obere Donau	Kohlgraben	KOH	7	H1, H3
9	Obere Donau	Mühlbach	MUH	2	H1, H3
10	Obere Donau	Wielenbach	WIE	9	H1
11	Obere Donau	Schlittbach	SLI	3	H3
12	Untere Donau	Borovo	-	8	H7
13	Untere Donau	Mures	-	9	H8
14	Untere Donau	Nera	-	8	H9, H10
15	Untere Donau	Kolpa	-	1	H11
16	Elbe	Steinselb	STE	9	H12
17	Elbe	Grenzbach	GRE	5	H12
18	Elbe	Lamitz	LAM	8	H12
19	Elbe	Höllbach	HOL	10	H12, H13
20	Elbe	Harlandbach	HAR	9	H12, H14
21	Oberrhein	Maisach	MAI	3	H1
22	Oberrhein	Kappeler Neubach	KAP	9	H1, H15
23	Main	Mucklbrunnenbach	MBB	10	H16
24	Main	Weißer Main	WEM	3	H17
25	Main	Fornbach	FRN	3	H8, H18
26	Main	Grümpel	GRU	5	H21
27	Main	Kremnitz	KRE	8	H21
28	Main	Langenaubach	LAN	5	H19
29	Main	Thiemitz	THI	9	H8, H21
30	Main	Schulmühlbach	SHU	7	H20
31	Main	Ailsbach	AIL	7	H8
32	Weser	Weser	-	1	H22
33	Timavo	Timavo	-	4	H25
34	Tornionjoki	Torninojoki	-	6	H22, H23, H24
35	Lez	Lez	-	2	H26, H27
36	Polen	Gwda	-	10	H28
37	Polen	Skrwa	-	9	H28, H29, H30
38	Polen	Slizieá	-	7	H28, H29
39	Polen	Broczynka	-	1	H28
40	Polen	Radomysi	-	9	H28
41	Polen	Radunia	-	7	H31, H32
42	Unterrhein	Krabach	-	9	H35, H39
43	Unterrhein	Düssel	-	8	H34, H36, H39
44	Unterrhein	Ottersbach	-	8	H34, H37
45	Unterrhein	Ruwer	-	9	H39
46	Unterrhein	Sieg	-	9	H34, H39, H42
47	Unterrhein	Schottel	-	10	H34, H39, H42
48	Unterrhein	Bonn	-	5	H39; H42
49	Unterrhein	Giertschagener Bach	-	16	H4, H33, H38, H39
50	Unterrhein	Neuwied	-	3	H39, H42
51	Unterrhein	Urmitz	-	1	H40
52	Unterrhein	Remagen	-	1	H41
53	Seine	Sainte Marie	-	7	H43, H44
54	Adour	Gave de Pau I	-	7	H45, H46
55	Adour	Gave de Pau II	-	6	H45, H46
56	Adour	Ouzum	-	3	H46

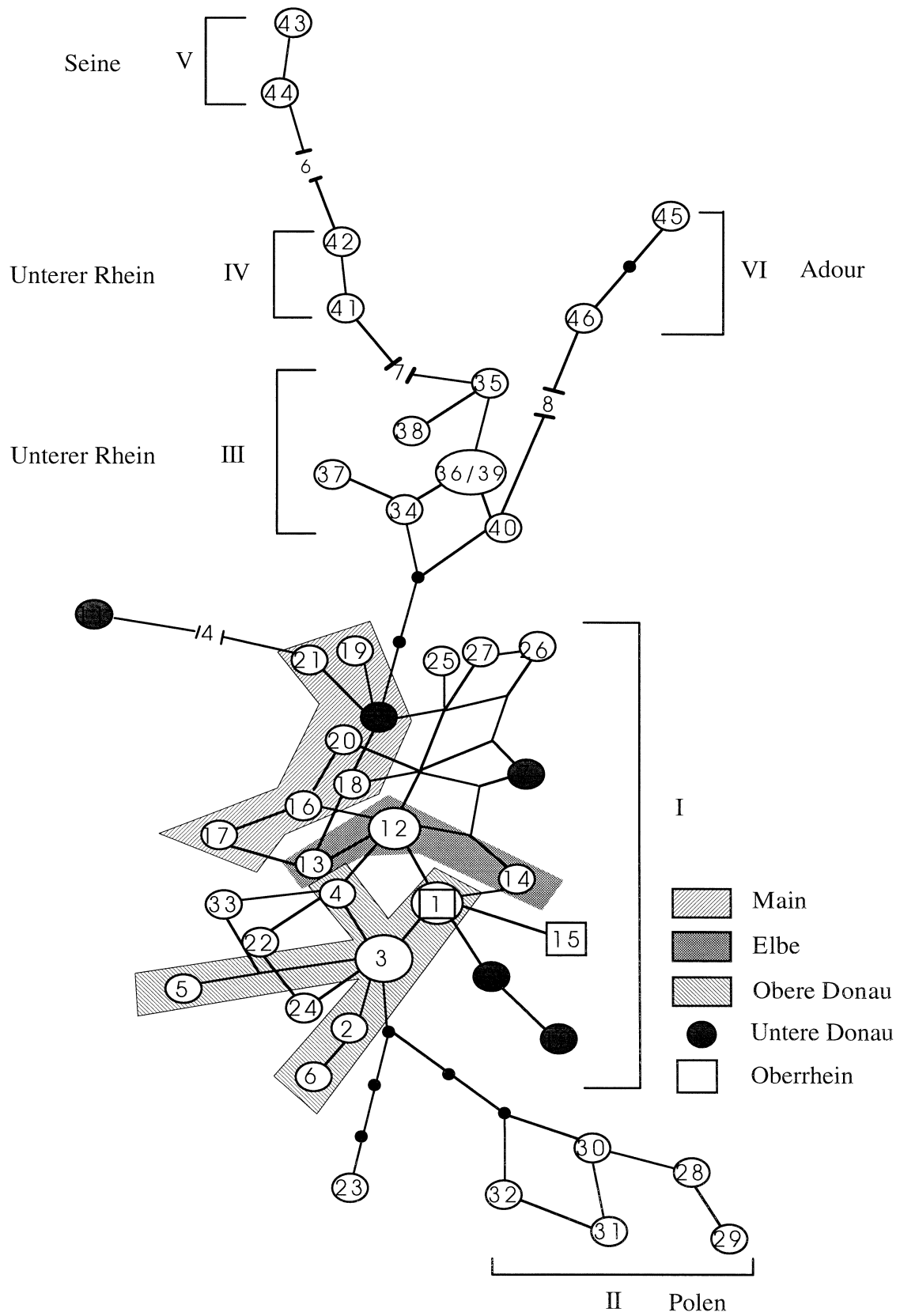


Abb. 18: "Median-joining network" von allen Mühlkoppen-Haplotypen (H1-H46). Die verschiedenen phylogenetischen Gruppen sind durch römische Zahlen gekennzeichnet. H1-H6 und H12-H21 kamen in Bächen vor, in denen auch Bachforellen für die Analyse des Besatzeinflusses gefangen wurden und gehören alle zur Gruppe I. Die Nummern beziehen sich auf diejenigen in Tabelle 26. Die Nummern in den unterbrochenen Linien entsprechen der gesamten Anzahl von Substitutionen.

Die anderen fünf Gruppen von Haplotypen (II-VI) sind jeweils auf ein kleineres Verbreitungsgebiet beschränkt. Die Haplotypen der Gruppe II (H28-H31) stammen alle aus der Oder, der Weichsel und anderen kleineren polnischen Flüssen. Die Gruppen III und IV bestehen ausschließlich aus Haplotypen aus dem unteren Rhein und seinen Zuflüssen, wobei die Gruppe IV häufiger im Rhein selbst beobachtet wurde. Die Haplotypen der Gruppe V wurden im Einzugsgebiet der Seine gefunden, die der Gruppe VI in den Zuflüssen der Adour in den Pyrenäen. Die geographische Verteilung der verschiedenen Gruppen ist in Abb. 17 gezeigt.

3.3.3 Weitere Stammbaumanalysen

Die "Neighbour-Joining" (N-J), "Maximum Parsimony" (MP) und "Maximum Likelihood" (ML) Analyse der phylogenetischen Beziehungen zwischen den häufigsten Haplotypen jeder Gruppe (H1, H3, H8, H12, H21, H28, H39, H42, H43 und H45) mit *C. poecilopus* als Außengruppe, ergab einheitliche Topologien (Abb. 19). Die statistische Unterstützung mancher Verzweigungen ist allerdings niedrig. Dennoch zeigen diese Analysen deutlich, daß die Wurzel aller Haplotypen in der Gruppe I liegt und diese somit als die phylogenetisch Älteste anzusehen ist. Haplotypen der Gruppe II und Gruppe III bis VI leiten sich von unabhängigen Ästen aus der Gruppe I ab. Obwohl die Topologien aller drei Bäume unabhängig von der angewandten Methode gleich sind, variiert die statistische Unterstützung für die verschiedenen Verzweigungen. Allgemein zeigt die MP Analyse die niedrigste Unterstützung, während die ML Analyse die höchste Unterstützung für alle Verzweigungen ergibt.

Die gleiche Topologie wurde auch gefunden wenn alle 46 Haplotypen mit der N-J Methode ausgewertet wurden (Abb. 19), wohingegen MP und ML Analysen nur einige Gruppen detektierten, aber die phylogenetischen Beziehungen zwischen den Gruppen nicht auflösen konnten (nicht dargestellt).

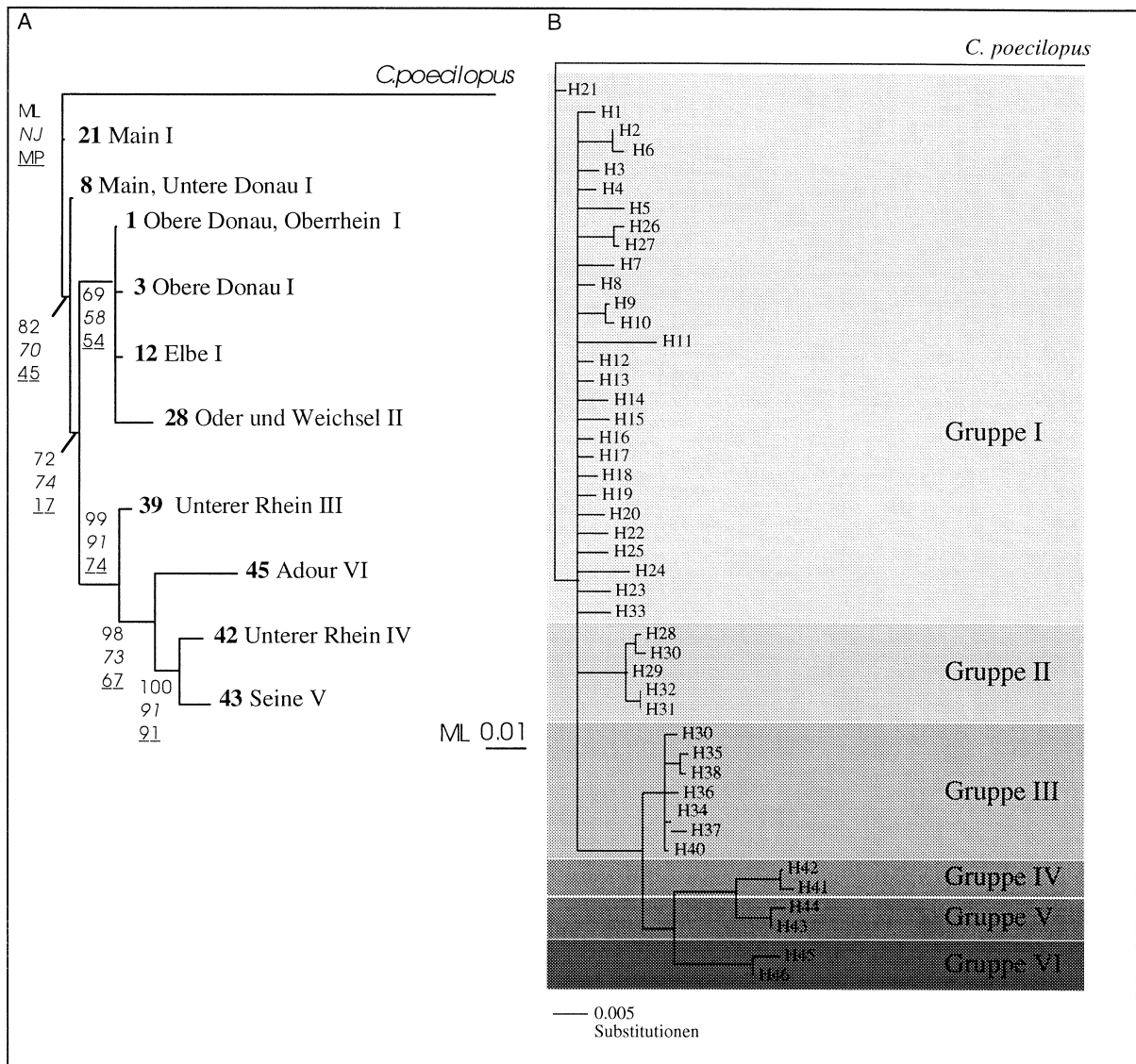


Abb. 19: (A) Maximum Likelihood, Neighbour-Joining und Maximum Parsimony Baum der häufigsten Mühlkopp-Haplotypen in jedem Flußsystem. Die statistische Unterstützung ist für jede Verzweigung angegeben (ML = standard, N-J = kursiv, MP = unterstrichen). (B) Neighbour-Joining Baum aller Haplotypen. Die Analysen zeigen, daß die Gruppe I basal zu allen anderen Gruppen steht. Die phylogenetische Beziehung zwischen den Gruppen entspricht der aus dem „Median-joining network“. Eine signifikante Auflösung innerhalb der Gruppe I ist nicht möglich.

3.3.4 Abschätzung molekularer Diversität

Die Nukleotid-Diversitäten der einzelnen Drainagen sind in Tabelle 26 aufgeführt. Die niedrigste Nukleotid-Diversität innerhalb von Flußsystemen wurde in der Elbe, der oberen Donau, dem Oberrhein, den polnischen Flüssen, dem unteren Rhein (wenn nur Gruppe III in die Berechnung einbezogen wurde), der Seine und dem Adour festgestellt.

Tabelle 26: Nukleotid-Diversität von Mühlkopp-Haplotypen innerhalb von Flußsystemen.

Flußsystem	Nukleotid-Diversität
im Bachforellenprojekt beprobte Gewässer	
Elbe	0,001033 +/- 0,000973
Obere Donau	0,001836 +/- 0,001400
Oberrhein	0,000322 +/- 0,000522
Main	0,003526 +/- 0,002282
außerhalb des Bachforellenprojektes liegende Gewässer	
Untere Donau	0,007356 +/- 0,004250
Unterer Rhein III	0,002076 +/- 0,001539
Unterer Rhein (I, III, IV)	0,009492 +/- 0,005177
Polen	0,001463 +/- 0,001217
Tornionjoki	0,006905 +/- 0,004701
Seine	0,000551 +/- 0,000751
Adour	0,001773 +/- 0,001446

3.3.5 Phylogeographische Interpretation der Ergebnisse

3.3.5.1 Altersabschätzung der Gruppen

Die durchschnittliche Evolutionsrate der mitochondriellen Kontrollregion wird oft bei 2% pro Million Jahre angesetzt, basierend auf Daten die von Säugetieren erhalten wurden (Brown et al. 1979). Diese Rate auf die Populationen von Main, Elbe und oberer Donau angewandt, ergäbe eine ungefähre Trennungszeit dieser Linien von 350 000 Jahren (mittlere paarweise genetische Distanz von 0,7%+/-0,3%). Hänfling & Brandl (1998a) schlugen allerdings in ihrer ersten Arbeit vor, daß die verschiedenen Populationsgruppen aus Main, Elbe und Donau wahrscheinlich zwischen dem Pliozän und dem Pleistozän vor ungefähr 1,6 Millionen Jahren entstanden sind. Diese Abschätzung wurde mittels eines gut datierten "river-capture" und der durchschnittlichen genetischen Distanz nach Nei (1978) durchgeführt. Unsere Linien erscheinen somit wesentlich jünger als von Hänfling & Brandl (1998a) vorgeschlagen.

Die Evolutionsrate der Kontrollregion der Mühlkoppe könnte aber durchaus von dem Wert von 2% pro Million Jahre abweichen. Durch den Vergleich der genetischen Distanzen der Haplotypen mit geologisch disruptiven Ereignissen, kann diese Vermutung begründet werden (Englbrecht et al. 2000). Aus der in dieser Publikation gemachten Abschätzung resultierte eine Evolutionsrate von 1% pro Million Jahre (mittlere paarweise Distanz von 1% \pm 0,3%).

Wendet man diese Rate auf die genetischen Distanzen zwischen den Populationen aus Main, Elbe und oberer Donau an, ergibt sich eine Trennungszeit von 700 000 Jahren, was etwas näher an die Ergebnisse der Allozym-Analysen von Hänfling et al. heranreicht. Diese Zeit fällt auch mit dem ungefähren Beginn der großen pleistozänen Klimaschwankungen zusammen. Überträgt man die Rate von 1% pro Million Jahre auf die Divergenzen zwischen den phylogenetischen Gruppen, wäre die Auftrennungszeit zwischen 1,3 (I und II) und 4,3 (II und IV) Millionen Jahren einzuordnen. Die Annahme einer geringeren Substitutionsrate als 2% pro Million Jahre wird auch durch die molekulare Struktur der Kontrollregion der Mühlkoppe unterstützt. Der hypervariable Bereich in der 5' Region ist kürzer als z.B. bei Flußbarsch und Zander.

Die Kalibrierung der Evolutionsrate ist aber dennoch problematisch. Der "*Likelihood ratio test*" hat gezeigt, daß die verschiedenen evolutionären Linien nicht mit gleicher Rate evolvierten und somit keine einheitliche "Molekulare Uhr" angenommen werden kann. So kann die geschätzte Evolutionsrate der Kontrollregion der Mühlkoppe nur mit Vorsicht angewandt werden.

3.3.5.2 Hypothese zur Verbreitungsgeschichte der Mühlkoppe

Bei einer geschätzten Evolutionsrate von 1% pro Million Jahren, die allerdings nur eine Annäherung darstellt, gelingt es dennoch ein relativ detailliertes Bild der Phylogeographie von *C. gobio* in Europa zu erstellen, setzt man die verschiedenen Informationen über die Phylogenie der Haplotypen, die geologischen Daten über das pliozäne und pleistozäne Europa und die ungefähren Zeitabschätzungen der Evolutionsraten zusammen (Abb. 20).

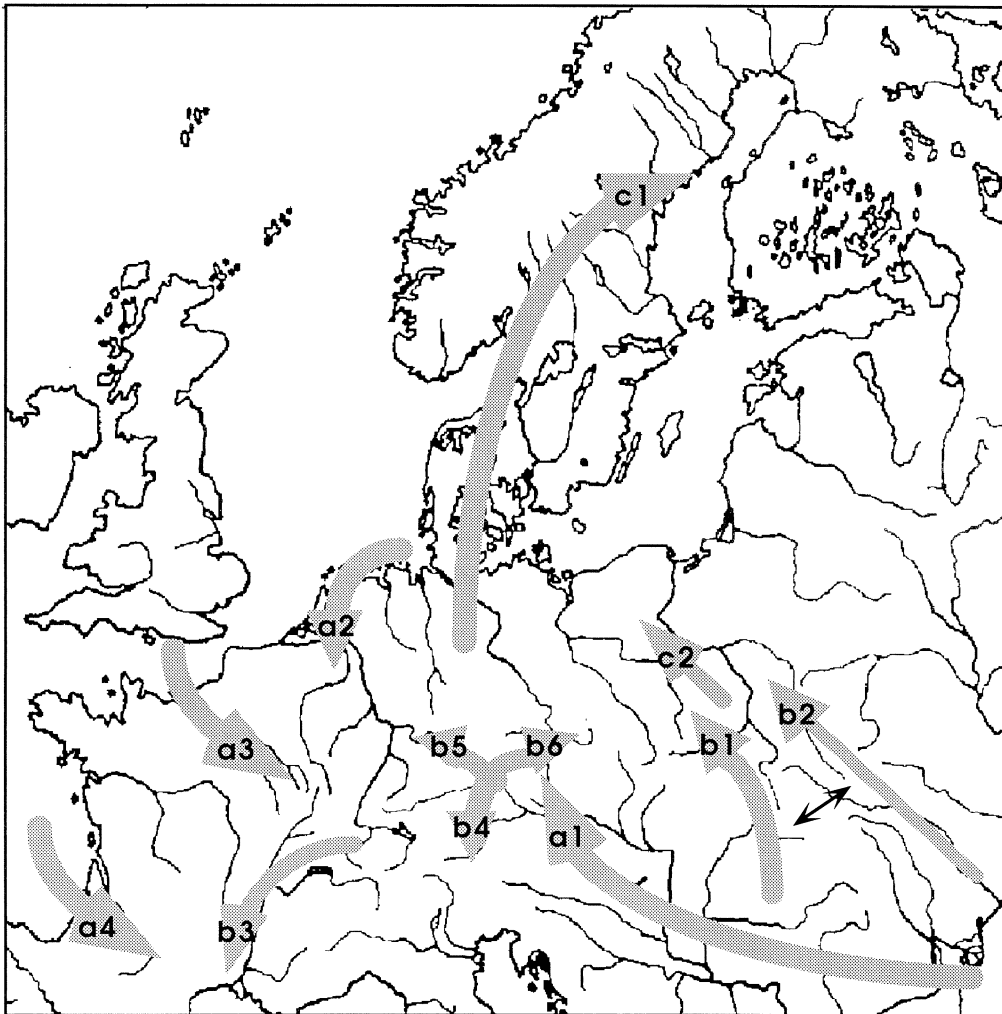


Abb. 20: Mögliche Verbreitungswege der Mühlkoppe im Pliozän (Pfeile a), im Pleistozän (Pfeile b) und im Holozän (Pfeile c). Die ursprüngliche Kolonisierung von Zentraleuropa verlief entlang Pfeil a1. Eine der anfänglichen Populationen muß die Nordküste Kontinentaleuropas erreicht haben und die weitere Kolonisierung Westeuropas ging dann von dort aus über die Wege a2 bis a4, wahrscheinlich entlang der Küstenlinien. Die Besiedelung Osteuropas fand unabhängig davon über b1 oder b2 statt. Die Wege b3 bis b6 repräsentieren die weitere Differenzierung der Gruppe I Haplotypen. Die Pfeile c1 und c2 zeigen die nacheiszeitlichen Routen der Wiederbesiedelung nach dem Rückzug des Eises.

Die phylogenetischen Analysen zeigen, daß die Haplotypen der Gruppe I die Ältesten sind. Populationen, die Haplotypen aus dieser Gruppe haben, sind auch am weitesten verbreitet. Sie kommen von der unteren Donau im Osten über ganz Zentraleuropa bis hinunter in das südwestliche mediterrane Frankreich vor. Auch in nacheiszeitlich wiederbesiedelten Flüssen, wie der Weser und dem Tornionjoki in Finnland, wurden Haplotypen der Gruppe I gefunden. Populationen mit der größten Nukleotid-Diversität kommen jedoch nur in der unteren Donau vor. Das läßt darauf schließen, daß die ursprünglichste Linie der Mühlkoppe in der Paratethys (heutiges

Schwarzes Meer und Kaspisches Meer) existierte und die Besiedelung Mitteleuropas von dort über die untere Donau begann (Abb. 20, Pfeil a1). Dieser Weg wurde auch schon für verschiedene andere europäische Fischarten vorgeschlagen (Banarescu 1990, 1991).

Haplotypen der Gruppe II leiten sich direkt von der Gruppe I ab. Es gibt zwei Möglichkeiten ihren Ursprung zu erklären. Sie entstanden entweder durch das Einwandern von Populationen aus der unteren Donau in polnische Flüsse oder sie stammen ursprünglich aus dem Dnjestr, der in das Schwarze Meer mündet (Abb. 20, Pfeile b1 und b2). Der Verbreitungsweg aus dem Schwarzen Meer über den Dnjestr nach Osteuropa wird ebenfalls für andere Fischarten vermutet (Banarescu 1990, 1991, Durand et al. 1999, Nesbø et al. 1999). Der Trennungszeitpunkt zwischen Gruppe I und II müßte ungefähr bei 1,3 Millionen Jahren liegen, wendet man die geschätzte Evolutionsrate von 1% pro Million Jahre an. Über die Geschichte der polnischen Flußsysteme ist in der Literatur nur wenig zu finden. Im Miozän war die Weichsel mit dem Dnjestr verbunden. Im Pliozän waren weite Teile des heutigen Polens durch einen flachen See bedeckt, der von Ostdeutschland bis zur Ukraine reichte (Handtke 1993). Während der pleistozänen Vergletscherungen war Polen von großen Eisfeldern bedeckt, die bis zu den Quellen der Oder und Weichsel reichten. Die Populationen, die hier untersucht wurden, können sich deshalb erst nacheiszeitlich etabliert haben (Abb. 20, Pfeil c2). Die geologischen Informationen können hier nicht helfen, eindeutig zwischen den zwei möglichen Ursprüngen der Gruppe II zu unterscheiden. Würden noch Populationen aus dem Dnjestr oder noch weiter östlich liegenden Flüssen untersucht, könnte dies aber geklärt werden.

Die Haplotypen der Gruppe III, IV, V und VI wurden nur in Populationen aus dem unteren Rhein (III und IV), der Seine (V) und dem Adour (VI) gefunden. All diese Flüsse münden in die Nordsee oder den Atlantik. Die Stammbaumanalysen zeigen, daß die Gruppe III aus dem unteren Rhein basal zu den Gruppen IV bis VI ist (Abb. 19). Deshalb scheint eine Verbreitung der Mühlkoppe von Norden nach Süden entlang der Atlantikküste wahrscheinlicher (Abb. 20, Pfeile a2 bis a4), als von Süden durch die Straße von Gibraltar nach Norden.

Das Verteilungsmuster aller evolutionären Linien ließe sich folgendermaßen erklären: Wie oben beschrieben, hat die erste Kolonisierung Europas durch die Mühlkoppe im Südosten begonnen. Die ersten Populationen trugen Vorläufer der Gruppe I Haplotypen. Vor etwa 2 Millionen Jahren erreichte eine Population über kontinentale Gewässer die Nordküste Europas (mittlere Distanz zwischen Gruppe I und III ist $0,019 \pm 0,004$). Von dort aus fand eine Kolonisierung der großen westeuropäischen Fließgewässer, wie dem Rheindelta, der Maas, der Seine, der Loire und der Adour/Garonne statt und resultierte in der Bildung getrennter evolutionärer Linien. Die Ausbreitung erfolgte entlang der Küstenlinien (Abb. 20, Pfeile a2 bis a4). Dieser Verbreitungsweg

scheint plausibel, da Mühlkoppfen in der Lage sind moderate Salzkonzentrationen zu tolerieren. Viele der heutigen Populationen sind in Flußmündungen der Ostsee und des Atlantiks zu finden, wo Brackwasser vorherrscht. Die ursprüngliche Besiedelung des nordeuropäischen Küstenraums konnte zu dieser Zeit nicht über den Rhein erfolgen, da der Oberrhein und der untere Rhein erst vor ungefähr 1 Million Jahre miteinander in Verbindung traten (Hantke 1993). Eine andere Theorie zur Verbreitung in Seine und Adour über kontinentale Gewässer anstelle einer Kolonisierung entlang der Küsten ist unwahrscheinlich, wegen vieler geologischer Barrieren bzw. Wasserscheiden. Die Seine entstand im frühen Miozän (Embelton 1984), als das Pariser Becken vom Nordsee Becken getrennt wurde, und somit der Faunenaustausch zwischen dem Rheindelta und der Seine stark eingegrenzt war (Altermann et al. 1981). Das Becken von Aquitanien, in dem die Adour liegt, verlor seine Verbindung zum Mittelmeer im späten Miozän/frühem Pliozän und wurde regelmäßig vom Atlantik überflutet, so daß ein Golf aus Brackwasser entstand. In den Studien an Bachforelle, Döbel und Flußbarsch (Bernatchez et al. 1992, Durand et al. 1999, Nesbø et al. 1999) konnte aber eine nacheiszeitliche Ausbreitung über Flüsse bis in den Westen Frankreichs gezeigt werden, so daß dieser Weg nicht ganz ausgeschlossen werden kann. Offensichtlich hat aber die Mühlkoppe mögliche kontinentale Verbreitungswege während des Pleistozäns und Holozäns nicht genutzt, da die Populationen aus dem Adour, der Seine und dem unteren Rhein genetisch sehr verschieden sind. Es bestand also über viele Jahrtausende kein Austausch zwischen diesen Populationen.

Im unteren Rhein sind Haplotypen der Gruppe III am häufigsten und kommen in jeder untersuchten Population vor. In einer Population aus dem Giertshagener Bach (Pop-Nr. 49) wurden aber auch Haplotypen der Gruppe I gefunden (H4 und H33). Haplotypen der Gruppe IV (H41 und H42) kommen an fünf Stellen (Pop-Nr. 46 bis 48, 50 und 52) vor, vier davon im Rhein und eine in einem großen Rheinzufuß, der Sieg. Nachdem Haplotypen der Gruppe III am häufigsten sind und auch in jeder Population gefunden wurden, kann diese Gruppe wahrscheinlich als ursprüngliche Linie des unteren Rheins angesehen werden. Das Vorkommen der Haplotypen der Gruppe I und IV läßt sich am einfachsten durch eine nacheiszeitliche Einwanderung dieser Tiere erklären. Haplotypen der Gruppe I wurden in einem Bach aus dem östlichen Einzugsgebiet des unteren Rheins gefunden. Das Einwandern von Tieren mit diesem Haplotyp könnte durch ein „river-capture“ eines weiter östlich liegenden Flußsystems in das Rheinsystem stattgefunden haben. Es gibt Belege für nacheiszeitliche Verbindungen von westeuropäischen Flüssen wie Maas, Schelde und Seine in das Rheintal (Kinzelbach 1990). Somit könnte das Vorkommen von Gruppe IV Haplotypen erklärt werden, die z. B. aus der Maas stammen könnten. Um diese Vermutung zu bestätigen, müßten aber noch mehr Tiere aus westeuropäischen Flüssen untersucht werden. Besonders erwähnenswert ist, daß sich die Populationen aus dem Oberrhein bzw. dem Main und dem unteren Rhein nicht vermischt haben, sondern Haplotypen aus

unterschiedlichen phylogenetischen Linien zeigen. Es ist bekannt, daß die Fauna des Rheins in vielen Fällen zwischen dem oberen und dem unteren Rhein verschieden ist (Kinzelbach 1990), wahrscheinlich aufgrund ökologischer und hydrologischer Barrieren. Dennoch bleibt es erstaunlich, daß über diese großen offenen Wasserwege keine Vermischung stattgefunden hat.

Die Weser muß postglazial von Populationen der Gruppe I wiederbesiedelt worden sein, nachdem die Gletscher abschmolzen. Eine weitere Kolonisierung Skandinaviens, wie des Tornionjoki, könnte von dort aus angefangen haben, dem weichenden Eisfeld folgend (Abb. 20, Pfeil c1). Schon Koli (1969) und Andreasson (1972) haben aufgrund morphologischer Studien an Mühlkoppen diesen Weg über die Ostsee vorgeschlagen. Während der verschiedenen Rückzugswellen der Eisfelder, war die heutige Ostsee aufgrund des abfließenden Schmelzwassers phasenweise ein riesiger Süßwassersee, der auch wenig salztoleranten Arten einen Weg zur Ausbreitung bot (Koli 1969).

Während des Pliozäns und des Pleistozäns bestanden immer wieder große Verbindungen zwischen der oberen Donau, dem Oberrhein und dem Doubs bzw. der Rhône. So konnten Populationen mit Haplotypen der Gruppe I Zugang zum südwestlichen Frankreich erhalten (Abb. 20, Pfeil b3). Auch dieser Verbreitungsweg wird für andere Arten angenommen (Persat & Berrebi 1990). Auch in das nördliche Italien muß eine Verbindung bestanden haben, da in der Timavo-Quelle auch Tiere mit Gruppe I Haplotypen gefunden wurden.

Geologische Daten bestätigen, daß Quellflüsse der Elbe bis ins Pliozän auch in die obere Donau flossen, was das Vorkommen der Gruppe I Haplotypen in der oberen Elbe erklären könnte. Der Main, der heute ein großer Rheinzufuß ist, entwässerte bis vor 600 000 Jahren in die obere Donau (Hantke 1993), womit die Existenz von Gruppe I Haplotypen im Main erklärt werden kann. Hänfling & Brandl (1998a) schlugen vor, daß die ursprüngliche Besiedelung des Rheins mit der Mühlkoppe vor 600 000 Jahren stattfand, als der Main seine Fließrichtung von der Donau in den Rhein umdrehte (Hantke 1993). Da im unteren Rhein fast nur Populationen mit Gruppe III Haplotypen gefunden wurden, muß aber die Kolonisierung des unteren Rheins durch die Mühlkoppe wesentlich älter sein.

Die Populationen aus dem Main, der oberen Donau und der Elbe teilen keine Haplotypen, obwohl manche Populationen geographisch sehr nah zusammen liegen, so z.B. Pop-Nr. 1 und 17. Weiterhin kann man sehen, daß die Haplotypen aus den verschiedenen Drainagen innerhalb des Gruppe I Netzwerks Untergruppen bilden (Abb. 20). Daraus läßt sich schließen, daß die Populationen über einen längeren Zeitraum getrennt blieben und sich nicht mit den Nachbarpopulationen vermischten. Nachdem man erwarten würde, daß über die Jahrtausende

der Klimaschwankungen viele periodische Verbindungen bestanden, ist dieser Befund sehr erstaunlich. Die unterschiedlichen Nukleotid-Diversitäten im Main (hoch), in der oberen Donau und der Elbe (niedrig), die durch einen unterschiedlich starken Einfluß der Vergletscherungen erklärt werden können, ebenso wie das Fehlen von gemeinsamen Haplotypen und die Existenz von Untergruppen, sprechen für das Entstehen von getrennten Populationen in den drei Flußsystemen noch vor oder während des Pleistozäns (Abb. 20, Pfeile b4 bis b6).

3.3.6 Eignung des Systems Mühlkoppe als unbeinflusstes Vergleichssystem für die von Besatz beeinflusste Bachforelle in Bayern

Die phylogeographische Interpretation unserer Mühlkoppenergebnisse zeichnet ein wesentlich komplexeres Bild, das durch länger zurückliegende Prozesse bestimmt ist, als bei der Bachforelle. Dieses unerwartete Ergebnis läßt die Mühlkoppe nicht als unbeinflusste "Nullprobe" für die ursprüngliche Populationsstruktur der Bachforelle erscheinen.

Der wohl bedeutendste Unterschied zwischen der Phylogeographie der Mühlkoppe und den anderen bekannten Studien liegt im Einfluß der pleistozänen Vergletscherungen auf die Populationen. Bei der Bachforelle, dem Döbel, und dem Flußbarsch wurde der Westen Europas von einer einzigen evolutionären Linie postglazial wiederbesiedelt (Bernatchez et al. 1992, Durand et al. 1999, Nesbø et al. 1999). Im Gegensatz dazu wurden bei der Mühlkoppe in westlichen Drainagen sehr unterschiedliche phylogenetische Gruppen (III bis VI) gefunden, deren Ursprung wahrscheinlich voreiszeitlich ist, und die während des Pleistozäns in dieser Region verblieben. Im Falle der Mühlkoppe kann in großen Teilen Europas ein vor- oder frühpleistozänes Muster erkannt werden, wohingegen in den anderen bekannten Phylogeographien vor allem nacheiszeitliche Besiedlungsmuster zu sehen sind. Es scheint beim Vergleich der Phylogeographien der europäischen Süßwasserfischfauna, ähnlich wie bei den bisher bekannten Phylogeographien terrestrischer Arten, daß zwar grundsätzlich Ähnlichkeiten vorhanden sind, aber dennoch auch wesentliche Unterschiede bestehen.

Dennoch sind die Ergebnisse für die komplexer als erwartete Phylogeographie der Mühlkoppe im Zusammenhang mit der Abschätzung von Schäden, die durch Besatzeinfluß in Mitteleuropa, besonders Deutschland und Bayern entstehen könnten, nicht wertlos. Zeigen Sie doch deutlich, daß auch innerhalb kleiner Regionen für Tiere, die den gleichen Lebensraum besiedeln, völlig unterschiedliche Phylogeographien bestehen können. Es kann deshalb nicht automatisch von einer Art auf die andere geschlossen werden, wenn Fragen des Besatzmanagements und einer einhergehenden Risikoabschätzung eine Rolle spielen.

3.3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

In den bisher bekannten Arbeiten über die Phylogeographie der europäischen Süßwasserfische kann man generelle Muster erkennen. (1) Eine erste Besiedelung Europas aus dem Osten über das Schwarze bzw. Kaspische Meer. (2) Der Südosten Europas als wichtiges pleistozänes Refugium und eine hohe molekulare Diversität in dieser Region. (3) Die Wiederbesiedelung von Teilen Skandinaviens aus Zentraleuropa über die Ostsee.

Die Mühlkoppen haben aber im Gegensatz zu allen anderen bisher untersuchten Arten offensichtlich in großen Teilen Europas während des Pleistozäns überlebt, so auch in Mitteleuropa und damit Deutschland und Bayern. Sie unterscheiden sich darin von anderen Fischarten dieser Region, z.B. der Bachforelle, dem Döbel und dem Barsch. Entsprechend dieser vor langer Zeit begonnenen Differenzierungsprozesse ergibt sich für die Mühlkoppe nicht nur ein von anderen Fischen unterscheidbares Bild, sondern auch eines, daß sich durch eine wesentlich feiner gezeichnete Populationsstruktur auszeichnet. Zusammen mit der geringen Migrations-tendenz der Mühlkoppen stellt sich dieses Bild als feines Mosaik eigenständiger Linien dar, wobei sogar einzelne Bäche und Bachsysteme genetisch unterscheidbare Mühlkoppenpopula-tionen aufweisen können. Eine genauere kleinräumige Untersuchung von Populationen wäre allerdings interessant und nötig, um die Mechanismen der Populationsdifferenzierung und des Erhalts von Populationsgrenzen bei Mühlkoppe besser verstehen zu können. Erst eine solche Untersuchung würde es erlauben, ECU's für die Mühlkoppe genauer zu definieren.

3.4 Phyllogeographie und Besatzeinfluß beim alpinen Seesaibling (*Salvelinus umbla*)

3.4.1 Teilweise Rekonstruktion der Besatzgeschichte der untersuchten Seen

Die größte Schwierigkeit bei der Beurteilung des Besatzeinflusses ist die schwere Rekonstruktionsmöglichkeit der Besatzmaßnahmen. Das gilt besonders für die bayerischen Voralpenseen. Da das Seesaiblingsteilprojekt nicht mit dem gleichen numerischen Aufwand betrieben werden konnte wie das Bachforellenteilprojekt, sind nur Annäherungen an die Problematik der Verfälschung lakustriner Populationen durch Besatz möglich. Die besten Informationen stammten von den lokalen Fischern und Fischereibehörden und aus der Arbeit von Hecht et al. (1992).

Grundsätzlich gilt, daß bis auf den Ammersee, den Grundelsee und den Fuschlsee die meisten Seen mehr oder weniger durch Besatz beeinflusst wurden (Jagsch, pers. Mittlg.). Die Besatzgeschichte des Königssees ist vergleichsweise gut rekonstruierbar und wurde von Hecht et al. (1992) zusammengefasst. Demnach wurde der See Ende des vorletzten Jahrhunderts mit Material einer Starnberger Aufzucht besetzt, die ihrerseits Material aus dem Fuschlsee verwendete. Während des letzten Jahrhunderts wurde der Königssee und der Obersee wiederholt mit Material des Fuschlsees und des Grundlsees besetzt. Der Grünsee wiederum wurde aus dem Königssee oder Obersee besetzt. Der autochthone Saibling des Starnberger Sees war vor ungefähr 30 Jahren fast ausgestorben und konnte erst durch intensive Besatzmaßnahmen unter anderem mit Material aus dem Vierwaldstätter See und dem deutschen Hintersee gestützt werden (Huber, pers. Mitteilung). Der Seesaibling des Hintersees, der leider im Rahmen der vorliegenden Studie nicht untersucht werden konnte, stellt eine mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Besatz verfälschte Mischpopulation dar, die mit einem hohen Anteil Seesaiblinge aus dem Grundelsee besetzt wurde (Jagsch & Hass, pers. Mitteilung). Der Bodensee wurde wiederholt aus verschiedenen Quellen besetzt (Hartmann 1984).

3.4.2 Deskriptive genetische Daten

3.4.2.1 Mitochondriale Diversität

Die Kontrollregion von 122 Seesaiblingen wurde untersucht. Insgesamt wurden 225 bp des 3'-Bereichs zwischen dem "conserved sequence block II" (CSBII) und dem Gen für die Phe-t-RNA sequenziert. Der Vergleich der Sequenzen ergab, daß 17 verschiedene Haplotypen existieren, die sich an 14 variablen Positionen unterscheiden, einschließlich Insertionen bzw. Deletionen. In

Tabelle 27 sind die 17 Haplotypen nur mit den variablen Positionen und den absoluten Häufigkeiten, in denen sie gefunden wurden, dargestellt. Die Gesamtsequenzen der Haplotypen im Vergleich zu Sequenzen des Seesaiblings aus Norwegen und Nordamerika, ebenso wie des Bachsaiblings aus Nordamerika sind im Anhang 9 abgebildet. Die Basenhäufigkeit ist: $p(A)=37,2\%$ $p(C)=25,4\%$ $p(G)=10,4\%$ und $p(T)=27\%$. Das geschätzte Verhältnis von Transitionen zu Transversionen liegt bei 6,03:1.

Tabelle 27: Übersicht über die 17 im Rahmen der Studie detektierten Seesaiblings-D-Loop-Haplotypen repräsentativer Tiere (225 Basenpaare) mit ihren 14 variablen Positionen. Punkte unterhalb der Nukleotide für Haplotyp H.1 kennzeichnen eine identische Base des jeweiligen Haplotyps an dieser Stelle. Ein Bindestrich (-) bedeutet dass an der homologen Stelle bekannter Sequenzen eine Deletion vorliegt, die Position also verloren gegangen ist. Das "n" gibt an wie häufig die jeweilige Häufigkeit insgesamt detektiert worden ist.

mt-DNA Typ	Position														n
	7	9	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	
	3	6	4	3	4	2	4	5	7	1	7	8	9	0	
H1	T	A	G	A	T	G	A	T	C	G	A	-	-	C	51
H2	A	24
H3	.	-	.	.	.	A	2
H4	A	-	.	C	.	1
H5	A	.	.	T	.	.	.	-	.	1
H6	.	-	G	-	6
H7	C	.	5
H8	A	.	.	.	-	3
H9	.	.	A	3
H10	.	-	G	.	C	1
H11	G	C	.	17
H12	A	1
H13	G	C	C	.	3
H14	C	1
H15	G	1
H16	.	.	.	-	-	1
H17	.	T	.	.	.	A	2

In Tabelle 28 ist aufgelistet, welche Haplotypen in den einzelnen Populationen gefunden wurden. Der häufigste Haplotyp H1 kommt, außer im Ammersee und im Grundlsee, in allen Populationen vor. Der Ammersee nimmt eine Sonderstellung ein, da ausschließlich H2-H5 gefunden wurden, die sonst in keinem See beobachtet wurden. H1 tritt insgesamt nicht nur am häufigsten auf, sondern liegt auch zentral im Netzwerk. Bis auf H4 und H16 sind alle Haplotypen im Netzwerk nur einen Schritt vom nächsten benachbarten Haplotypen entfernt. In den meisten Seen wurden zusätzlich zu H1 Haplotypen gefunden, die jeweils exklusiv in einem oder zwei benachbarten Seen vorkommen. So wurde H6 nur im Fuschl- und Grundlsee, H7 nur im Heiterwanger See und Plansee und H11 nur im Königssee und Obersee beobachtet, wobei H11 den häufigsten

Haplotyp im Königssee repräsentiert. In dem, dem Königssee und Obersee nah benachbarten Grünsee dagegen, kommt, ebenso wie im Starnberger See, nur H1 vor.

Tabelle 28: Anzahl der Tiere, die in jedem See untersucht wurden (N_{alle}) und mt-Haplotypen, die innerhalb der Seen gefunden wurden. * bedeutet, daß jeweils ein Wildfangsaibling mit diesem Haplotyp gefunden wurde. Anzahl der Tiere, die in jedem See untersucht wurden (N_{alle}) und mt-Haplotypen, die innerhalb der Seen gefunden wurden. * bedeutet, daß jeweils ein Wildfangsaibling mit diesem Haplotyp gefunden wurde.

See	N_{alle}	Haplotype-No																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Ammersee	28		24	2	1	1												
Bodensee	11	8							3									
Heiterwanger See	5	2						2		1								
Plansee	5	2						3										
Fuschlsee	8	6					1			1								
Grundlsee	6						4			1	1							
Starnberger See	8	8																
Grünsee	15	15																
Königsee	27	5										14*		3*	1	1	1	2
Obersee	9	5										3*	1*					

3.4.2.2 Phylogenetische Analyse der mitochondrialen Haplotypen

3.4.2.2.1 „Median-joining network“ Analyse

Die 17 mitochondrialen Haplotypen wurden einer „Median-joining network“ Analyse unterzogen, um die innerartlichen phylogenetischen Beziehungen darstellen zu können. Alle variablen Positionen gingen in diese Auswertung ein. Das resultierende Netzwerk ist in Abb. 21 gezeigt. Die Größe der Kreise bezieht sich auf die Häufigkeit der Haplotypen.

Die Haplotypenverteilung im Ammersee mit dem sehr häufigen H2, der sonst in keinem See gefunden wurde, könnte für einen historischen *"bottleneck"* in dieser Population sprechen, einer drastischen Verkleinerung der Population, resultierend in dem Verlust der ursprünglichen genetischen Variabilität. Diese Hypothese würde auch durch die Tatsache unterstützt, daß im Ammersee die niedrigste Heterozygotie von allen Populationen beobachtet wurde. Eine Ursache für eine Verringerung der Populationsgröße könnte die Verschmutzung des Ammersees in diesem Jahrhundert sein (vor der Errichtung eines Ringkanals 1971), als zeitweise nicht mehr von der Existenz eines Saiblingsbestandes ausgegangen wurde. Dennoch erscheint diese Interpretation unwahrscheinlich, weil die Einzigartigkeit des Ammerseesaiblings nicht nur molekular sondern auch morphologisch gegeben ist, da er dem Typus des „Tiefseesaiblings“ entspricht. Er scheint also eine lange eigenständige Entwicklung hinter sich zu haben und repräsentiert mit hoher Wahrscheinlichkeit eine neue unbeschriebene Art.

Es wurden aber auch andere Haplotypen gefunden, die spezifisch für einen oder zwei benachbarte Seen waren. Wegen der geringen Anzahl von untersuchten Tieren für manche Seen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß diese Haplotypen auch noch in mehreren Seen gefunden werden könnten. Dennoch scheint es nicht zufällig, daß H7 nur in Plansee und Heiterwanger See, H6 nur in Grundlsee und Fuschlsee und H11 nur in Königssee und Obersee gefunden wurden (Tabelle 27).

H1 kam fast in jeder Population vor und nahm im Netzwerk eine zentrale Position ein, was darauf hinweist, daß dies der ancestrale Haplotyp ist. Dieses Muster läßt eindeutig auf einen jüngeren nacheiszeitlichen Ursprung der alpinen Saiblingspopulationen schließen und nicht auf ein Überleben von Populationen in verschiedenen pleistozänen Refugien. Das Vorkommen von „privaten“ Haplotypen spricht aber auch für reduzierten Genfluß zwischen den Populationen, oder auch für genetische *"bottlenecks"*.

2.4.2.3 Diversität auf Mikrosatellitenenebene

Die eingesetzten Mikrosatellitenmarker zeigten eine hohe Variabilität (Tabelle 29). Die Anzahl der Allele über alle Populationen lag zwischen 15 (Sa72ZIM) und 37 (Mst-85). Die mittlere Anzahl von Allelen pro Population lag bei 6 im Grünsee und 14 im Königssee. Im Heiterwanger See und Obersee wurden zwar weniger Allele gefunden, doch war hier die Probengröße nicht repräsentativ. Die Genotypen, ebenso wie die Frequenzen der Allele pro Locus sind für jede Population in Anhang 9 bzw. 10 abgebildet.

Tabelle 29: Anzahl der Allele pro Locus über alle Seesaiblings-Populationen, pro Locus pro Population, mittlere Anzahl der Allele pro Population (m) und Anzahl der untersuchten Tiere pro Population (N). Grau unterlegt sind die beiden Populationen, die in manchen Berechnungen wegen niedriger Stichprobengröße nicht miteinbezogen wurden.

Locus	Allele pro Locus	Sta	Grd	Fus	Pla	Hei	Amm	Bod	Kos	Obe	Grn
MST-85	37	20	19	12	25	7	9	24	19	4	5
SFO-8	31	15	10	14	15	7	13	18	16	6	6
Ssa-85	23	9	9	7	7	5	11	12	15	5	6
Sa72ZIM	15	4	6	4	6	3	5	8	9	4	4
CoCl-3	22	11	11	5	8	4	9	5	16	7	8
SSOSL-85	20	13	12	8	12	4	13	13	9	8	7
N		29	30	30	40	8	28	31	85	7	20
m		12	11.2	8.3	12.2	5	10	13.2	14	5.7	6

Für alle Seen wurden die beobachteten und erwarteten Heterozygotien berechnet und auf signifikante Unterschiede und somit auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht getestet. In Tabelle 30 sind die Ergebnisse für jede Population an jedem Locus aufgeführt, ebenso wie über alle Loci. Die mittlere Heterozygotie innerhalb von Populationen liegt zwischen 0,59 im Ammersee und 0,82 im Grundlsee. Nach sequentieller Bonferroni-Korrektur zeigte sich, daß nur die Genotypenverteilung am Locus SFO-8 im Bodensee signifikant vom H-W Gleichgewicht abweicht ($p=0,05$). Alle anderen beobachteten Heterozygotien weichen nach Bonferroni-Korrektur nicht signifikant von den Erwartungswerten ab. Der Test auf Kopplungsungleichgewicht ergab keine Anzeichen für Kopplung.

3.4.2.3.1 Paarweise Populationsvergleiche mittels Varianzanalyse

Das Maß der Populationsdifferenzierung zwischen allen Seen wurde mit dem Programm FSTAT27b berechnet. In Anhang 11 sind die Theta-Werte für die paarweisen Populationsvergleiche aufgelistet. Die Signifikanz dieser Werte wurde durch 10 000 Permutationen über Genotypen ermittelt. Der sehr niedrige Theta-Wert von 0,001 zwischen den Populationen aus dem Plansee und dem Heiterwanger See war nicht signifikant. Die Signifikanzen der meisten Vergleiche zwischen den anderen Seen waren ohne Bonferroni-Korrektur bei $p=0,0001$, zwischen Königssee und Obersee bei $p=0,006$ und zwischen Grünsee und Obersee bei $p=0,017$. Nach der einfachen Bonferroni-Korrektur sind die Vergleiche, die vorher bei $p=0,0001$ signifikant waren, nur mehr auf dem Niveau $p=0,01$ signifikant. Die Theta- Werte aus den Vergleichen zwischen Königssee und Obersee bzw. Grünsee und Obersee sind nicht mehr signifikant.

Tabelle 30: Beobachtete (H_o) und erwartete (H_e) Heterozygotien pro Locus und pro Population und über alle Loci (H_m) mit den Signifikanzen (p) der Abweichung vom H-W Gleichgewicht. P -Werte $\leq 0,05$ sind grau schattiert. Nach sequentieller Bonferronikorrektur weicht nur noch der Locus SFO-8 im Bod auf dem Niveau $p=0,05$ signifikant von der erwarteten Heterozygotie ab.

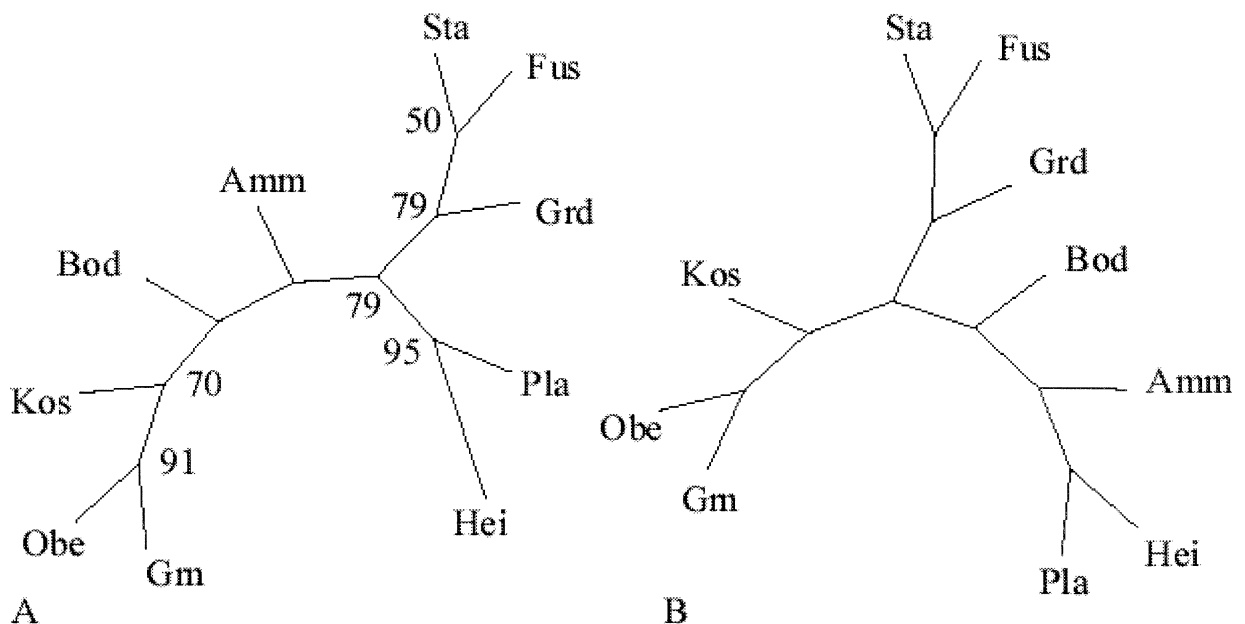
Locus		Amm	Bod	Fus	Grd	Sta	Kos	Obe	Grn	Pla	Hei
Mst-85	H_o	0,6786	0,8333	0,9	0,9667	0,9655	0,6	0,3956	0,65	0,95	0,8667
	H_e	0,6831	0,9424	0,8616	0,9192	0,9141	0,6588	0,4286	0,6551	0,9247	0,8750
	p	0,482	0,010	0,894	0,872	0,737	0,058	1	0,908	0,587	0,959
Sfo-8	H_o	0,8519	0,8899	1	0,8621	0,8966	0,7976	0,8022	0,8	0,6923	0,8667
	H_e	0,898	0,9231	0,822	0,8113	0,8996	0,8371	1,0000	0,8026	0,8468	0,8750
	p	0,236	0,0003	0,099	0,119	0,521	0,38	0,747	0,050	0,0066	0,238
Ssa-85	H_o	0,6923	0,6774	0,7	0,7667	0,6897	0,8235	0,5934	0,7	0,7179	0,5333
	H_e	0,7398	0,7393	0,7689	0,7119	0,6685	0,8573	0,5714	0,7538	0,6817	0,5000
	p	0,319	0,295	0,289	0,471	0,856	0,597	0,660	0,173	0,996	0,286
CE-72	H_o	0,2273	0,6452	0,3667	0,6667	0,7241	0,6341	0,4945	0,35	0,7	0,6583
	H_e	0,2548	0,7007	0,3994	0,6554	0,6431	0,6792	0,4286	0,3538	0,6772	0,7500
	p	0,323	0,291	0,324	0,719	0,154	0,680	0,441	0,226	0,349	0,776
CoCI-3	H_o	0,4231	0,5806	0,3793	0,8519	0,75	0,6747	0,8462	0,8	0,575	0,4417
	H_e	0,491	0,5605	0,3624	0,8407	0,7487	0,7176	1,0000	0,8038	0,5528	0,5000
	p	0,124	0,485	0,759	0,229	0,354	0,022	0,957	0,590	0,095	1,0
SOSSL-85	H_o	0,6957	0,8333	0,6	0,8333	0,7586	0,7143	0,8681	0,7	0,775	0,5250
	H_e	0,7816	0,8559	0,7102	0,8559	0,7132	0,7522	0,7143	0,7564	0,7139	0,6250
	p	0,263	0,020	0,263	0,042	0,066	0,365	0,319	0,101	0,819	1,0
H_m	H_o	0,5948	0,7431	0,6577	0,8245	0,7974	0,7074	0,6667	0,6667	0,735	0,6486
	H_e	0,6414	0,787	0,6541	0,799	0,7645	0,7504	0,6905	0,6876	0,7329	0,6875
	p	0,204	0,0001	0,383	0,192	0,336	0,086	0,942	0,106	0,106	0,918

Weiterhin zeigte die Auswertung, daß 11,7% der Gesamtvarianz auf Unterschiede zwischen den Populationen zurückzuführen sind. Dagegen basieren nur 1,7% der Gesamtvarianz auf Unterschiede innerhalb der Populationen. Innerhalb von Individuen ist die mittlere Varianz der Allelfrequenzen am höchsten und beträgt 86,5%, was gleichbedeutend mit einem niedrigen Inzuchtskoeffizienten ist. Wurde die gleiche Berechnung nur mit den Populationen des Donauraums durchgeführt, d.h. ohne die des Bodensees, veränderten sich alle Werte geringfügig. Die relative Varianz zwischen den Populationen steigt auf 12,3%, die anderen Varianzen verminderten sich (1,3 und 86,2%).

Aus den Theta-Werten und den Distanzen der Allelfrequenzen wurden Dendrogramme berechnet. Diese sind in Abb. 22 dargestellt. Der Baum aus den Allelfrequenzen (links) zeigt, daß Plansee und Heiterwanger See, ebenso wie Königssee, Obersee und Grünsee, und Grundlsee, Fuschlsee und Starnberger See mit relativ hoher statistischer Unterstützung zusammenfallen. Die "bootstrap"-Werte (siehe Methodenteil) liegen zwischen 70 und 95. Die hier dargestellten Positionen der Verzweigungen des Bodensees und des Ammersees treten aber in weniger als 50% der "bootstrap"-Replikate auf.

Das Dendrogramm aus den Theta-Werten (Abb. 22 rechts) ähnelt in wesentlichen Punkten der Topologie aus der Berechnung der Distanzen der Allelfrequenzen. Dieselben Gruppen werden gebildet, aber die Gruppe Grd/Sta/Fus zweigt nicht zwischen Pla und Amm ab, wie in links in der Abbildung, sondern zwischen Kos und Bod.

Abb. 22: Dendrogramme auf der Basis paarweiser Populationsvergleiche auf der Grundlage der Mikrosatelliten-Diversität. Links abgebildet ist die Topologie, die sich aus den reinen genetischen Distanzwerten der Allelfrequenzen ergibt; rechts abgebildet ist der Baum aus den theta-Werten der F-Statistik (Erklärung siehe Text).



3.4.2.3.2 Selbstklassifikationsanalysen

In den Selbstklassifikationstests wurde ein unterschiedlicher Prozentsatz von Individuen ihrer „eigenen“ Population zugeordnet (Tabelle 31). Die höchsten Werte wurden für den Grünsee (100%), die niedrigsten für den Bodensee ermittelt. Die bei den Seesaiblingsindividuen durchgeführten Simulation jedoch ergaben nur relativ niedrige Wahrscheinlichkeiten für eine korrekte Zuordnung ($p < 0,05$). Nachdem probenhalber solche Individuen entfernt wurden, wurde die höchste Rate für korrekte Selbstklassifikation beim Königssee (85%) gefunden, während die niedrigste nach wie vor beim Bodensee lag. Der Unterschied zwischen den Werten vor und nach dem Ausschluß der entsprechenden Individuen war am größten für die Population Grünsee, Grundelsee, Fuschlsee und Bodensee (35 – 36,6%). Der niedrigste Widerspruch ergab sich für den Königssee. Trotz der Tatsache, daß ein größerer Teil der Individuen nicht korrekt zugeordnet wurden, wurden diese nur selten einer anderen Population mit großer Wahrscheinlichkeit zugeordnet (Tabelle 31).

Tabelle 31: Zuordnung (Selbstklassifikation) einzelner Individuen zu der Population, aus der sie entnommen wurden (Baysean-Methode mit dem Programm GENECLASS). Aufgelistet sind: Prozentsatz der Individuen pro Population, die direkt zur Ursprungspopulation zugeordnet wurden, Prozentsatz der Individuen einer Population, deren Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zu ihrer Ursprungspopulation $>5\%$, $<5\%$ und $<1\%$ ist. Zu anderen Seen = Anteil der Individuen einer Population, der zu einer anderen Population eines anderen Sees mit einer höheren Wahrscheinlichkeit ($p < 5\%$) zugeordnet wurde. Klassifikation N: Klassifikationstests von Individuen aus dem Heiterwanger und Obersee. Zahlen geben Klassifikation an. In Klammern: Anzahl Individuen, die auf dem ** = $p < 1\%$ und * = $p < 5\%$ NICHT vom jeweiligen See zugeordnet wurden.

Zuordnung in %	Amm	Bod	Fus	Grd	Sta	Kos	Grn	Pla
direkt	87	76	96	93	79	95	100	82
$p > 5\%$	62,5	40	60	56,7	62	81	65	65
$p < 5\%$	8,3	16,7	23,3	13,3	10,4	9,5	20	17,5
$p < 1\%$	29,2	43,3	16,7	30	27,6	9,5	30	17,5
zu anderen Seen	0	6,6	3,3	3,3	3,4	3,6	0	12,5
Heiterwanger See zu Obersee zu						4	3 (1*)	7 (1**)

Die Selbstklassifikationsanalyse für die wenigen Individuen des Heiterwanger und des Obersees zeigte, daß sie jeweils am ehesten ihrer benachbarten Population (Plansee und Königssee beziehungsweise Grünsee) zugeordnet wurden. Trotz der Tatsache, daß eine größere Anzahl

von Individuen mit statistischer Sicherheit nicht ihrer eigenen Population zuzuordnen waren, wurden von diesen nur wenige mit hoher Wahrscheinlichkeit einer anderen zugeordnet (Tabelle 31). Die Klassifikationsanalyse für die wenigen Individuen des Heiterwanger und Obersees zeigten, daß sie den geographisch benachbarten Populationen Plansee und Königssee/Grünsee am ähnlichsten sind (Tabelle 31 unten).

3.4.3 Phylogeographische Interpretation und Diskussion der Mikro-satellitenergebnisse

Die Dendrogramme der Theta-Werte und der Distanzen aus den Allelfrequenzen zeigen eine sehr ähnliche Topologie und gruppieren die Seen zum Teil nach ihren geographischen Lagen. So fallen der Königssee, der Obersee und der Grünsee zusammen. Die Theta-Werte zwischen Obersee und Königssee bzw. Grünsee sind nicht signifikant. Der Königssee und der Obersee liegen nebeneinander und sind auch über einen Bach verbunden, wodurch Genfluß zwischen den Populationen möglich ist. Außerdem läßt sich dieses Ergebnis auch durch Besatz erklären (siehe unten). Der alpine Grünsee hat keinen auf natürlichem Wege eingewanderten See-saiblingsbestand. Die Saiblingsbestände in hochalpinen Seen etablierten sich wahrscheinlich erst nach künstlichen Besatzmaßnahmen, die teils schon im Mittelalter durchgeführt wurden (Pechlaner 1984).

Der Vergleich zwischen dem Plansee und dem Heiterwanger See zeigt einen sehr niedrigen (0,001) und nicht signifikanten Theta-Wert, was bedeuten würde, daß noch Genfluß zwischen diesen Populationen besteht. Obwohl die Probengröße aus dem Heiterwanger See zu gering ist, könnte man davon ausgehen, daß dieses Ergebnis realistisch ist, da die Vergleiche des Heiterwanger Sees mit allen anderen Populationen wesentlich höhere Theta-Werte ergaben. Die Möglichkeit für Genfluß zwischen den beiden Populationen besteht theoretisch über einen künstlichen Kanal, der die Seen verbindet. Die Stichprobenzahl müßte aber erhöht werden, um dies genauer festzustellen.

Die Dendrogramme zeigen auch eine Verwandtschaft zwischen dem Grundlsee und dem Fuschlsee, aber ebenso beider Seen mit dem Starnberger See. Da der Fuschlsee und der Grundlsee in demselben Einzugsgebiet des Flusses Traun liegen, ist die genetische Ähnlichkeit zwischen den Populationen aus diesen beiden Seen erklärbar. Die Verwandtschaft mit dem Starnberger See, läßt sich aber offensichtlich nicht durch die geographische Nähe, sondern am ehesten durch Besatzmaßnahmen begründen (siehe unten).

Weder der Bodensee noch der Ammersee gruppieren mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einem der anderen untersuchten Seen. Der Bodensee liegt im Einzugsgebiet des Rheins und nicht der

Donau. In der Studie von Brunner et al. (1998) wurden ebenfalls Saiblinge aus Seen des Alpenraums untersucht. Diese Arbeit schloß den Ammersee, den Königssee und den Grundlsee aus dem Donaauraum, zwei Fangorte aus dem Bodensee, darunter auch den Überlinger See und noch weitere Seen aus dem Rhein- und Rhône-Einzug ein. Die Mikrosatellitenmarker, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, entsprachen weitgehend denen aus der vorliegenden Arbeit. Dennoch können die Rohdaten nicht direkt verglichen werden, da Brunner et al. (1998) radioaktiv markierte Primer einsetzten. Ihre Auswertungen zeigten jedoch deutlich, daß Populationen aus dem Donau- und dem Rhein-Einzug voneinander verschieden sind. Dieses Ergebnis ließ sich mit den hier vorliegenden Daten bestätigen, da alle Theta-Werte aus dem Vergleich zwischen dem Bodensee und den anderen Seen signifikant verschieden von null sind. Brunner et al. (1998) führten ebenfalls eine hierarchische Varianzanalyse durch, wobei zwischen Populationen aus verschiedenen Einzugsgebieten, zwischen Populationen innerhalb von Einzugsgebieten und innerhalb von Populationen unterschieden wurde. Sie zeigten, daß 19,2% der Gesamtvarianz auf Unterschiede zwischen Populationen innerhalb von Einzugsgebieten zurückzuführen sind. In dieser Studie liegt die Varianz zwischen Populationen aus dem Donaauraum bei 12,3% und ist somit niedriger als die von Brunner et al. (1998) beobachtete. Erstaunlicherweise ist die Varianz zwischen Populationen niedriger, wenn der Bodensee in die Analyse eingeschlossen wird (11,7%). Der Grund dafür könnte sein, daß im Bodensee eine hohe mittlere Anzahl von Allelen über alle Loci gefunden wurde. Das ließe sich dadurch erklären, daß die Population im Bodensee sehr groß ist. Nach Brunner et al. (1998) gilt der Bodensee als nicht besetzt. Es ist aber bekannt, daß in diesen See Fremdmaterial aus zahlreichen anderen Quellen eingeführt wurde (Hartmann 1984). Dies könnte also auch erklären, warum dort eine relativ hohe mittlere Anzahl von Allelen gefunden wurde.

Die Analyse der Populationsstruktur basierend auf sechs Mikrosatellitenmarkern zeigte deutlich, daß zwischen den Seen aus dem Donaeinzugsgebiet eine Substruktur besteht und teilweise geographisch benachbarte Seen genetisch näher miteinander verwandt sind, als weit auseinander liegende Populationen. Dieses Ergebnis bestärkt noch die Schlußfolgerungen von Brunner et al. (1998), bei denen allerdings im Donaauraum nur drei weit auseinander liegende Populationen untersucht wurden und läßt vermuten, daß Besatzmaßnahmen auf viele Populationen eventuell keinen großen Einfluß hatten.

3.4.4 Vergleich der Ergebnisse aus der Mikrosatelliten- und mt-DNA-Analyse

Brunner et al. (1998) fanden eine große Diskrepanz zwischen ihren Ergebnissen aus der Mikrosatellitenanalyse, die eine bedeutende genetische Differenzierung zwischen den Saiblingspopulationen zeigte, und denen aus der RFLP Analyse der mt-DNA, in der sich alle Tiere als

monomorph erwiesen. Sie schlossen daraus, daß Abschätzungen von Populationsdifferenzierungen mit den momentan verfügbaren molekularen Markern vorsichtig interpretiert werden sollten. Die hier durchgeführte Mikrosatellitenanalyse zeigte, wie bei Brunner et al. (1998), eine deutliche Differenzierung zwischen Populationen und eine nähere Verwandtschaft zwischen benachbarten Seen. Allerdings wurde hier auch in der Kontrollregion der mt-DNA Variabilität gefunden und die Verteilung der verschiedenen Haplotypen widerspricht den Ergebnissen der Mikrosatellitenanalyse nicht, sondern ergänzt sie nur. Auch hier teilen benachbarte Seen „private“ Haplotypen und scheinen so näher verwandt, als weit auseinander liegende Seen. Die Analyse der mt-DNA zeigt aber auch den holozänen Ursprung der Populationen und belegt, daß sich die genetische Differenzierung zwischen Seen, die mittels Mikrosatelliten gezeigt werden konnte, in den letzten 12 000 Jahren entwickelt hat.

3.4.5 Der Einfluß von Besatzmaßnahmen auf die phylogeographische Integrität

Die Analyse der genetischen Varianz zeigte für fast alle Populationen, daß sie sich signifikant voneinander unterscheiden. Allerdings wiesen die Selbstklassifikationstests auf eine beträchtliche Fraktion von Individuen hin, die mit hoher statistischer Wahrscheinlichkeit weder ihrer eigenen Population noch einer anderen zugeordnet werden konnten. Diese Ergebnisse implizieren, daß es zu keiner Introgression von allochthonem Genmaterial durch bekannten Besatz gekommen ist oder, daß das Besatzmaterial aus nicht untersuchten Populationen kam.

Eine Ausnahme mag bezüglich der Selbstklassifikationstests der Bodensee darstellen, der wiederholt besetzt wurde und die niedrigsten Zuordnungswerte (40% statt der sonst 60 bis 80%). Von diesen wurden lediglich zwei Tiere zu anderen von uns untersuchten Seen zugeordnet, was die geringe genetische Verwandtschaft danubischer und rhenanischer Population widerspiegeln mag (Brunner et al. 1998). Diese niedrigen Zuordnungswerte könnten in der Tat bedeuten, daß das Material bereits stark durch Besatz genetisch verfälscht ist. Wegen der schlechten Informationslage läßt sich diese Hypothese aber schlecht absichern.

Die Etablierung einer neuen Population im Grünsee mit Tieren aus dem Königssee oder Obersee war auch genetisch nachvollziehbar, wobei sich die fehlende mitochondriale Haplotypendiversität auf eine kleine Anzahl Gründerindividuen zurückführen läßt.

Die Gruppierung des Starnberger Sees mit dem Grundlsee und Fuschlsee entspricht nicht ihrer geographischen Nähe, und läßt sich am ehesten wie folgt interpretieren: Der Seesaibling des Hintersees ist eine mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Besatz verfälschte Mischpopulation, die mit einem hohen Anteil Seesaiblingen aus dem Grundlsee besetzt wurde. Die Population des

Starnberger Sees war vor ihrem fast völligen Aussterben mit Material aus dem Fuschlsee besetzt, das sich eventuell auch schon in der Population manifestiert hatte. Als die Starnberger Population dann mit Grundlsee-verfälschten Hinterseematerial nach ihrem fast völligen Aussterben besetzt wurde, könnte es zu einer Unterstützung der bereits genetisch verfälschten Restpopulation durch einen hohen Anteil von Grundlsee-verfälschten Hinterseetieren gekommen sein. Die Frage ließe sich aber endgültig nur mit Vergleich konservierten alten Starnberger Materials und der Untersuchung der Hinterseepopulation klären.

Eindeutig ist jedoch, daß die Starnbergersee-Population als einzige stark aus dem phylogeographisch zu erwartenden Rahmen fällt, und sogar einer anderen Region zugeordnet wird. Zusammen mit den Ergebnissen für genetisch vergleichsweise intakte Populationen, die aber ebenfalls besetzt wurden, ist das Ergebnis als starkes Indiz dafür, daß ursprünglich große Seenpopulationen vor allem dann anfällig für verfälschenden Besatzeinfluß sind, wenn sie auch aus anderen Gründen in ihrem Bestand bedroht sind. Ansonsten scheinen lokale Adaptationen einen Selektionsvorteil für autochthone Bestände mit sich zu bringen, ein Ergebnis, das für Forellen an anderer Stelle postuliert wurde (Hansen et al. 2000b).

3.4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse für den Seesaibling

Im Rahmen des Teilprojekts zur Phylogeographie und Besatzeinfluß des alpinen Seesaiblings (*Salvelinus umbla*) wurden neun Populationen aus dem Donaeinzugsbereich in Bayern und Österreich und eine aus dem Rheineinzug mit Mikrosatelliten und durch die Sequenzierung eines Bereichs der Kontrollregion der mitochondrialen DNA charakterisiert. Es zeigte sich in der Mikrosatellitenanalyse, daß alle Populationen des Donauraums jeweils deutlich voneinander verschieden sind, wobei aber in verschiedenen populationsgenetischen Analysen Populationen aus benachbarten Seen näher miteinander verwandt sind, als weit auseinanderliegende. Die Analyse der Kontrollregion ergab 17 Haplotypen, wobei einer sehr häufig ist und in acht von zehn Populationen präsent ist. Andere Haplotypen wurden in niedriger Frequenz jeweils in nur einem See, oder in sehr nahe benachbarten Seen gefunden. Die einzige und wichtige Ausnahme betrifft die morphologisch aberrante Population des Ammersees, die ausschließlich durch 4 Haplotypen charakterisiert ist, die in keiner anderen Population gefunden werden konnten. Diese Eigenheiten sprechen dafür, daß diese Population eine eigene, bisher unbeschriebenen Art darstellt, die für den bayerischen Ammersee endemisch ist. Die Ergebnisse aus der Analyse aller untersuchten Loci ergänzen sich und zeigen, daß die heutigen Populationen aus einer Ursprungspopulation stammen, es aber offensichtlich in den letzten 12000 Jahren zu einer deutlichen allopatrischen Differenzierung kam.

Zur Analyse des Besatzeinflusses wurden die Ergebnisse der phylogeographischen Analyse mit einer Selbstklassifikationsanalyse aller Individuen auf der Basis der gefundenen Mikrosatellitenallelfrequenzen durchgeführt. Es zeigte sich, daß das Einbringen von allochthonem Besatzmaterial in große intakte Seenpopulationen nur geringe und mit den aufgewandten Mitteln nicht eindeutig identifizierbare Spuren hinterlassen hat. Auf der anderen Seite konnte für die zwischenzeitlich durch Umweltverschlechterungen stark beeinträchtigte Population des Starnberger Sees wahrscheinlich gemacht werden, daß die Kombination von starker Umweltverschlechterung (die sich auf die absolute Populationsgröße des Seesaiblings auswirkte) und starkem Besatz mit allochthonem Material zu einer drastischen Verfälschung des autochthonen Bestandes führte. Weitergehende Untersuchungen mit mehr Populationen und teilweise mehr Individuen sind aber nötig, um aus Besatzeffekte auf lakustrine Populationen eindeutig nachzuweisen.

4 Diskussion der erzielten Ergebnisse

4.1 Möglichkeiten und Grenzen der Abschätzbarkeit negativer Folgen des Besatzeinflusses

Im Rahmen des vorliegenden Projekts wurde versucht, den negativen Besatzeinfluß artgleichen neozoischen Materials auf die phylogeographische und populationsgenetische Integrität zweier ausgewählter Organismen (Bachforelle *Salmo trutta* und alpiner Seesaibling *Salvelinus umbla*) in Deutschland abzuschätzen. Ein dritter, nicht beeinflusster Organismus (Mühlkoppe *Cottus gobio*), der den Lebensraum der Bachforelle teilt, sollte als Referenz für den unbeeinflussten phylogeographischen Zustand der Bachforelle benutzt werden. Die Ergebnisse zeigen das Potential, aber auch die Grenzen der Abschätzbarkeit der genetischen Konsequenzen des Besatzeinflusses klar auf.

Das Potential, das sich durch die Entwicklung neuer genetischer Marker und einer vereinfachten Technik in der schnellen Anwendbarkeit dieser Marker ergibt und sich in Zukunft auch noch durch weitere Verbesserung dieser Techniken ergeben wird, wurde im Rahmen dieses Projekts weitestgehend ausgeschöpft.

4.1.1 Der obere Donaauraum als natürliche Introgressionszone für atlantische Linien

Was die großräumige phylogeographische Situation der Bachforelle in Deutschland angeht, konnten bereits aus anderen Studien abzuleitende und daher zu erwartende Ergebnisse (vor allem aus Bernatchez et al. 1992) das erste Mal quantitativ bestätigt werden. Dies, indem auf mitochondrialer Ebene gezeigt wurde, daß im Rhein-Main- und im Elbe-Einzugsgebiet atlantische Linien vorherrschen, aber im oberen Donaauraum sowohl atlantische als auch danubische Linien zu finden sind. Auf Mikrosatellitenebene wurde diese Aussage bestätigt, aber durch die höhere Auflösungskraft dieser Marker in vielen Aspekten verfeinert.

Die bereits von Riffel & Schreiber (1995) geäußerte Vermutung, daß es im oberen Donaubereich auf natürliche Weise zu einer Vermischung von atlantischen und danubischen Linien gekommen ist, wurde bereits von anderen Autoren diskutiert (z.B. Laikre 1999), wobei klar wurde, daß zwischen dem im bayerischen Donauegebiet starken Besatzeinfluß und natürlicher Introgression nur schwer zu unterscheiden ist. Unsere Studie konnte in diesem Aspekt einen klaren Schritt nach vorne tun, da wegen unserer Besatzeinflußwahrscheinlichkeitsabschätzung zwischen wahrscheinlich unbesetzten und mit hoher Wahrscheinlichkeit besetzten Populationen unterschieden wurde. Es ergab sich aus der Abschätzung des phylogeographischen Beitrags

zur genetischen Diversität mittels Kanonischer Korrespondenzanalyse unzweifelhaft, daß ein hoher Anteil der dominanten atlantischen Linien im oberen Donaubereich natürlichen Ursprungs sein muß. Dieses Ergebnis wurde dadurch bestätigt, daß atlantische Linien in wahrscheinlich unbesetzten Bächen im Einzugsbereich der Ilz detektiert werden konnten, die bisher nicht woanders gefunden wurden, auch nicht im direkt benachbarten Österreich (Weiss, pers. Mittlg.). Solche Linien haben sich mit hoher Wahrscheinlichkeit nach natürlicher Introgression mit atlantischen Linien *in situ* entwickelt oder dort erhalten. Umgekehrt konnten im untersuchten atlantischen Raum nur wenige danubische Bachforellenhaplotypen gefunden werden, was darauf schließen läßt, daß die Introgression vornehmlich nur in einer Richtung abgelaufen ist.

Dieses Bild deckt sich mit dem Verbreitungsmuster anderer Fischarten im oberen Donaauraum. So finden sich dort in größerer Zahl atlantische Bachneunaugen (*Lampetra planeri*), aber nur an sehr wenigen Strecken sind danubische Bachneunaugen (*Eudontomyzon spec.*) auszumachen (Bohl 1993). Auch das Vorkommen der alpinen Seesaiblinge, die die Voralpenseen im Donau-Einzugsgebiet während der letzten Eiszeiten aus dem atlantischen Raum her besiedelt haben müssen, zeigt, daß es im oberen Donaauraum während der letzten Eiszeiten zu einem limnischen Faunenaustausch zwischen den beiden Flußsystemen gekommen sein muss.

4.1.2 Existenz und Verlust kleinräumiger phylogeographischer Integrität durch Besatz

Obwohl dieses Ergebnis klar zu belegen ist, kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, daß ein Großteil der feiner aufzulösenden phylogeographischen Integrität durch Besatz bereits verloren gegangen ist. Dieser Rückschluß läßt sich aus der Zusammenschau von zwei Ergebnissen der vorliegenden Studie im Vergleich mit der Literatur ziehen.

Erstens zeigte die Untersuchung der phylogeographischen Feinstruktur der Bachforellen-, Koppen- und Saiblingspopulationen, daß sich viele Populationen und Populationsgruppen aus gemeinsamen Vorflutersystemen und Seen, durch genetische Eigenheiten auszeichneten, wenn für diese nur eine geringe Besatzeinflußwahrscheinlichkeit angenommen werden konnte. So sind bei der Bachforelle in Bayern neben der phylogeographischen Auftrennung der großen Flußsysteme auch kleinere Flußsysteme mit einer eigenen genetischen Integrität versehen, so die Populationen des Ilzsystems in Niederbayern, des Wiesentsystems und des Rodachsystems in Oberfranken. Des weiteren wiesen manche Koppenpopulationen nur einen einzigen mitochondrialen Haplotyp auf, der in vielen Fällen auch nur in einer einzigen Population nachgewiesen werden konnte. Schließlich zeichneten sich fast alle untersuchten Seesaiblingspopulationen durch ihre genetische Eigenständigkeit aus, wobei die Population des Ammersees sogar mit hoher Wahrscheinlichkeit eine eigene sowohl genetische als auch morphologisch

diagnostizierbare Art darstellt. Die Verallgemeinerungswürdigkeit unserer Ergebnisse, die an ausgewählten Gebieten eines großen Bereichs in Bayern erarbeitet wurden, zeigt sich im Vergleich mit anderen Regionen. Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die Arbeiten von Estoup et al. (1998) und Hansen & Mensen (1998). Diese Arbeiten zeigten für hochwahrscheinlich unbeeinflusste Forellenpopulationen des Moselsystems bzw. für dänische Forellenpopulationen kleinräumig, daß die Verwandtschaft der Populationen mit ihrer geographischen Nähe korreliert. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für andere Salmoniden, z.B. den Bachsaibling *Salvelinus fontinalis* in Nordamerika (Angers et al. 1999) gezeigt.

Das zweite Argument für negativen Besatzeinfluß bei vielen von uns untersuchten Populationen der Bachforelle konnte im Rahmen der Kanonischen Selbstklassifikationsanalyse erbracht werden: Viele genetisch typisierte Individuen konnten anhand ihres Genotyps nicht ihrer eigenen Population oder einer aus dem gleichen Vorflutersystem „korrekt“ zugeordnet werden. In der Kanonischen Korrespondenzanalyse und einer anschließenden multifaktoriellen linearen Regressionsanalyse konnte desweiteren gezeigt werden, daß der Anteil, mit dem Individuen einer Population korrekt zugeordnet werden, in linearem Zusammenhang mit der Besatzeinflußwahrscheinlichkeit steht. Mit anderen Worten, es konnte nachgewiesen werden, daß bereits mittel und natürlich stark besetzte Populationen ihre genetische Identität, die durch ihre jeweils eigene Populationsgeschichte im jeweiligen Bachsystem evolutiv entstanden war, großteils verloren haben. Nur mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht oder kaum besetzte Bäche waren weitgehend intakt. Frappierend an diesem Ergebnis war, daß offensichtlich schon eine geringe Veränderung genetischer Varianz durch Besatz zu einem starken Verlust der phylogeographischen Integrität einer Population führen konnte.

Wie groß dieser Verlust gemessen an der regional unterschiedlichen Einzigartigkeit regionaler Populationen zu bemessen ist, mußte allerdings in den meisten Fällen verborgen bleiben. Eine Ausnahme bildeten die Fälle, wo mehrere unterschiedlich stark besetzte Populationen im gleichen Flußsystem beprobt wurden, und vor allem die Individuen aus den besetzten Populationen nicht mehr korrekt zugeordnet wurden. Das betrifft zum Beispiel die Bachforellen der Kalten Moldau, die auf Besatz zurückgehen und im Gegensatz zu einem Großteil der Bachforellen aus weniger stark besetzten Zuflüssen der Kalten Moldau. In diesem Fall ist der Rückschluß möglich, daß das Flußsystem der Kalten Moldau eine eigene phylogeographische Integrität für alle Forellenpopulationen besessen haben muß, die entsprechend ihres Besatzes teilweise zerstört wurde. Im Gegensatz dazu, läßt sich für durchgängig stark besetzte Flußsysteme kaum ausmachen, ob ihre Populationen einst durch Eigenheiten charakterisiert waren. Die Ergebnisse aus den intakten Vergleichsgebieten lassen aber vermuten, daß regionale Eigenheiten durchgehend existiert haben, aber inzwischen flächendeckend verschwunden sind.

4.1.3 Möglichkeiten und Grenzen der Abschätzbarkeit des Verlusts

Aus den oben dargestellten Zusammenhängen läßt sich folgern, daß die Konsequenzen negativen Besatzeinflusses auf die regionale phylogeographische Identität nur anhand der noch existierenden Reste dieser phylogeographischen Integrität abgeschätzt werden können. Dies ist solange möglich, solange im gleichen Bach oder Flußsystem noch kaum beeinflusste Populationen existieren, die den regionalen ursprünglichen Zustand mit hoher Wahrscheinlichkeit repräsentieren. Oder aber, eine grobe Abschätzung gelingt über die Selbstklassifikationsanalyse, wobei allerdings geographisch entferntere und nähere Referenzpopulationen in die Analyse miteingehen müssen.

Allgemeine populationsgenetische Charakteristika einzelner Populationen außerhalb ihres phylogeographischen Kontexts, z. B. die Anzahl der Allele pro Population oder Abschätzungen des Heterozygotendefizits, lassen wegen der unterschiedlichen Faktoren, die diese Variablen beeinflussen können, keine direkten Rückschlüsse auf den Besatzeinfluß zu. Um diese Daten zu interpretieren, müssen Vergleichsdaten vorliegen. Zwar liegen auch für die Bachforelle Ergebnisse aus Experimenten oder exakt dokumentierten Besatzanalysen vor, die nahelegen, daß es durch Besatz zu einem Verlust an genetischer Vielfalt durch "bottleneck"-Effekte kommen kann (z.B. Hansen et al. 2000a). Häufig sind jedoch diese Ergebnisse nicht ohne weiteres auf andere Populationen übertragbar, weil die Besatzeffekte regional unterschiedlich ausfallen können und auch von der jeweils unterschiedlichen Art und Häufigkeit des Besatzes abhängen können.

Über den Verlust phylogeografischer Identität hinaus lassen sich auch mit unseren Daten keine konkreten Verlustabschätzungen vornehmen. Potentiell auftretende ökonomische Verluste lassen sich zum Beispiel deswegen nicht benennen, weil der ökonomische Wert regionaler genetischer Diversität nicht zu quantifizieren ist. Theoretisch läßt sich jedoch darüber spekulieren, ob lokale Tierstämme nicht dadurch einen ideellen und gleichzeitig ökonomischen Wert darstellen, daß sie Teil eines regionalen Naturerbes darstellen, daß sich über die Tourismusindustrie vermarkten ließe. Dies könnte besonders im Falle der sportfischereilich genutzten Bachforelle gelten.

4.2 Beschleunigen Umweltveränderungen die Introgression allochthonen genetischen Besatzmaterials ?

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte der Versuch gemacht werden, durch die Abschätzung der biotischen Integrität aller beprobten Bachforellengewässer zu evaluieren, ob Bachforellen aus biotisch intakteren Gewässern weniger anfällig für Introgression mit allochthonem genetischen Material sind, als solche aus anthropogen negativ veränderten Gewässern. Diese Annahme war berechtigt, weil für Bachforellen in unabhängigen Arbeiten wahrscheinlich gemacht werden konnte, daß lokale Anpassungen in verschiedenen Populationen existieren (z.B. Taylor 1991, Hindar et al. 1995, Hansen et al. 2000b). Allerdings beruhen viele dieser Aussagen eher auf indirekter Evidenz als auf direkter Beobachtung (Laikre 1999). Entsprechend der Annahme, daß lokal adaptierte Populationen existieren, ließe sich daher die Folgerung formulieren, daß autochthone Populationen gegenüber allochthonem Besatzmaterial eine höhere Fitness aufweisen sollten, solange die Bedingungen, unter denen die erblichen lokalen Anpassungen evolviert sind, persistieren und nicht z.B. durch anthropogene Einflüsse verloren gegangen sind.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde im Rahmen des vorliegenden Projekts eigens ein für Bachforellengewässer geeigneter „Index of Biotic Integrity“ („Forellen-IBI“) entwickelt und evaluiert, der zur Quantifizierung der „forellenspezifischen“ Gewässerqualität aller beprobten Gewässer dienen sollte. In verschiedenen multifaktoriellen Analysen konnte kein linearer Zusammenhang zwischen Verlust an biotischer Integrität und Verlust an phylogeographischer Integrität durch Besatz festgestellt werden, die Hypothese also nicht unterstützt werden. Dies obwohl in der Kanonischen Korrespondenzanalyse dargestellt werden konnte, daß es zumindest einen signifikanten nicht-linearen Zusammenhang zwischen biotischer Integrität und genetischer Varianz gibt, der allerdings nur einen kleinen Teil der genetischen Gesamtvarianz erklärt.

Dieses Ergebnis scheint auf den ersten Blick den bisherigen Ergebnissen anderer Arbeiten zu widersprechen, die zeigten, daß in der Regel Besatzfische schnell aus den jeweiligen Gewässern abwandern, eine höhere Mortalität als die autochthonen Fische im natürlichen Gewässer aufweisen und in der Regel die langfristige Persistenz allochthoner Fische niedrig ist (z.B. Klinger 1997, Weiss et al. 1999 a,b). Unsere Ergebnisse können allerdings problemlos in diese Ergebnisse eingepasst werden, wenn man (1) annimmt, daß Besatzfische unabhängig von der Umweltverschlechterung eine niedrigere Fitness haben, weil sie nicht unter natürlichen Bedingungen aufgewachsen sind; und (2) wenn man berücksichtigt, daß eine Introgression mit allochthonem Genmaterial mit hoher Wahrscheinlichkeit vor allem von den wenigen Besatzfischen ausgeht, die in der Lage waren, mit den lokalen Bedingungen unabhängig von der biotischen Integrität zurechtzukommen, und daher eine vergleichbare Fitness wie die autochthonen aufweisen.

Dennoch scheinen Umweltverschlechterungen die Durchsetzungsfähigkeit von Besatzfischen gegenüber autochthonen mitbestimmen zu können, wenn sie extrem ausfallen. Die im Rahmen dieser Studie erbrachten Ergebnisse zum alpinen Seesaibling lassen nämlich vermuten, daß negative Umweltveränderungen in Seen durchaus eine Rolle für die Introgressionsrate mit allochthonem Genmaterial spielen. Die Ergebnisse zur phylogeographischen Integrität des Starnberger Seesaiblings zeigten, daß eine aufgrund schlechter Umweltverhältnisse numerisch reduzierte Population, die an der Grenze ihrer ökologischen Valenz existierte, durch numerisch überlegenen Besatz „überrollt“ werden kann. Solange aber die Umweltbedingungen nur in engerem Rahmen schwanken, wie in den anderen untersuchten Saiblingsseen, scheinen lokale Adaptationen in der Konkurrenzsituation mit allochthonen Saiblingsen zu greifen. Eventuell sind ähnliche Effekte wie im Starnberger See auch bei Bachforellenpopulationen zu beobachten, da in unserer Untersuchung nur sehr wenige Bachforellenpopulationen in die Analyse mit eingegangen sind, die aus ausgesprochen stark beeinträchtigten Gewässern stammten. Deswegen mag ein solcher Effekt bei den untersuchten Bachforellenpopulationen verborgen geblieben sein.

4.3 Lassen sich aus den gewonnenen Erkenntnissen Rückschlüsse auf die negativen Folgen des Einbringens transgener Salmoniden ableiten ?

Transgene Bachforellen oder Saiblinge, die in ihrer genetischen Architektur bis auf die implantierten Gene weitgehend dem Wildtyp entsprechen, lassen sich in allen anderen Aspekten mit durchschnittlichen artgleichen Salmoniden vergleichen. In Zusammenhang mit den vorgelegten Ergebnissen gibt es daher keine begründete Annahme, die nahelegen würde, daß z.B. Besatz oder ungewollte Auswilderung transgen veränderter Bachforellen nicht zur Introgression von transgenem Genmaterial in natürliche Populationen führen könnten. Dies, da die vorliegende Studie gezeigt hat, daß Bachforellenpopulationen schon bei mittlerem bis starker Besatzintensität anfällig für Introgression sind. Auch die Umweltsituation der eventuell mit transgenen Fischen zu besetzenden Population kann keine sichere Auskunft darüber geben, ob reproduktionsfähige transgene Stämme sich in natürlichen Populationen etablieren oder nicht.

4.4 Sind artübergreifende Rückschlüsse über negative Folgen anthropogen bedingter Introgression allochthonen Genmaterials aus den gewonnenen Erkenntnissen möglich ?

Unsere Ergebnisse zur Phylogeographie der Bachforelle und der in den gleichen Gewässern lebenden Mühlkoppe haben unerwartet klar gezeigt, daß der eiszeitlich beeinflusste bayerische Teil Mitteleuropas von Tieren besiedelt ist, deren lokale Populationen eine sehr unterschiedliche Historie aufweisen können. Damit ist klar, daß sich von der phylogeographischen Struktur der einen Tierart nicht ohne weiteres Rückschlüsse auf die anderer Tierarten der gleichen Lebensräume ziehen lassen. Wie der Vergleich der Phylogeographie der Bachforelle mit anderen Fischen der weiteren Region, wie dem Aitel (Durand et al. 1999) und dem Flußbarsch (Nesbø et al. 1999) jedoch zeigt, lassen sich zwischen einigen Fischarten Ähnlichkeiten in der Besiedlungsgeschichte Mitteleuropas feststellen, die allerdings mit dem Muster der Koppe nicht übereinstimmen. Es läßt sich daher spekulieren, ob es nicht möglich wäre, anhand einer größeren Auswahl möglichst unterschiedlicher limnischer Organismen auch eine größere Zahl phylogeographisch wichtiger Areale (Einzugsgebiete) im Zielgebiet zu identifizieren, die auch für fast alle nicht näher untersuchten Tiere gelten könnten. Die Tatsache, daß aber schon relativ kleine Einzugsgebiete, wie das der Ilz, einen hohen Grad an „genetischem Endemismus“ aufweisen können, zeigt, daß solche Erhebungen kleinräumig vorgenommen werden müssen.

5 Empfehlungen

5.1 Regelungsbedarf für das Aussetzen von artgleichen Neozoen und transgenen Tierarten

Aus dem in dieser Darstellung und in der Einleitung dargestellten Sachverhalt zur introgressiven Hybridisation durch allochthones Genmaterial ergeben sich einige Aspekte für einen Regelungsbedarf aus populationsgenetischer Sicht. Unseren Ergebnissen und Überlegungen nach kann demnach Regelungsbedarf je nach Prioritäten dann entstehen, wenn

(1) die Introgression zum Verlust von Populationsmerkmalen oder ganzen Populationen führen könnte, vor allem, wenn diese als gesellschaftlich bedeutsam erachtet werden, auch wenn sie offensichtlich keine adaptive Funktion haben. Dies gilt besonders, wenn Populationen mit diesen Merkmalen ähnlich wie regionales Kulturgut identitätstiftend für die Menschen dieser Region sind. Das könnte zum Beispiel regionale Farbvarianten von Sportfischen betreffen, die einen hohen Wert für lokale Interessensgruppen wie Sportfischereivereine darstellen. In einigen Regionen spricht man zum Beispiel von „unserer“ Forelle.

(2) die Introgression durch das Einbringen maladaptiver Merkmale und/oder durch zu erwartende "outbreeding depression" zum Aussterben lokal angepasster Formen führen könnte. Dies gilt insbesondere, wenn die lokalen Formen wirtschaftlich wichtig sind und nicht durch andere Formen gleichwertig ersetzt werden können. Ein Beispiel dafür könnten die verschiedenen lokal und ökologisch differenzierten Renken- (*Coregonus spec.*) und Saiblingspopulationen (*Salvelinus cf umbla*) der Voralpenseen darstellen. Diese sind lokal von wirtschaftlicher Bedeutung. Sie sind aber durch den Besatz mit allochthonen Stämmen gefährdet. Wie die vorliegende Studie für die Saiblingspopulation des Starnberger Sees wahrscheinlich gemacht hat, können sie unter ungünstigen Umweltbedingungen fast vollständig von Besatzfischen verdrängt werden. Potentiell vorhandene lokale Anpassungen, die sich in diesem Fall nacheiszeitlich evoluiert hatten, verschwinden damit aus diesen Populationen unwiederbringlich.

(3) die Introgression zum Verlust potentiell nutzbarer Merkmale des genetischen Reservoirs autochthoner Populationen führen könnte. Solche genetischen Reservoirs können wichtig sein für zukünftige Zuchtmaßnahmen mit domestizierten Formen und sollten daher nach Möglichkeit erhalten werden, auch wenn der Wert einzelner Stämme und Gene bisher nicht abgeschätzt werden kann. Ein Beispiel hierfür könnten lokal an saure Gewässer angepasste Salmonidenpopulationen darstellen, die in Urgesteinsgebieten z.B. des Bayerischen Waldes vorkommen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit weisen diese Stämme genetische Eigenschaften auf, die sie ideal

für die Optimierung von Forellenzuchtstämmen prädestinieren, die ihrerseits in Teichanlagen auf Urgesteinsgrund aufgezogen werden sollen.

Entsprechend dieser Vorgaben und aktueller wissenschaftlicher Ergebnisse, die den negativen Einfluß von Neozoen belegen, den Schaden aber oftmals nicht quantifizieren und vorherberechnen können, bedarf es der Formulierung von Regelungen, die das Ausbringen von artgleichen Neozoen betreffen und sich auf verschiedene Vorsichtsmaßnahmen beziehen, die sich eher am Vorsorgeprinzip als am Risikoprinzip orientieren sollten.

Beim gezielten Ausbringen von Neozoen und in besonderem Maße bei dem potentiellen Ausbringen transgener Organismen sind je nach Zielvorgabe Sachverhalte zu berücksichtigen, die die Wahrscheinlichkeit und Intensität der Introgression bestimmen. Weiterhin muß die phylogeographische Einzigartigkeit der eventuell durch die ausgebrachten Neozoen geschädigten Populationen evaluiert werden, auch wenn deren Wert nicht klar abzuschätzen ist.

Um die genetischen Effekte der Ausbringung *a priori* abschätzen zu können, muß

(1) die kompetitive Kraft der Neozoen bzw. der transgenen Organismen gegenüber der autochthonen Form, mit der sie potentiell fertil hybridisieren könnte, *a priori* untersucht werden, wobei die Umweltsituation, die diese kompetitive Kraft beeinflussen kann, ebenfalls mit berücksichtigt werden muss.

(2) bei der Ausbringung das numerische Verhältnis der Neozoen auf die der autochthonen Population abgestimmt werden, damit die allochthonen nicht in die Überzahl gelangen können. Dies verhindert Introgression allochthonen Materials nicht, trägt aber zur Verminderung negativer Effekte bei.

(3) die sexuelle Attraktivität gegenüber der autochthonen Population abgeschätzt werden, um zu vermeiden, daß selbst bei zahlenmäßig niedriger Ausbringung nicht doch starke Konsequenzen zu befürchten sind. Dieser Aspekt ist besonders für transgene Tiere, die zufällig in die Umwelt gelangen können, wichtig.

Um die eventuell gefährdete phylogeographische Einzigartigkeit der artgleichen und durch die Ausbringung potentiell gefährdeten Populationen, zu beurteilen, sollten ESU's (Evolutionary Significant Units) für die betroffenen Tierarten identifiziert werden und in einem gesellschaftlichen Prozess OCU's (Operational Conservation Units) definiert werden, denen ein zu

bestimmender Schutzstatus zugesprochen wird, und auf den bei dem Ausbringen von Neozoen Rücksicht genommen wird.

Im Rahmen der durch neozoische Einflüsse bedrohten Populationen der Bachforelle und des Seesaiblings, ergeben sich für Deutschland bzw. die EU folgende konkrete Empfehlungen, die per Analogieschluß auf andere Organismen adaptiert werden können.

5.2 Konkrete Empfehlungen am Beispiel der untersuchten Organismen

5.2.1 Weitergehende Maßnahmen zur artspezifischer Definition von „ESUs“ (Evolutionary Significant Units) für die Bachforelle und den alpinen Seesaiblings

Ein effektiver Schutz lokaler intraspezifischer Diversität kann nicht funktionieren, wenn diese Diversität nicht auch lokal differenziert bekannt ist. Es sollten daher für alle direkt durch Besatz betroffenen Fischarten ESU's erarbeitet und definiert werden (Bernatchez 1995).

Das Konzept von *Evolutionary Significant Units* (ESU's) wurde vor allem von Ryder (1986) propagiert, um dem Problem für den Natur- und Artenschutz gerecht zu werden, das sich aus der eingeschränkten Verwendbarkeit der Begriffe „Art“ und „Unterart“ in Zusammenhang mit schutzwürdigen Populationen ergibt. Die Probleme für den Artenschutz rühren daher, daß nicht nur „Arten“ und „Unterarten“ schutzwürdig sind, sondern auch andere evolutiv gewachsene Einheiten die sich nicht durch diese beiden Begriffe adäquat beschreiben lassen. So kam man nach intensiven Diskussion zu dem Konsens, daß sinnvolle Artenschutzaktivitäten sich auf solche evolutionären Linien konzentrieren sollten, die sich als „*Evolutionary Significant Units*“ (ESU's) beschreiben lassen. Dieses Konzept wurde vor allem auf pazifische Lachse angewendet (Waples 1991), ist aber wie ursprünglich vorgeschlagen (Ryder 1986) auf alle Arten anwendbar.

Nach Waples (1991) sind ESU's *Populationen oder Gruppen von Populationen, die*
 (1) *klar reproduktiv von anderen artgleichen Populationen sind und*
 (2) *einen wichtigen Bestandteil der evolutionären Geschichte dieser Art darstellen.*

Entsprechend könnten durch ihre genetischen Eigenheiten in Bayern z.B. die Ilzforelle als ESU definiert werden.

Wie die Ergebnisse für die Bachforelle und den Seesaibling im Rahmen des vorliegenden Projekts gezeigt haben, ergeben sich im untersuchten Gebiet ESUs. Im Rahmen von weitergehenden Studien, die dieser lokalen Einzigartigkeit vieler Populationen der Bachforelle und des Seesaiblings Rechnung tragen, sollten in Bayern, Deutschland und in der EU Populationen dieser beiden regional und wirtschaftlich wichtigen Arten genetisch weitergehend erfasst werden. Dazu ergibt sich eine Grundlage z.B. mit den in diesem Projekt erhobenen Daten zur mitochondrialen und nukleären Vielfalt, um vereinfachte Strategien zur Kartierung der genetischen Vielfalt auf lokaler Ebene zu entwickeln. Eine Möglichkeit, die auch bereits von einer österreichischen Arbeitsgruppe (Prof. Sturmbauer, Universität Salzburg, Projektvorschlag "Troutscreen") für die Bachforelle angegangen wird, besteht in der Etablierung von artspezifischen DNA-Diagnose Chips auf der Basis der Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen. Diese Chips stellen eine Möglichkeit dar, mitochondriale und Mikrosatellitenvariabilität effektiv und schnell über große Gebiete hinweg zu screenen, ohne daß nach der allerdings aufwendigen und teuren Erstellung der Chips große Kosten anfallen

Besonderes Augenmerk sollte auf die verschiedenen Populationen des alpinen Seesaiblings in Deutschland, Österreich und der Schweiz gelegt werden, von denen einige mit hoher Wahrscheinlichkeit Artstatus besitzen und deshalb als nationale Endemiten überregionales Interesse erregen.

5.2.2 Erarbeitung einer modernen gesellschaftlichen Übereinkunft zur Schutzwürdigkeit lokaler Salmonidenpopulationen („OCU's": Operational Conservation Units) und zur gesetzlichen Regelung allochthoner Introgression

Da die Identifikation lokal differenzierter Salmonidenstämme und ihre Definition als ESU's alleine keinen Schutz vor Introgression mit allochthonem Genmaterial durch Besatz mit sich bringt, bedarf es schon hier einer gesellschaftlichen Übereinkunft über die Wichtigkeit (z.B. der Ilzforelle), die ja Grundlage für die Anerkennung als „OCU" bildet. Nach Dodson et al (1998) sind OCU's solche *Einheiten im Artenschutz, die sich aus dem Zusammenspiel von biologischen Gegebenheiten finden sich weitestgehend in den ESUs und sozio-ökonomischen Angelegenheiten ergeben*. Die biologischen Gegebenheiten ergeben sich aus den ESUs, also z.B. der Tatsache, daß die Ilzforelle etwas biologisch einzigartiges und für die Art herausragendes darstellt. Die sozio-ökonomischen Besonderheiten ergeben sich aus der überregionalen und regionalen Beurteilung der Schutzwürdigkeit dieser Population in Abhängigkeit von anderen eventuell einem Schutz zuwiderlaufenden Interessen.

Im Falle der Salmoniden bedeutet dies, daß nach der unabhängigen Identifikation und Definition von ESUs für lokale Salmoniden, nach einer überregional wirksamen Lösung zur Definition von OCU's gesucht wird, die langfristig zum Erhalt dieser lokalen Stämme beiträgt. Dieser Prozess muss *in Abstimmung mit lokalen Interessensvertretern* stattfinden, wenn er zu einer weitergehenden Akzeptanz und damit eine ausreichenden Effizienz führen soll. Hier sei explizit die Beteiligung der lokalen Fischereiberechtigten angesprochen. Nicht nur, weil sie die beste Kenntnis der lokalen Umstände, die zu einem Schutz beitragen oder ihm zuwiderlaufen können, besitzen. Sondern auch, weil ohne ihre aktive und motivierte Beteiligung kein effizienter Schutz zu erreichen ist. Es sei aber auch darauf verwiesen, daß die Kompetenz zur Beurteilung der Schutzwürdigkeit und Schutzmöglichkeit einzelner Salmonidenpopulationen *nicht von lokalen Interessensvertretern alleine und auch nicht von Fischereifachleuten alleine* aufgebracht werden kann. Dies, da die Kriterien hierfür nur auf der Basis von ständig aktualisiertem zoologischen und ökologischem Fachwissen, das die Probleme in einem überregionalen Kontext beurteilt, erarbeitet werden müssen. Entsprechend bedarf es einer engen Zusammenarbeit aller Gruppen, um zu einem lokal angepassten Management der Besatzes zu kommen.

5.2.3 Erarbeitung lokal angepasster Kontroll- und Managementstrategien zur Besatzpolitik

Konkret wird ein Mehrstufenplan empfohlen, um die lokale Diversität der Bachforelle und des alpinen Seesaiblings langfristig vor gewolltem oder ungewollten negativen Neozoeneinfluß ausreichend zu schützen. Dieser muss unserer Ansicht nach folgende Aspekte berücksichtigen:

(1) Im Zielgebiet müssen ESU's für die Zielarten von interessensunabhängigen Biologen identifiziert werden. Für die Bachforelle bedeutet dies, dass gebietsweit alle größeren Vorfluter auf den Grad der Differenzierung ihrer Populationen untersucht werden sollten. Für die Populationen des Seesaiblings bedeutet dies, daß alle natürlichen Populationen des Seesaiblings untersucht werden sollten. Für beide Organismen müssen die Daten zu Populationen aus den angrenzenden Ländern berücksichtigt werden, weil nur so die Einzigartigkeit lokaler Populationen evaluiert werden kann. Voraussetzungen für einen solche flächendeckende Identifizierung sind standardisierte DNA-Screening-Methoden, die auf der Basis unserer Ergebnisse und der anderer Arbeitsgruppen erarbeitet werden können.

(2) Auf der Basis der gewonnenen Erkenntnisse sollten unter der Koordination einer übergeordneten unabhängigen Stelle die lokalen Interessensvertreter mit den Vertretern der überregionalen Schutzkoordination zusammengeführt werden. Dies, um das Bedrohungspotential für die jeweiligen Populationen zu ermitteln und das Schutzpotential, z.B. durch die Ausarbeitung alternativer Besatz- und Hegestrategien auszuloten, und um zu einem Konsens zu kommen. Konzepte für den Schutz einzigartiger, aber lokal genutzter und besetzter Populationen lassen

sich aus dem Repertoire des allgemeinen Artenschutzes erarbeiten, sollten aber folgende Optionen zusätzlich berücksichtigen:

- (a) Aufbau von lokalen Besatzstämmen aus unbeeinflusstem Material, mit dem schutzwürdige Populationen besetzt werden können.
- (b) Aufbau eines fischereispezifischen Kontroll- und Monitoring-Systems, das die lokal gefundene Übereinkunft zur Schutzstrategie in der Durchsetzung unterstützt und das den lokalen Interessensvertretern zum größten Teil selbst übertragen werden sollte.
- (c) Die Ausweisung von isolierten Schutzzonen, die in keiner Weise über die natürliche Tragfähigkeit des Gewässers hinaus genutzt oder besetzt werden.
- (d) Einbringung der regionalen Besonderheiten von Salmonidenpopulationen in das touristische Werbekonzept der Region.

5.2.4 Entwicklung, Propagierung und Verwendung nicht fortpflanzungsfähiger transgener Salmonidenstämmen

Für die Verwendung im Freiland bzw. die Verwendung in nicht vollkommen ausbruchssicheren Mastanlagen sollten ausschließlich nicht-fortpflanzungsfähige transgene Salmonidenstämmen in Betracht kommen. Diese müssen gegebenenfalls entwickelt werden. Dies, weil sowohl unsere Ergebnisse als auch die anderer Arbeitsgruppen gezeigt haben, daß Introgression bei Salmoniden nach Besatz möglich und wahrscheinlich ist. Die Schäden einer unkontrollierten Verbreitung transgener Organismen sind nicht abzuschätzen, weshalb bei Besatz durch transgene Salmonidenstämmen das Vorsorgeprinzip anzuwenden ist.

6 Kurzfassung des Schlußberichts

Am Beispiel des Besatzes von allochthonen Nutzfischen (Bachforelle *Salmo trutta*, Alpiner Seesaibling *Salvelinus umbla*) in natürliche Gewässer Bayerns wurde untersucht, ob und wie stark sich die Verbringung allochthonen Genmaterials auf die genetische Zusammensetzung autochthoner Populationen auswirkt. Zu diesem Zweck wurden fast 50 Populationen der Bachforelle (ca 1600 Individuen) und 10 Populationen des Seesaiblings (ca 300 Individuen) aus Gewässern mit unterschiedlicher Besatzgeschichte beprobt und mit modernen genetischen Markern (mitochondriale Haplotypen und Mikrosatelliten) analysiert. Die Analyse diente einerseits dazu, die ursprünglichen, d.h. evolutiv gewachsenen Verwandtschaftsstrukturen zwischen geographisch zueinander in Bezug stehenden Populationen zu verstehen (Analyse der phylogeographischen Struktur). Aus Vergleichsgründen wurden zusätzlich ca 400 Mühlkoppen (*Cottus gobio*), die den gleichen Lebensraum wie die Bachforelle bewohnen, aber nicht besetzt werden, untersucht. Andererseits sollte durch die Bezugnahme auf natürliche (z.B. Einzugsgebiet) oder anthropogen (z.B. Besatz) bedingte Umweltfaktoren herausgefunden werden, ob es durch Besatz zu einem Verlust phylogeographischer Identitäten und anderer populationsgenetischer Charakteristika gekommen ist oder nicht.

Um den Grad forellenbachspezifischer biotischer Integrität zu messen, wurde im Rahmen eines Teilprojekts ein „Index of Biotic Integrity“ (IBI) entwickelt. Dieser sollte im Gegensatz zu bereits existierenden Integritätsindices, v.a. Karr's IBI (1981), in der Lage sein, die kleinräumige und artenarme Biozönose bayerischer Mittelgebirgsbäche auf der Basis ihrer Fischartengemeinschaft zu bewerten. Auf der Grundlage von Literaturangaben und ersten Beobachtungen im Freiland wurden potentielle Kriterien für einen „Forellenbach-IBI“ zusammengestellt, wobei Kriterien, die die Struktur der Population der Leitart (Bachforellen) berücksichtigen, besonderes Gewicht erhielten. Um die Aussagekraft eines Forellenbach-IBI zu studieren, wurden 34 Mittelgebirgsbäche in Bayern befischt und beprobt und 10 Kriterien der Fischartengemeinschaft und Populationsstruktur der Bachforelle bestimmt. Zur befischungsunabhängigen Bewertung der biotischen Integrität dieser Gewässer wurde von jeder Untersuchungsstelle zusätzlich der Saprobienindex, der Säurezustand und die chemische Belastung nach standardisierten Kriterien bestimmt. Mittels Korrelationsanalyse und qualitativer Bewertung wurde jedes der 10 potentiellen Kriterien eines Forellenbach-IBI auf seine Tauglichkeit, Habitatsverschlechterung anzuzeigen, überprüft. Aus 7 der ursprünglich 10 Kriterien, die einen positiven Zusammenhang mit der Gewässergüte erkennen ließen, wurden ein modifizierter Forellenbach-IBI konstruiert, der seinerseits mit der Gesamtgewässergüte, die sich aus den unabhängig gewonnenen Gewässerbewertungen errechnete, in Beziehung gesetzt wurde. Dieser überprüfte Forellenbach-IBI korrelierte mit 55,8% mit der Gesamtgewässergüte (Spearman's Korrelation

$p < 0,001$, $n = 31$). Diese Korrelation erhöhte sich auf signifikante 60,1%, wenn die IBI-Bewertungsklassen klassiert (4 Klassen) und nicht kontinuierlich in die Analyse eingingen. Er erhöhte sich auf 70,6%, wenn nur organisch-toxisch belastete Bäche berücksichtigt wurden. Damit konnte gezeigt werden, daß der Forellenbach-IBI auf anthropogen verursachte Gewässergüteverschlechterungen anspricht. Entsprechend wurden alle in die Untersuchung des Besatzeinflusses eingegangenen Bäche mit diesem Evaluierungsinstrument bewertet. Um es jedoch als allgemein nutzbares Evaluationsinstrument zu etablieren, sollte in weiterer Forschung der Einfluß von Jahreszeit, Region und interannuellen Schwankungen abgeschätzt werden.

Im Hauptteil des Projekts wurden bis zu 1612 Bachforellenindividuen aus fast 50 Populationen und Zuchtanstalten genetisch typisiert, um einerseits die phylogeographische Struktur bayerischer Bachforellen zu verstehen, und entsprechend den Verlust, der durch Besatz entstehen kann, einzuschätzen, und andererseits potentielle Besatzeinflüsse auf die phylogeographische Integrität einzelner Populationen quantifizieren zu können. Für die mitochondriale Analyse wurden die beiden Techniken der Restriktionslängenpolymorphismen (RFLP) und die Sequenzanalyse angewendet, erstmals für die Bachforelle auch in Kombination. Die Ergebnisse bestätigen die bereits publizierten Vorkommen von nur zwei von fünf beschriebenen mitochondrialen Linien in Bayern, nämlich der atlantischen und der danubischen. Auch gleichzeitiges Vorkommen beider Typen innerhalb einer Population wurde gefunden. Durch die große Probenzahl war es möglich, die drei großen Einzugsgebiete Bayerns (Main/Rhein, Elbe, Donau) hinsichtlich der genetischen Ausstattung ihrer Bachforellenpopulationen gegenüberzustellen und statistische Verfahren zur Detektion von Verteilungshäufigkeiten der Haplotypen anzuwenden. Es fanden sich in allen untersuchten Stromgebieten sowohl atlantische als auch danubische Linien, wobei auf RFLP-Ebene 14 Haplotypen festgestellt werden konnten, die sich auf der D-Loop-Sequenzebene auf 13 Haplotypen verteilten. Danubische Haplotypen waren nur wenig im atlantischen Einzugsbereich vorhanden, während umgekehrt atlantische Haplotypen auch im danubischen Einzugsbereich dominierten. In der Besatzeinflußanalyse stellte sich als wahrscheinlich heraus, daß sich in Bayern eine sekundäre Kontaktzone der beiden mitochondrialen Linien befindet. Dies, weil (1) auch nicht oder mit hoher Wahrscheinlichkeit kaum besetzte Gewässer im danubischen Einzugsbereich atlantische Haplotypen in großer Frequenz aufwiesen, und (2) im Ilz-Einzug Haplotypen aufzufinden waren, die phylogenetisch dem atlantischen Typ zuzuordnen waren, dennoch über eigene Charakteristika verfügten. Der Besatzeinfluß auf die mitochondriale Diversität wurde zusammen mit den Typisierungen der zweiten Qualität genetischer Marker, der Mikrosatelliten, untersucht. Zu diesem Zweck wurde der größte Teil der 1600 Bachforellenindividuen aus den gleichen Populationen mit 5 diskreten Mikrosatellitenmarkern typisiert und die allelische Vielfalt beschrieben. Diese war erwartungsgemäß

wesentlich größer als bei den mitochondrialen RFLP's. Neben verschiedenen anderen Analysen wurden individuelle Mikrosatellitengenotypen einer Selbstklassifikationsanalyse unterworfen, wobei Genotypen entsprechend einer für jede Population berechneten Wahrscheinlichkeit zu ihrer eigenen oder einer anderen Population zugeordnet werden. Der Grad, mit dem Individuen „korrekt“ zugeordnet wurden, konnte somit als ein Maß für die phylogeographische Integrität einer Population angesehen werden, das neben anderen genetischen Parametern mit Besatzeinfluß und Umweltparametern und geographischen Einflüssen in Bezug gesetzt werden konnte.

Mit Hilfe der kanonischen Korrespondenzanalyse wurde analysiert, welche Parameter auf die gesamte genetische Varianz der Populationen Einfluß hatten. Es stellte sich heraus, daß mehrere geographische Subregionen eine eigene genetische Integrität unabhängig vom Besatzeinfluß und anderen Umweltparametern aufwiesen. Sie sind unterscheidbar und deshalb zur Definition von ESU's geeignet, weil sie der gängigen Definition von Evolutionary Significant Units (ESU's) entsprechen, die Populationen oder Gruppen von Populationen umschließt, die klar reproduktiv von anderen artgleichen Populationen getrennt sind und einen wichtigen Bestandteil der evolutionären Geschichte dieser Art darstellen. Diese ESU's beziehen sich auf Bachforellen der folgenden Einzugsgebiete: Auf Stromebene unterschieden sich die drei großen Flußsysteme Elbe, Donau und Rhein-Main signifikant. Innerhalb der Stromsysteme ließen sich signifikant das obere Donaugebiet vom unteren Donaugebiet, der Ilz-Einzug im Bayerischen Wald, der Wiesent-Einzug im Maingebiet (Oberfranken), und der Rodach-Einzug im Main-Einzug des Fichtelgebirges unterscheiden. Inwieweit noch anderen Regionen spezifisch unterscheidbar waren, aber durch Besatzeinfluß soweit verfälscht sind, daß sie ihre phylogenetische Integrität verloren haben, läßt sich nicht eindeutig sagen. Dennoch ist die Wahrscheinlichkeit hoch. Dies geht aus der Analyse des Besatzeinflusses hervor, der mit der Kanonischen Korrespondenzanalyse vorgenommen wurden. Unabhängig von geographischen und anderen Umweltparametern konnte mit hoher Signifikanz gezeigt werden, daß bereits mittlerer bis starker Besatzeinfluß (gemessen als Besatzeinflußwahrscheinlichkeit) zu einer Zerstörung der phylogeographischen Integrität von Bachforellenpopulationen führen kann. So waren in wahrscheinlich nicht oder kaum besetzten Gewässern die meisten Individuen ihrer eigenen Population oder einer aus dem gleichen Vorfluter zuzuordnen (zwischen 70 und 95%), aber bereits bei mittleren bis starkem Besatzeinfluß sank dieser Wert auf niedrige Werte, die bis fast auf 0% zurückgehen konnten. Dieses Ergebnis wurde durch mehrere Analysen abgesichert. Besonders erstaunlich war die Tatsache, daß diese drastischen Werte erreicht wurden, obwohl der Besatzeinfluß auf die gesamtgenetische Varianz mit etwa 8% gering ausfiel. Daraus ist zu schließen, daß bereits geringe Introgression zur großem Verlust phylogeographischer Identität führen kann.

Aus dem vergleichenden Teilprojekt zur Phylogeographie der Mühlkoppe in Mitteleuropa ergaben sich folgende Ergebnisse: In den bisher bekannten Arbeiten über die Phylogeographie der europäischen Süßwasserfische kann man generelle Muster erkennen. (1) Eine erste Besiedelung Europas aus dem Osten über das Schwarze bzw. Kaspische Meer. (2) Der Südosten Europas als wichtiges pleistozänes Refugium und eine hohe molekulare Diversität in dieser Region. (3) Die Wiederbesiedelung von Teilen Skandinaviens aus Zentraleuropa über die Ostsee. Die Mühlkoppen haben aber im Gegensatz zu allen anderen bisher untersuchten Arten offensichtlich in großen Teilen Europas während des Pleistozäns überlebt, so auch in Mitteleuropa und damit in Deutschland und Bayern. Sie unterscheiden sich darin von anderen Fischarten dieser Region, z.B. der Bachforelle, dem Döbel und dem Barsch. Entsprechend dieser vor langer Zeit begonnenen Differenzierungsprozesse ergibt sich für die Mühlkoppe nicht nur ein von anderen Fischen unterscheidbares Bild, sondern auch eines, daß sich durch eine wesentlich feiner gezeichnete Populationsstruktur auszeichnet. Zusammen mit der geringen Migrations-tendenz der Mühlkoppen stellt sich dieses Bild als feines Mosaik eigenständiger Linien dar, wobei sogar einzelne Bäche und Bachsysteme genetisch unterscheidbare Mühlkoppenpopulationen aufweisen können. Eine genauere kleinräumige Untersuchung von Populationen wäre allerdings interessant und nötig, um die Mechanismen der Populationsdifferenzierung und des Erhalts von Populationsgrenzen bei Mühlkoppe besser verstehen zu können. Erst eine solche Untersuchung würde es erlauben, „Evolutionary Significant Units“ (ESUs) für die Mühlkoppe genauer zu definieren. Wegen ihrer unerwartet unterschiedlichen Geschichte, war die Phylogeographie der Mühlkoppe nicht als Analogie zur Phylogeographie der Bachforelle zu gebrauchen.

Im Rahmen des Teilprojekts zur Phylogeographie und Besatzeinfluß des alpinen Seesaiblings (*Salvelinus umbla*) wurden neun Populationen aus dem Donaeinzugsbereich in Bayern und Österreich und eine aus dem Rheineinzug mit Mikrosatelliten und durch die Sequenzierung eines Bereichs der Kontrollregion der mitochondrialen DNA charakterisiert. Es zeigte sich in der Mikrosatellitenanalyse, daß alle Populationen des Donauraums jeweils deutlich voneinander verschieden sind, wobei aber in verschiedenen populationsgenetischen Analysen Populationen aus benachbarten Seen näher miteinander verwandt sind, als weit auseinanderliegende. Die Analyse der Kontrollregion ergab 17 Haplotypen, wobei einer sehr häufig ist und in acht von zehn Populationen präsent ist. Andere Haplotypen wurden in niedriger Frequenz jeweils in nur einem See, oder in sehr nahe benachbarten Seen gefunden. Die einzige und wichtige Ausnahme betrifft auch die morphologisch aberrante Population des Ammersees, die ausschließlich durch 4 Haplotypen charakterisiert ist, die in keiner anderen Population gefunden werden konnten. Diese Eigenheiten sprechen dafür, daß diese Population eine eigene, bisher unbeschriebenen Art darstellt, die für den bayerischen Ammersee endemisch ist. Die Ergebnisse aus der Analyse aller untersuchten Loci ergänzen sich und zeigen, daß die heutigen Populationen

aus einer Ursprungspopulation stammen, es aber offensichtlich in den letzten 12000 Jahren zu einer deutlichen allopatrischen Differenzierung kam. Zur Analyse des Besatzeinflusses wurde die Ergebnisse der phylogeographischen Analyse mit einer Selbstklassifikationsanalyse aller Individuen auf der Basis der gefundenen Mikrosatellitenallelfrequenzen durchgeführt. Es zeigte sich, daß das Einbringen von allochthonem Besatzmaterial in große intakte Seenpopulationen nur geringen und mit den aufgewandten Mitteln nicht eindeutig identifizierbare Spuren hinterlassen hat. Auf der anderen Seite konnte für die zwischenzeitlich durch Umweltverschlechterungen stark beeinträchtigte Population des Starnberger Sees wahrscheinlich gemacht werden, daß die Kombination von starker Umweltverschlechterung (die sich auf die absolute Populationsgröße des Seesaiblings auswirkte) und starkem Besatz mit allochthonem Material zu einer drastischen Verfälschung des autochthonen Bestandes führte. Weitergehende Untersuchungen mit mehr Populationen und teilweise mehr Individuen sind aber nötig, um Besatzeffekte auf lakustrine Populationen eindeutig nachzuweisen.

In der Diskussion wurden

- (1) Möglichkeiten und Grenzen der Abschätzbarkeit negativer Folgen des Besatzeinflusses,
- (2) die Rolle von anthropogenen Umweltveränderungen auf die Geschwindigkeit von Introgression allochthonen genetischen Besatzmaterials,
- (3) eine grundsätzliche Überlegung zu negativen Folgen des Einbringens transgener Salmoniden, und
- (4) die Übertragbarkeit der Ergebnisse zur Phylogeographie einer Art als Grundlage von ESUs auf andere Arten erörtert:

(1) Es wird herausgestellt, daß für die Bachforelle der obere Donaauraum eine sekundäre natürliche Kontaktzone zweier unterschiedlicher phylogenetischer Linien, der atlantischen und der danubischen, darstellt. Es konnte ein hoher Anteil atlantischer Linien im Donaauraum festgestellt werden, der entsprechend unserer Analysen teilweise natürlichen Ursprungs sein muss. Dieses Ergebnis wurde dadurch bestätigt, daß atlantische Linien in wahrscheinlich unbesetzten Bächen im Einzugsbereich der Ilz detektiert werden konnten, die bisher nicht woanders gefunden wurden. Obwohl eine phylogeographische Struktur für die Bachforelle klar zu belegen ist, kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, daß ein Großteil der feiner aufzulösenden phylogeographischen Integrität durch Besatz bereits verloren gegangen ist. Wie groß dieser Verlust gemessen an der regional unterschiedlichen Einzigartigkeit regionaler Populationen zu bemessen ist, mußte allerdings in den meisten Fällen verborgen bleiben. Die Ergebnisse aus den intakten Vergleichsgebieten und aus dem Literaturvergleich lassen aber vermuten, daß regionale Eigenheiten, wie sie für die Ilz, die Wiesent und die Rodach in unserer Studie belegt werden können, durchgehend existiert haben, aber inzwischen flächendeckend verschwunden

sind. Aus den oben dargestellten Zusammenhängen läßt sich folgern, daß die Konsequenzen negativen Besatzeinflusses auf die regionale phylogeographische Identität nur anhand der noch existierenden Reste dieser phylogeographischen Integrität abgeschätzt werden können. Dies ist solange möglich, solange im gleichen Bach oder Flußsystem noch kaum beeinflusste Populationen existieren, die den regionalen ursprünglichen Zustand mit hoher Wahrscheinlichkeit repräsentieren. Allgemeine populationsgenetische Charakteristika einzelner Populationen außerhalb ihres phylogeographischen Kontexts, z. B. die Anzahl der Allele pro Population oder Abschätzungen des Heterozygotendefizits, lassen wegen der unterschiedlichen Faktoren, die diese Variablen beeinflussen können, keine direkten Rückschlüsse auf den Besatzeinfluß zu. Um diese Daten zu interpretieren, müssen Vergleichsdaten vorliegen. Über den Verlust phylogeografischer Identität hinaus lassen sich auch mit unseren Daten keine konkreten Verlustabschätzungen vornehmen. Potentiell auftretende ökonomische Verluste lassen sich zum Beispiel deswegen nicht benennen, weil der ökonomische Wert regionaler genetischer Diversität nicht zu quantifizieren ist.

(2) Entsprechend der Annahme, daß lokal adaptierte Populationen existieren, ließ sich die Folgerung formulieren, daß autochthone Populationen gegenüber allochthonem Besatzmaterial eine höhere Fitness aufweisen sollten, solange die Bedingungen, unter denen die erblichen lokalen Anpassungen evolviert sind, persistieren und nicht z.B. durch anthropogene Einflüsse verloren gegangen sind. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde im Rahmen des vorliegenden Projekts eigens ein für Bachforellengewässer geeigneter „Index of Biotic Integrity“ („Forellen-IBI“) entwickelt und evaluiert, der zur Quantifizierung der „forellenspezifischen“ Gewässerqualität aller beprobten Gewässer dienen sollte. In verschiedenen multifaktoriellen Analysen konnte kein linearer Zusammenhang zwischen Verlust an biotischer Integrität und Verlust an phylogeographischer Integrität durch Besatz festgestellt werden, die Hypothese also nicht unterstützt werden. Dennoch scheinen Umweltverschlechterungen die Durchsetzungsfähigkeit von Besatzfischen gegenüber autochthonen mitbestimmen zu können, wenn sie extrem ausfallen. Die im Rahmen dieser Studie erbrachten Ergebnisse zum alpinen Seesaibling lassen nämlich vermuten, daß negative Umweltveränderungen in Seen durchaus eine Rolle für die Introgressionsrate mit allochthonem Genmaterial spielen. Die Ergebnisse zur phylogeographischen Integrität des Starnberger Seesaiblings zeigten, daß eine aufgrund schlechter Umweltverhältnisse numerisch reduzierte Population, die an der Grenze ihrer ökologischen Valenz existiert, durch numerisch überlegenen Besatz „überrollt“ werden kann. Solange aber die Umweltbedingungen nur in engerem Rahmen schwanken, wie in den meisten anderen untersuchten Saiblingsseen, scheinen lokale Adaptationen in der Konkurrenzsituation mit allochthonen Saiblings zu greifen. Eventuell sind ähnliche Effekte wie im Starnberger See auch bei Bachforellenpopulationen zu beobachten, da in unserer Untersuchung nur sehr wenige

Bachforellenpopulationen in die Analyse mit eingegangen sind, die aus ausgesprochen stark beeinträchtigten Gewässern stammten. Deswegen mag ein solcher Effekt bei den untersuchten Bachforellenpopulationen verborgen geblieben sein.

(3) Transgene Bachforellen oder Saiblinge, die in ihrer genetischen Architektur bis auf die implantierten Gene weitgehend dem Wildtyp entsprechen, lassen sich in allen anderen Aspekten mit artgleichen Salmoniden vergleichen. In Zusammenhang mit den vorgelegten Ergebnissen gibt es daher keine begründete Annahme, die nahelegen würde, daß z.B. Besatz oder ungewollte Auswilderung transgen veränderter Bachforellen *nicht* zur Introgression von transgenem Genmaterial in natürliche Populationen führen könnten.

(4) Unsere Ergebnisse zur Phylogeographie der Bachforelle und der in den gleichen Gewässern lebenden Mühlkoppe haben unerwartet klar gezeigt, daß der eiszeitlich beeinflusste bayerische Teil Mitteleuropas von Tieren besiedelt ist, deren lokale Populationen eine sehr unterschiedliche Historie aufweisen können. Damit ist klar, daß sich von der phylogeographischen Struktur der einen Tierart nicht *ohne weiteres* Rückschlüsse auf die anderer Tierarten der gleichen Lebensräume ziehen lassen.

Entsprechend der Ergebnisse und Diskussion ergaben sich allgemeine und konkrete Empfehlungen zum Regelungsbedarf und der Kontrolle bei der Ausbringung artgleicher Neozoen, zu denen im weiteren Sinne auch transgene Organismen zu zählen sind. Aus diesen allgemeinen Empfehlungen ließen sich konkrete Empfehlungen für die untersuchten Organismen, vor allem die Bachforelle, ableiten, die per Analogieschluß übertragbar auf andere Organismen sind.

Unseren Ergebnissen und Überlegungen nach kann Regelungsbedarf je nach Prioritäten dann entstehen, wenn

- (1) die Introgression zum Verlust von Populationsmerkmalen oder ganzen Populationen führen könnte,
- (2) die Introgression durch das Einbringen maladaptiver Merkmale und/oder durch zu erwartende „outbreeding depression“ zum Aussterben lokal angepasster Formen führen könnte, und
- (3) die Introgression zum Verlust potentiell nutzbarer Merkmale des genetischen Reservoirs autochthoner Populationen führen könnte.

Entsprechend dieser Vorgaben und aktueller wissenschaftlicher Ergebnisse, die den negativen Einfluß von Neozoen belegen, den Schaden aber oftmals nicht quantifizieren und vorherberechnen können, bedarf es der Formulierung von Regelungen, die das Ausbringen von artgleichen Neozoen betreffen und sich auf verschiedene Vorsichtsmaßnahmen beziehen, die sich eher am Vorsorgeprinzip als am Risikoprinzip orientieren sollten.

Um die eventuell gefährdete phylogeographische Einzigartigkeit der durch Ausbringung potentiell gefährdeten Populationen, zu beurteilen, sollten ESU's (Evolutionary Significant Units) für die betroffenen Tierarten identifiziert werden. Auf deren Basis sollten in einem gesellschaftlichen Prozess OCU's (Operational Conservation Units) definiert werden, denen ein bestimmender Schutzstatus zugesprochen wird, und auf den bei Ausbringen von Neozoen Rücksicht genommen wird.

Konkret bedeutet dies für die Bachforelle und den Seesaibling, daß

(1) zur Definition von ESUs weitergehenden Untersuchungen unternommen werden sollte, wobei besonderes Augenmerk auf die verschiedenen Populationen des alpinen Seesaiblings in Deutschland, Österreich und der Schweiz gelegt werden sollte, von denen einige mit hoher Wahrscheinlichkeit Artstatus besitzen und deshalb als nationale Endemiten überregionales Interesse erregen.

Weiterhin bedeutet dies für die untersuchten Organismen, daß

(2) die Erarbeitung einer modernen gesellschaftlichen Übereinkunft aller Interessensgruppen zur Schutzwürdigkeit lokaler Salmonidenpopulationen („OCU's": Operational Conservation Units) und zur gesetzlichen Regelung allochthoner Introgression auf der Basis von ESUs vorangetrieben werden muss, um einen langfristigen Schutz zu erreichen. Dieser Prozess sollte von unabhängigen Fachleuten koordiniert werden. Schließlich

(3) bedarf es auf der Basis der definierten ESUs und gesellschaftliche abgeleiteten OCUs der Erarbeitung lokal angepasster Kontroll- und Managementstrategien zur Besatzpolitik, wobei ein Mehrstufenplan skizziert wird, um die lokale Diversität der Bachforelle und des alpinen Seesaiblings langfristig vor gewolltem oder ungewollten negativen Neozoeneinfluß ausreichend zu schützen.

Im Bezug auf transgene Salmoniden wird im Analogieschluss vom Besatz von Wildpopulationen mit allochthonem aber artgleichen Material im Rahmen des Vorsorgeprinzips vorgeschlagen, bei der gewollten Ausbringung oder bei Hälterungsanlagen mit Ausbruchrisiko ausschließlich auf fortpflanzungsunfähige Stämme zurückzugreifen. Diese müssen gegebenenfalls entwickelt und propagiert werden.

7 Summary

Using the example of stocking natural populations of two commercially important fish species (brown trout *Salmo trutta*, alpine charr *Salvelinus umbla*) with allochthonous conspecific material we investigated the question whether and how strong stocking affects the genetic population structure of autochthonous populations in natural water bodies in Bavaria. Therefore, we probed almost 50 brown trout populations (approx. 1600 Individuals) and 10 alpine charr populations (approx. 300 Individuals) from water bodies with a different stocking history. These probes were later analysed with modern genetic markers (mitochondrial DNA haplotypes and microsatellites). The analysis served on the one hand to detect and understand the original patterns of evolutionary significant relationships among natural populations (phylogeographic patterns). In this context we additionally analysed approximately 400 individuals of sculpins (*Cottus gobio*), a species that lives in the same environment as the brown trout, but whose populations were never or only extremely rarely stocked with allochthonous material. On the other hand, we used natural environmental variables (e.g. the size of drainage) or anthropogenically determined environmental variables (e.g. stocking) to investigate the question, whether stocking *independent from the aforementioned variables* has led to a loss of phylogeographic identity or to the alteration of any other population-genetic characters of the investigated autochthonous populations.

To measure the degree of stream-specific biotic integrity for each habitat, we developed an "Index of Biotic Integrity" (IBI) for the probed streams. In contrast to previously existing IBI's, e.g. Karr's IBI (1981), the newly developed one should be able to evaluate small and species-poor biocoenoses of bavarian mountain-streams on the basis of their fish species composition. On the basis of a literature survey and first observations in the field, we established a list of potential criteria for a "troutstream-IBI" with an emphasis on criteria that characterise the population structure of the dominant fish species in these biota, the brown trout.

To investigate the evaluative power of a potential troutstream-IBI on the basis of 10 preselected criteria, we sampled fishes from 34 mountain streams in Bavaria using electrofishing-gear. In order to evaluate the 34 locations independently, we determined for each stream the commonly used "Index of Saprobity", the "state of acidity" as well the "negative chemical load" by using standardised criteria. A correlation-analysis as well as a qualitative evaluation was then used to analyse the power of each of the 10 preselected criteria to detect environmental degradation in troutstreams. This procedure resulted in the selection of 7 out of 10 criteria, which correlated positively with the waterbody-quality. These 7 criteria were therefore used to construct a modified troutstream-IBI, which again was evaluated by correlation analysis with "overall water

body quality", which was independently calculated from the non-fish data. This modified troutstream-IBI correlated with 55,8% with the "overall water body quality" (Spearman's Korrelation $p < 0,001$, $n = 31$). The correlation increased to significant 60,1%, if we coded the IBI-classes into 4 classes and not continuously. The correlation further increased to 70,6%, if only organic-toxically loaded streams were analysed. We therefore showed that the troutstream-IBI detects anthropogenically caused degradation of overall water body quality, and therefore used the troutstream-IBI to classify all troutstreams, which were sampled during the populationgenetic survey. However, to establish our newly developed IBI as a general tool for the evaluation of environmental degradation of small streams, further research is needed to understand the effects of season, region and the effect of interannual fluctuations on the troutstream-IBI.

In the main part of the project up to 1612 brown trouts from almost 50 populations and hatcheries were genetically typed in order to understand the phylogeographic structure of bavarian populations and correspondingly to estimate the potential loss of phylogeographic identity which may be caused by stocking with allochthonous brown trout individuals. For the mitochondrial analysis we used two techniques of analysis, i.e. mitochondrial restriction length polymorphisms (RFLP's) and direct DNA sequencing. The results confirm the previously described presence of only two of five major brown trout mt-DNA lineages in Bavaria, namely the "atlantic" and the "danubian" lineage. Both lineages do coexist in almost all investigated populations. The large number of the sampled populations enabled us to compare the genetic structure of populations of each of three major drainages in Bavaria (Main/Rhein, Elbe and Danube) and to use statistical analyses to investigate significantly different patterns of haplotype-frequencies. We found in all investigated drainages both major mitochondrial lineages, which we were able to further differentiate on the level of the RFLP's into 14 different haplotypes. Danubian haplotypes were extremely rare in the atlantic drainages Main and Elbe, whereas atlantic haplotypes dominated not only in the atlantic but in the danubian drainages too.

The analysis of stocking impact on the genetic diversity of bavarian populations rendered it likely that in the Upper Danube a natural contact-zone of the two mt-lineages exists. This, because unstocked or almost unstocked danubian populations showed a dominance of atlantic haplotypes, and because we found in the danubian Ilz-subdrainage mt-haplotypes of atlantic affinities, which however differed from all other atlantic haplotypes and may therefore be endemic in the danubian drainage.

The stocking impact on the mitochondrial DNA-diversity was analyzed together with the second set of genetic markers, the microsatellites. Most of the individuals which were analysed for mt-DNA diversity were typed for 5 different microsatellites. As expected, the microsatellite-diversity

was much higher than for the mt-DNA-lineages. Besides several other analyses we subjected the individual microsatellite-genotypes to a “self-assignment analysis”, where each individual genotype is assigned to one of the 50 populations according to the independently calculated likelihood that the individual genotype is present in one of these populations. The percentage of “correct” assignation of individuals to their own population or meta-population may therefore be used as a measurement of phylogenetic integrity for a given population. This, however, only if the effect of other genetic parameters, stocking history, geographic and environmental parameters partialled out.

To account simultaneously for a diversity of effects on the genetic and phylogeographic identity, we used Canonical Correspondence Analysis (CCA) to analyse which of the aforementioned parameters affected genetic diversity of a given population. The results show, that the drainage pattern affected the genetic variance independent of stocking history and environmental parameters. It defined geographically defined population-units, which are clearly discernable for bavarian brown trouts and therefore may be used for the definition of ESU's (*evolutionary significant units*). This, because they correspond to the definition ESU's in the way that they describe populations or groups of populations, which are reproductively isolated from other conspecific populations, and because they represent an important part of the evolutionary history of brown trout populations in Bavaria. The bavarian ESU's refer to populations of the following drainages: On the level of the three major drainages Elbe, Danube and Rhein-Main all are differentiated significantly. Within these major drainages the upper and lower Danube are differentiated significantly as well as the Ilz-drainage in the danubian realm of the Bavarian Forest, the Wiesent drainage in the Main, as well as the Rodach-drainage, both in the Main-drainage of Oberfranken. Whether the phylogeographic identity of populations in other regions is nowadays destroyed due to stocking, or whether it was never existing, is not discernable with our data set. However, we consider the probability of a widespread destruction as being high. This, because it is suggested by the analysis of stocking impact using CCA. The results show significantly that already medium and especially strong stocking (as measured as stocking impact probability) independent of geographic or environmental parameters contributes significantly to the destruction of the phylogeographic identity of populations. This result is evident from the results of the self-classification analysis, which showed that in unstocked or almost unstocked streams most individuals (between 70 and 95%) were classified correctly to their own population or to a neighbouring one from the same subdrainage. However, in medium and strongly stocked populations the self-classification rate dropped to low values, which even went down to 0 %. This result was confirmed by several independent analyses of the complete data set. Astonishing was the fact, that the low self-classification rates were detected, although the stocking impact on the overall genetic variance in terms of e.g. allelic diversity accounted for

only 8 %. We conclude from this result that already a relatively low degree of introgression can lead to a drastic destruction of phylogeographic integrity.

A comparative part of the project which concerned the phylogeography of sculpins (*Cottus gobio*) in Europe yielded the following results, which are presented in comparison with already known phylogeographies of other european freshwater fishes. From these previous studies several phylogeographic patterns could be extracted. (1) A colonisation of central Europe mostly came from the east and originated in the area of the Black or Caspian See. (2) The southeast of Europe represents an important pleistocene refugium and therefore a high molecular diversity. (3) The recolonisation of parts of Scandinavia originated in central Europe and took place via the Baltic Sea. In contrast to these findings, the sculpins apparently survived during the pleistocene in central Europe and in Bavaria too. Sculpins are therefore different in their phylogeographic history from all other investigated fish species as the brown trout, the chub (*Leuciscus cephalus*) and the perch (*Perca fluviatilis*). Corresponding to their long history of population-differentiation, the phylogeographic pattern of sculpin-populations is not only different from other fishes, but is resolved much finer. In accord with the low migration-tendency of sculpins the long history of sculpin populations in central Europe resulted in a mosaic of a number of discrete evolutionary lineages, which is highlighted by the fact that even single streams and subdrainages harbor genetically distinct sculpin-populations. A more detailed research about this topic would be interesting and necessary to understand the mechanisms of population-differentiation and maintenance of boundaries between adjacent populations for sculpins. Only those investigations would allow to define ESU's for sculpins. Because of the unexpectedly distinct sculpin-population history, the phylogeography of the european sculpin could not be used as an unimpacted analogy to the phylogeography of the brown trout in Bavaria.

A second comparative part of the project investigated the phylogeography and stocking impact of the alpine charr, where 9 populations of the danubian drainage in Bavaria and Austria and one from the rhenanian drainage (Bodensee) were molecularly characterised using micro-satellites and mt-DNA sequencing of the D-loop-region. The population-genetic analysis of the microsatellite-data showed, that all populations of the danubian realm were differentiated significantly from each other, and neighbouring lakes from the same subdrainage were more similar to each other than to those from other subdrainages. The analysis of the D-Loop-region resulted in the recognition of 17 mt-haplotypes, where one of these was very common and eight other were detected in 8 out of 10 populations. All other haplotypes were detected only in very low frequencies in single lakes or in a set of lakes in close neighbourhood. The only and important exception concerns the aberrant population of the Ammersee, which differs morphologically from the other investigated populations. This population was characterised

exclusively by 4 "endemic" haplotypes, which were not found in any other population. This result accounts for the assumption that this population represents a yet undescribed species, which is endemic for the bavarian Ammersee. The results from the analysis of the microsatellite loci confirm and extend the results of the mitochondrial analysis and show, that the extant populations derive from one original founder population, which diversified allopatrically during the last 12000 years. To analyse the stocking impact, the results of the phylogeographic analysis were compared with a self-assignment analysis on the basis of microsatellite allele-frequencies. This analysis showed, that stocking with allochthonous material into large intact lacustrine populations affected these populations only marginally. On the other hand we rendered it likely for the population of the Starnberger See, that the temporary deterioration of the lake's environment combined with strong stocking during that period may have fostered an increased rate of introgression into the remnants of the autochthonous charr population. Again for this side-project, more research on more populations and more individuals are needed, in order to confirm our preliminary results.

In the discussion we elaborate

- (1) potentials and limitations in the ability to estimate negative consequences of stocking
- (2) the role of anthropogenically provoked changes in the environment on the speed of introgression of allochthonous genetic material
- (3) a general consideration concerning the negative consequences of stocking or escape of transgenic salmonids in natural populations, and
- (4) transferability of our results concerning the phylogeography of one species as a basis for the definition of ESU's of a second species

(1) We highlight for the phylogeography of the brown trout, that the upper Danube represents a contact-zone of two different phylogenetic lineages, the atlantic and the danubian. According to our analyses a large proportion of atlantic lineages in the danubian realm must be of natural origin. Although we find a phylogeographic structure for brown trout populations in Bavaria, we however, cannot exclude the possibility that a large proportion of fine-grained phylogeographic structure is already lost due to stocking. How big this loss may be cannot be estimated. However, the results from intact subdrainages and from a literature survey suggest that subdrainage-specific phylogeographic identities, as we found e.g. for the populations of the Ilz, the Wiesent and the Rodach, were more the rule than the exception. Because of the aforementioned causalities, we conclude, that the consequences of negative stocking impact on the regional phylogeographic identity of populations can only be estimated using the remnants of a potential former diversity. This should be possible as long as within a given subdrainage there

is a chance that at least a few rather unstocked subpopulations exist, which represent the original autochthonous genetic composition. General population-genetic characteristics of single populations (i.e. out of their phylogeographic context; e.g. number of alleles per population, deficit of heterozygosity etc.) do not allow conclusions about the stocking impact. This, because too many factors may influence these characteristics independently, and to interpret these data, comparative data are needed.

(2) According to the assumption that locally adapted populations exist, one may hypothesize that autochthonous individuals should have a higher fitness in comparison with introduced allochthonous ones, as long as the conditions which selected for the local adaptations persist and are not altered, e.g. by anthropogenic habitat alterations. To test this hypothesis, we developed and evaluated specifically for the project an "Index of Biotic Integrity" ("troutstream-IBI"), which was used to quantify trout-specific waterbody-quality in all investigated waters. Several multifactorial analyses did not detect any linear relationship between the loss of biotic integrity and the loss of phylogeographic identity of stocked populations. Therefore, the hypothesis was not supported by our data. Nevertheless, environmental degradations may influence the fitness of allochthonous versus autochthonous populations, if these degradations are extreme. Our results concerning the alpine charr suggest, that negative environmental changes influenced the rate of introgression of allochthonous material into the remnant autochthonous charr-population of the Starnberger See. This, since our results showed that the phylogeographic integrity of the environmentally induced decimation of the Starnberger See charr most likely was destroyed by a dominance of allochthonous charr. However, as long as environmental conditions vary only slightly, as was the case in most of the other investigated charr-lakes, local adaptations appear to enable autochthonous populations to outcompete allochthonous ones in lakes. Similar effects as in the Starnberger See may play a role in brown trout populations. Unfortunately, we had included in our sample of brown trout populations only very few, which derived from strongly degraded streams. Therefore, a potentially existing environmental effect on the rate of introgression with allochthonous material may have remained hidden in our analysis.

(3) Transgenic brown trout or charr, which correspond in their genetic architecture to the wild-type except for the implanted genes, are comparable in all other aspects with their conspecifics. Having a view on the results presented in this report, we see no reason for any assumption, which would suggest, that stocking or uncontrolled escapes will *not* result into the introgression of transgenic material into natural populations.

(4) Our results concerning the comparative phylogeography of the brown trout and of the sympatric sculpin showed clearly and unexpectedly, that the glacially influenced bavarian part of central Europe is colonized by animals, whose local and sympatric populations had a very different phylogeography from each other. Therefore it is evident, that the analysis of the phylogeographic structure of one species is not transferable without caution to species of the same region and of the same biota, especially if one wants to define ESUs.

According to the results and to the discussion we come to several general and specific recommendations concerning the regulation and control of stocking of conspecific neozoa, includes transgenic and conspecific organisms. Using these general recommendations we were able to deduct specific recommendations for the investigated organism, especially the brown trout. These specific recommendations may be transferable via analogy to other organisms.

According to our results and considerations a demand for regulation may - according to different priorities - arise, if

- (1) the introgression may lead to the loss of characteristics of a population or to the loss of the complete population
- (2) the introgression may lead through introgressed maladaptive characters and/or through "outbreeding depression" to the complete extinction of locally adapted populations, and
- (3) the introgression may lead to the loss of potentially usable characters of commercial value of the genetic reservoir of the respective autochthonous population.

According to these suggestions and according to actual scientific results, which showed the often negative influence of neozoa on autochthonous populations, but which are rarely able to quantify and anticipate the actual loss, there is obviously a demand for regulations concerning the stocking with conspecific neozoa. These regulations should refer to the principle of caution rather than to the principle of risk.

In order to evaluate the phylogeographic uniqueness of populations, which are going to be faced with allochthonous stocking, *evolutionary significant units* (ESU's) should be identified for species with potentially endangered populations. On this basis, *operational conservation units* (OCU's) should be elaborated by consulting all relevant groups of the society. These OCU's should be classified according to their status of protection. According to this status, the stocking of conspecific neozoa is then regulated.

In terms of specific recommendations as deduced from the aforementioned general recommendations, we suggest for the brown trout and the alpine charr, that

(1) additional investigations should be undertaken to define ESU's for these two taxa, whereby specific emphasis should be laid on several populations of the alpine charr in Germany, Austria and Switzerland. This, because some of those "populations" most likely represent undescribed species, which are of increased importance as they would be national endemics.

(2) the elaboration of a modern consensus of all important and relevant groups in the society should be forced – a consensus that defines the status of protection for salmonid-OCU's in a given region as well as legal regulations for protection of these OCU's. All this must be done on the basis of the previously defined ESU's. Only a rapid action can safeguard a longlasting protection of important salmonid populations in Europe. This process should be coordinated by independent and competent persons, and not by fisheries personal. Finally,

(3) there is a need on the basis of the previously defined ESU's and the derived OCU's for the elaboration of locally adapted control- and management-strategies for the politics of stocking. This should be done according to a plan with several steps, which is drafted in this report. In our view, only such a plan may safeguard the local biodiversity of brown trout and alpine charr in Germany, which is otherwise faced with a continued loss due to stocking.

Concerning the handling and stocking of transgenic salmonids, we suggest in analogy to the stocking with allochthonous but conspecific wild-type salmonids to follow the principle of caution. A way to follow this principle is use exclusively infertile stocks for stocking, and for handling and breeding, to use exclusively hatcheries, which are absolutely safe in terms of possibilities of uncontrolled escapes. The respective stocks or hatcheries should be developed quickly.

8 Zusammenarbeit mit anderen Stellen / Danksagung

Dieses Projekt wäre ohne die oftmals tatkräftige Mithilfe der Fischereiberechtigten, Eigentümer oder Pächter der untersuchten Gewässer nicht möglich gewesen. Falls jemand in der folgenden Liste nicht genannt ist, aber bei einer Befischung mitgeholfen hat, möge er sich trotzdem angesprochen fühlen: Herr Böhmer (Rott am Lech), Herr Mörth (Rott am Lech), Herr Mittermaier (Fischereiverein Straubing), Herr Zeimens (Forstdienststelle Wessobrunn), die Pächter der Fischzucht Schönwag, Herr Döppel (Raisting), Herr Wimberger (Fischereiverein Hengersberg), Herr Wurm (Forstdienststelle im Einzug der Kalten Moldau (Haidmühle)), Herr Vogler (Fischereiverein Naila), Herr Engelhardt (Lautertal), die Herr Wegner und Brückner (Rödental), Herr Herman Wich (Kreisfischereiverein Kronach), Herr Zeitler (Fischereiverein Obere Saale), Herr Eberhard Kotschenreuther (Stadtsteinach), Herr Unterburger (Gemeinde Weidenberg), Herr Heinlein (Ahorntal), Herr Rennhack (Sportfischereiverein Marktleuthen), Herr Ruckdeschel (Forstamt Selb) und Herr Forstmeier (Schwaben).

Mitglieder der Fischereifachberatungen von Oberfranken und Niederbayern und Schwaben, sowie die Bayerische Landesanstalt für Fischerei in Starnberg und das Landesamt für Wasserforschung und Gewässerökologie in Wielenbach haben bei der Vorbereitung, Genehmigung, Durchführung und Auswertung tatkräftig mitgeholfen. Ohne die vielen „grauen“ Informationen wären wir zu vielen Proben, aber auch zu vielen Informationen nicht gelangt. Besonders danken möchte ich in diesem Zusammenhang Herrn Dr. Klupp, Herrn Leopold Mayer und Herrn Dr. Schadt von der Fischereifachberatung Oberfranken in Bayreuth, Herrn Dipl.-Ing. Joseph Hoch, Herrn Dr. Harsanyi und Herrn Lehner von der Fischereifachberatung Niederbayern in Landshut, Herrn Dr. Bohl und Herrn Ott von der Landesanstalt für Wasserforschung in Wielenbach, und Herrn Dr. Eberhard Leuner und Herrn Dr. Klein von der Landesanstalt für Fischerei in Starnberg.

Den Nationalparkverwaltungen Bayerischer Wald und Berchtesgaden sei für die Genehmigung zur Entnahme von Proben (auch in einer Tiefe von fast 190 m) gedankt. Die meisten Saiblingsproben wurden von jeweiligen Berufsfischerfamilien zur Verfügung gestellt, vor allem „den Amorts“ (Königssee), „den Rauchs“ (Ammersee, Plansee und Heiterwanger See), „den Hubers“ (Starnbergersee). Besonders die Aktionen „Grünsee“ und „Obersee“ waren ein Genuss an Zusammenarbeit! Andere Berufsfischer hätten gerne gegen viel Geld aber ohne Rechnung und in Zusammenarbeit mit der Fachberatung für Fischerei Oberbayern einige Saiblinge geliefert.

Herrn Dr. Alfred Jagsch, Herrn Dr. Weiss und Herrn Dr. Hansen sind wir für die glänzende Zusammenarbeit mit dem österreichischen beziehungsweise dänischen Nachbarland verbunden.

Ohne die technische Unterstützung von Bianka Hartung hätten wir die Mikrosatellitentypisierung der fast 10000 Mikrosatellitenamplifikationen nicht zustande gebracht. Vielen Dank, liebe Bianka! Gleicher Dank an Susanne Krächter für Bilder, Bilder, Bilder ...

Last not least, wäre dieser Bericht in dieser Form ohne die ausgezeichnete Unterstützung von Barbara Knauer (Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie Seewiesen) nicht möglich gewesen. Ebenso danke ich (US) Herrn Prof. Wickler für die großzügige Überlassung eines Arbeitsplatzes zum Zusammenschreiben und Auswerten im MPI Seewiesen.

9 Literaturverzeichnis

- Altermann M (1981) Die Entwicklungsgeschichte der Erde (ed. Hohl R), pp. 385-398. Edition Leipzig, Verlag für Kunst und Wissenschaft.
- Andreasson S (1972) Distribution of *Cottus poecilopus* Heckel and *C. gobio* L. (Pisces) in Scandianvia. Zoologica Scripta, 1, 69-78.
- Angermeier, PL & J Karr (1986) Applying an index of biotic integrity based on stream-fish communities: considerations in sampling and procedure. North Am. J. of Fish. Man. 6; S. 418-429
- Angers B, Bernatchez L, Angers A, Desgroseillers (1995) Specific microsatellite DNA loci for brook charr reveal strong population subdivisions on a microgeographic scale. Journal of Fish Biology, 47 (Suppl. A), 177-185.
- Angers B, Magnan P, Plante M & Bernatchez L (1999) Canonical correspondence analysis for estimating spatial and environmental effects on microsatellite gene diversity in brook charr (*Salvelinus fontinalis*) Molecular Ecology 8, 1043-1053
- Antunes, A, Alexandrino, P & Ferrand, N (1999) Genetic characterization of Portuguese brown trout (*Salmo trutta* L.) and comparison with other European populations. Ecology of Freshwater Fish 8:194-200.
- Apostolidis A P, Triantaphyllidis C, Kouvatsi, A & Economidis PS (1997) Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L. (Greek brown trout) populations. Molecular Ecology 6, Seiten 531-542.
- Apostolidis, A, Karakousis, Y & Triantaphyllidis, C (1996) Genetic and phylogenetic relationships among *Salmo trutta* L. (brown trout) populations from Greece and other European countries. Heredity 76:551-560.
- Bacescu M & Bacescu-Mester L (1964) *Cottus petiti* sp. n. un chabot nouveau recolte en France. Vie Milieu, Suppl 17, 432-446
- Backiel, T & Le Cren, E (1978) Some density relationships for fish population parameters. Ecology of freshwater fish production (ed. S.D. Gerking), 279-302. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Banarescu P (1990) Zoogeography of Freshwaters Vol.1, General Distribution and Dispersal of Freshwater animals. Aula Verlag, Wiesbaden.
- Banarescu, P. (1991) Zoogeography of the Fresh Waters. Distribution and dispersal of freshwater Animals in North America and Eurasia. Wiesbaden: Aula. 1094 Seiten.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 16, 37-48.
- Bandelt HJ, Forster P, Sykes BC, Richards MB (1995) Mitochondrial portraits of human populations using median networks. Genetics, 141, 743-753.
- Baran, P, Delacoste, M, Lascaux, J, Dauba, F, Segura, G (1995) La compétition interspécifique entre la truite commune (*Salmo trutta* L.) et al truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum): influence sur les modèles d'habitat. Bull. Fr. Pêche; 337/338/339: 283-290
- Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft (1992) Bestimmungsschlüssel für die Saprobier-DIN-Arten (Makroorganismen). Informationsbericht 2/88
- Behnke RJ (1980) A systematic review of the genus *Salvelinus*. In: Charrs: Salmonid Fishes of the Genus *Salvelinus* (ed. Balon EK), 441-480. Dr. W. Junk, The Hague.
- Behnke RJ (1972) The systematics of salmonid fishes of recently glaciated lakes. Journal of Fisheries Research. Bd Can. 29, 639-671.

- Behnke RJ (1984) Organizing the Diversity of the Arctic Charr Complex. p. 3-21. In: L. Johnson & BL Burns [eds.] Biology of the Arctic charr, Proceedings of the International Symposium on Arctic Charr, Winnipeg, Manitoba, May 1981, Univ. Manitoba Press, Winnipeg.
- Bernatchez L, Danzmann RG (1993) Congruence in control-region sequence and restriction site variation in mitochondrial DNA of brook char (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). Molecular Biology and Evolution, 10, 1002-1014.
- Bernatchez L, Guyomard R, 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.
- Bernatchez L, Osinov A (1995) Genetic diversity of trout (genus *Salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear variation. Molecular Ecology, 4, 285-297.
- Bernatchez, L (1995) A role for molecular systematics in defining significant evolutionary units. In: Nielsen JL & Powers DA (eds) Evolution and the aquatic ecosystem: defining unique units in population conservation. American Fisheries Society Symposium 17, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, 114-132
- Beverton, RJH. & Holt, SJ (1957) On the dynamics of exploited fish populations. Fishery Investigations, London Series 2; 19, 1-533
- Bless, R (1990) Die Bedeutung von gewässerbaulichen Hindernissen im Raum-Zeit-System der Groppe (*Cottus gobio*). Natur und Landschaft. 65. Jg. (12):581-585
- Bocard D, Legendre P & Drapeau P (1992) Partialling out the spatial component of ecological variation. Ecology 73, 1045-1055
- Bohl, E (1993) Rundmäuler und Fische im Sediment. Ökologische Untersuchungen an Bachneunauge (*Lampetra planeri*), Schlammpeitzger (*Misgurnus fossilis*) und Steinbeißer (*Cobitis taenia*) in Bayern. Bayerische Landesanstalt für Wasserwirtschaft. Bericht 22
- Boling, RH, Peterson, RC & KW Cummins (1975) Ecosystem modelling for small woodland streams. S. 183-204 in B.C. Patten, ed.. Systems analysis and simulation in ecology. Vol.3. Academic Press, New York
- Bouza, C, Arias, J, Castro, J, Sánchez, L & Martínez, P (1999) Genetic structure of brown trout, *Salmo trutta* L., at the southern limit of the distribution range of the anadromous form. Molecular Ecology 8, in press.
- Bramblett & Fasch (1991) Variable fish communities and the index of biotic integrity in a Western Great Plain river. Transactions of the American Fisheries Society 120: 752-769
- Braukmann, U (1992) Biological indication of stream acidity in Baden-Württemberg by the use of macroinvertebrates. In: Böhmer, J. & Rahmann, H.: Bioindikationsverfahren zur Gewässerversauerung- Literaturstudie.- Projekt angewandte Ökologie, Heft 3: 58-71, Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe
- Brehm, J & Meijering, PD (1994) Fließgewässerkunde. 3. Auflage. Biologische Arbeitsbücher. Quelle und Mayer. Heidelberg
- Brett, J R, Shelbourn, J & Shoop, C (1969) Growth rate and body composition of fingerling sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, in relation to temperature and ration size. Journal of Fisheries Research Board of Canada. 26: 2479-2394
- Brohmer, P (1988) Fauna von Deutschland. 17. Auflagen. Quelle & Meyer Verlag, Wiesbaden.
- Brown WM, George M Jr., Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 76, 1967-1971.
- Brownstein MJ, Cartpen JD, Smith JR (1996) Modulation of Non-Templated Nucleotide Addition by Taq DNA Polymerase: Primer Modifications that Facilitate Genotyping. Biotechniques, 20, 1004-1010.

- Brunner PC, Douglas MR, Bernatchez L (1998) Microsatellite and mitochondrial DNA assessment of population structure and stocking effects in Arctic charr *Salvelinus alpinus* (Teleostei: Salmonidae) from central Alpine lakes. *Molecular Ecology*, 7, 209-223.
- Buhse, G (1973) Versuche mit Elektrofischfanggeräten zur Güteklassifizierung der Gewässer, dargestellt am Beispiel der Ems und der Weser. Göttingen: Neues Archiv für Niedersachsen, Band 22, Heft 3, S. 259-268
- Cockerham CC (1969) Variance of gene frequencies. *Evolution*, 23, 72-84.
- Cockerham CC (1973) Analyses of gene frequencies. *Genetics*, 74, 679-700.
- Cornuet JM, Piry S, Luikart G, Estoup A, Solignac M, (1999) Comparison of methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. (Artikel eingereicht)
- Crozier, WW & Ferguson, A (1986) Electrophoretic examination of the population structure of brown trout, *Salmo trutta* L., from the Lough Neagh catchment, Northern Ireland. *J. Fish Biol.* 28, Seiten 459-477.
- Danzmann RG, Ferguson MM, Skulason S, Snorrason SS, Noakes DLG (1991) Mitochondrial DNA diversity among four sympatric morphs of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L, from Thingvallavatn, Iceland. *Journal of Fish Biology*, 39, 649-659.
- Davis, J (1975) Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*: 32, S. 2295-2332.
- Dodson, JJ, Gibson, RJ, Cunjak, RA, Friedland, KD, Garcia de Leaniz, C, Gross, MR, Newbury R, Nielsen, JL, Power, ME & Roy, S (1998) Elements in the development of conservation plans for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55:312-323.
- Downhower, JF, Gaudin, P & Brown, L (1990) Movements of the Chabot (*Cottus gobio*) in a small stream. *Polsky Archiwum Hydrobiologii*. 37 (1-2): S.119-126
- Durand JD, Persat H, Bouvet Y (1999) Phylogeography and postglacial dispersion of the chub (*Leuciscus cephalus*) in Europe. *Molecular Ecology*, 8, 989-997.
- Elliott, JM (1984) Growth, size, biomass and production of young migratory trout *Salmo trutta* in a Lake District stream, 1963-83. *Journal of Animal Ecology*, 53, 979-994.
- Elliott, JM (1985) Growth, size, biomass and production for different life-stages of migratory trout *Salmo trutta* in a Lake District stream, 1966-83. *Journal of Animal Ecology*, 54, 985-1001.
- Elliott, JM (1994) Quantitative ecology and the brown trout. *Oxford Series in Ecology and Evolution*, Oxford University Press, Oxford, Great Britain, 286 pp.
- Embelton C (1984) West and Central European lowlands. In: *Geomorphology of Europe*, pp. 154-164. The Macmillan Press Ltd.
- Englbrecht CC, Freyhof J, Nolte A, Rassmann K, Schliwen U, Tautz D (2000) Phylogeography of the bullhead *Cottus gobio* (Pisces: Teleostei: Cottidae) suggests a pre-Pleistocene origin of the major central European populations. *Molecular Ecology*. 9, 709-722.
- Estoup A, Rousset F, Michalakis Y, Cornet J-M, Adriamanga M, Guyomard R (1997) Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology*, 7, 339-353.
- Estoup, A., Rousset, F., Michalakis, Y., Cornuet, J.-M., Adriamanga, M. & Guyomard, R. 1998. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology* 7:339-354.

- Excoffier L & Smouse (1994) Analysis of variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-471
- Eyre-Walker A, Smith NH, Smith JM (1999) How clonal are human mitochondria. *Proceedings of the Royal Society London B*, 7, 477-483.
- Fahy, E (1985) Cyclic fluctuations in the abundance of trout *Salmo trutta* L.. *Archiv für Hydrobiologie*, 70, 404-428.
- FAO/UNEP (Food and Agriculture Organization, United Nations, and Environmental Program) (1981) Conservation of the genetic resources of fish: Problems and recommendations. Report of the Expert Consultation on the Genetic Resources of Fish, Rome, 9-13 June 1980. FAO Fisheries Technical Paper 217, 43 pp.
- Fausch, KD & LH Schrader (1987) Use of the index of biotic integrity to evaluate the effects of habitat, flow, and water quality on fish communities in three Colorado Front Range streams. Final Report to the Kodak-Colorado Division and the Cities of Fort Collins, Loveland, Greeley, Longmont, and Windsor. Department of Fishery and Wildlife Biology, Colorado State University, Fort Collins.
- Fausch, KD, Karr, JR & Yant, PR (1984) Regional application of an index of biotic integrity based on stream-fish communities. *Transactions of Am. Fish. Society* 113, 39-55
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Ferguson, A. & Fleming, CC (1983) Evolutionary and taxonomic significance of protein variation in the brown trout (*Salmo trutta* L.). In Oxford, G.S. and Rollinson, D. (eds.). *Protein Polymorphism: Adaptive and Taxonomic Significance*. London Academic Press 24:85-99.
- Ferguson, A & Taggart, JB (1991) Genetic differentiation among the sympatric brown trout (*Salmo trutta*) populations of Lough Melvin, Ireland. *Biological Journal of the Linnean Society* 43:221-237.
- Gammon, JR, Spacie, A, Hamelink, JL & R L Kaesler (1981) The role of electrofishing in assessing environmental quality in the Wabash River. American Society of Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania
- Garcia-Marin, JL & Pla C (1996) Origins and relationships of native populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Heredity* 76:313-323.
- Garcia-Marin, JL, Utter, FM & Pla, C (1999a) Postglacial colonization of brown trout in Europe based on distribution of allozyme variants. *Heredity* 82:46-56.
- Garcia-Marin, JL, Sanz, NR & Pla, C (1999b) Erosion of the native genetic resources of brown trout in Spain. *Ecology of Freshwater Fish* 8:151-158.
- Gatz, A, Sale, M & Loar, J (1987) Habitat shifts in rainbow trout: influence of brown trout. *Oecologia* 74, 7-19
- Giuffra E, Bernatchez L, 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.
- Giuffra E, Guyomard R, Forneris G (1996) Phylogenetic relationships and introgression patterns between incipient parapatric species of Italian brown trout (*Salmo trutta* L. complex). *Molecular Ecology*, 5, 187-198.
- Goudet J (1999) FSTAT, a program for IBM PC compatibles to calculate Weir & Cockerham's (1984) estimators of F-statistics (version 27b).
- Gowan, C, Young, M, Fausch, K & S Riley (1994) Restricted movement in resident stream salmonids: a paradigm lost? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, Vol. 51, 1994

- Greenwood AD, Pääbo S (1999) Nuclear insertion sequences of mitochondrial DNA predominate in hair but not in blood of elephants. *Molecular Ecology*, 8, 133-137.
- Hagelberg E, Goldman N, Lio P, Whelan S, Schiefenhoevel W, Clegg JB, Bowden DK (1999) Evidence for mitochondrial DNA recombination in a population of island Melanesia. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 266, 485-492.
- Haldane, J (1956) The relation between density regulation and natural selection. *Proceedings of The Royal Society B*, 145, 306-8.
- Hamilton, KE, Ferguson, A, Taggart, JB, Tomasson, T, Walker, A & Fahy, E (1989) Post-glacial colonization of brown trout, *Salmo trutta* L.: Ldh-5 as a phylogeographical marker locus. *Journal of Fish Biology* 35:651-664.
- Hamor, T & Garside, E (1975) Regulation of oxygen consumption by incident illumination in embryonated ova of Atlantic Salmon *Salmo salar* L.. *Comparative Biochemistry and Physiology*: 52, 277-280.
- Hamor, T & Garside, E (1976) Development rates of embryos of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in response to various levels of temperature, dissolved oxygen and water exchange. *Canadian Journal of Zoology* 54, 1912-1917
- Hänfling, B (1993) Wanderverhalten, Wachstumsparameter und Mortalität der Bachforelle *Salmo trutta m. fario* L. in zwei unterschiedlichen Gewässersystemen Oberfrankens und eine Betrachtung der begleitenden Fischfauna. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften; Lehrstuhl für Tierökologie. Universität Bayreuth.
- Hänfling, B (1996) Genetische Differenzierung von Populationen der Mühlkoppe und des Döbels in den nordbayerischen Einzugsgebieten von Rhein, Donau und Elbe. Bezirk Oberfranken. Fachberatung für Fischerei.
- Hänfling B, Brandl R (1998a) Genetic differentiation of the bullhead *Cottus gobio* L. across watersheds in Central Europe: evidence for two taxa. *Heredity*, 80, 100-117.
- Hänfling B, Brandl R (1998b) Genetic variability, population size and isolation of distinct populations in the freshwater fish *Cottus gobio* L.. *Molecular Ecology*, 7, 1625-1632.
- Hansen, M M & Loeschcke, V. (1996) Genetic differentiation among Danish brown trout populations, as detected by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. *Journal of Fish Biology* 48, Seiten 422-436.
- Hansen, MM & Mensberg, K-LD (1998) Genetic differentiation and relationship between genetic and geographical distance in Danish sea trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Heredity* 81:493-504.
- Hansen MM, Hynes RA, Loeschcke V & Rasmussen G (1995) Assessment of the stocked or wild origin of anadromous brown trout (*Salmo trutta* L.) in a Danish river system, using mitochondrial DNA RFLP analysis. *Molecular Ecology* 4:189-198.
- Hansen MM, Ruzzante, DE, Nielsen EE & Mensberg K-LD (2000a) Brown trout (*Salmo trutta*) stocking impact assessment using microsatellite DNA markers. *Ecological Applications*: in press.
- Hansen MM, Ruzzante, DE, Nielsen EE & Mensberg K-LD (2000b) Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery trout and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Molecular Ecology*: in press.
- Hantke R (1993) Flußgeschichte Mitteleuropas. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Harris, J. (1995) The use of fish in ecological assessments. *Australian Journal of Ecology*: 20, S. 65-80.
- Hartley SE, McGowan C, Greer RB, Walker AF (1992) The genetics of sympatric Arctic charr (*Salvelinus alpinus* (L.)) populations from Loch Rannoch, Scotland. *Journal of Fish Biology*, 41, 1021-1031.

- Hartmann J (1984) The Charrs (*Salvelinus alpinus*) Of Lake Constance, A Lake Undergoing Cultural Eutrophication. In: Johnson L and Burns BL (eds) Biology of the Arctic charr, Proceedings of the International Symposium on Arctic Charr, Winnipeg, Manitoba, May 1981, Univ. Manitoba Press, Winnipeg.
- Hecht W, Förster M, Prichner F (1992) Ökologisch-genetische Untersuchungen am Seesaibling (*Salvelinus alpinus*) im Königssee, Obersee und Grünsee im Nationalpark Berchtesgaden. In: Nationalpark Berchtesgaden, Fischbiologie des Königssees, Forschungsbericht 24, (hrsg.
- Hindar K, Jonsson B (1993) Ecological polymorphism in Arctic charr. Biological Journal of the Linnean Society, 48, 63-74.
- Hindar, K & Jonsson, B (1995) Impacts of aquaculture and hatcheries on wild fish. Philipp, D.P., Epifanio, J.M., Marsden, J.E. & Claussen, J.E. (eds.) Protection of aquatic biodiversity. Proceedings of the World Fisheries Congress, Theme 3. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Dehli, pp. 70-87.
- Hocutt & Stauffer (1980) Biological monitoring of fish. Lexington Books, Lexington, Massachusetts.
- Hoelzel AR, Hancock JM, Dover GA (1993) Generation of VNTRs and heteroplasmy by sequence turnover in the mitochondrial control region of two elephant seal species. Journal of Molecular Evolution, 37, 190-197.
- Hofer, R & Bucher, F (1993) Artspezifische Reaktionen von Fischen auf Schadstoffbelastungen. 3. Workshop in Innsbruck: Biologie und Gefährdung heimischer Kleinfischarten. Institut für Zoologie, Universität Innsbruck, Alpenzoo Innsbruck/Tirol
- Höll, K (1986) Wasser: Untersuchung, Beurteilung, Aufbereitung, Chemie, Bakteriologie, Virologie, Biologie. 7. Auflage, De Gruyter. Berlin. S.592 ff.
- Horton, P, Bailey, R & Wilsdon, S (1968) A comparative study of the bionomics of the salmonids of three Devon streams. Archiv für Hydrobiologie, 65, 187-204.
- Hughes, RM & JR Gammon (1987) Longitudinal changes in fish assemblages and water quality in the Willamette River, Oregon. Trans. Am. Fish. Soc. 116, 196-209
- Hynes, RA, Ferguson, A & McCann, MA (1996) Variation in mitochondrial DNA and post-glacial colonisation of north-west Europe by brown trout (*Salmo trutta* L.). Journal of Fish Biology 48:4-67.
- Illies, J (1955) Plecoptera. In: DAHL, Tierwelt Deutschlands 43, S. 1-150
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985a) Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. Nature, 314, 67-73.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985b) Individual-specific "fingerprints" of human DNA. Nature, 316, 76-79.
- Jenkins, T, Diehl, S, Kratz, K & Cooper, D (1996) Effects of population density on the growth of brown trout, *Salmo trutta*. (submitted)
- Jens G (1980) Die Bewertung der Fischgewässer. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.
- Johnson L (1980) The Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, 15-98. In E.K. Balon (ed) Charrs: salmonid fishes of the genus *Salvelinus*. Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
- Jonsson B, Hindar K (1982) Reproductive strategy of dwarf and normal Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from Vangsvatnet Lake, western Norway, Candian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 39, 1404-1413.
- Jonsson B, Skúlason S, Snorrason SS, Sandlund OT, Malmquist HJ, Jónasson PM, Gydemo R, Lindern T (1988) Life History Variation of Polymorphic Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*) in Thingvallavatn, Iceland. Canadian Journal of Aquatic Sciences, 45, 1537-1547.

- Karr J (1981) Assessment of Biotic Integrity Using Fish Communities. Fisheries (Bethesda): 6(6), 21-27
- Karr JR, Fausch KD., Angermeier PL, Yant PR & Schlosser IJ (1986) Assessing biological integrity in running waters. A method and its rationale. Illinois Natural History Survey Special Publications 5, Champaign.
- Kawecki TJ (1997) Sympatric speciation driven by beneficial mutations. Proceedings of the Royal Society of London B, 263, 1515-1520.
- Kinzelbach (1990) Besiedlungsgeschichtlich bedingte longitudinale Faunen-Inhomogenitäten am Beispiel des Rheins. Limnologie aktuell (1) Biologie des Rheins(ed. Kinzelbach R, Friedrich), pp 41-58. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Klein L (1998) Modifikation und Bewertung eines Index of Biotic Integrity (IBI) zur Evaluation von Mittelgebirgsforellenbächen. Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München.
- Klinger H (1997) Fischbesatz mit Bachforellen. Beiträge aus den Fischereidezernaten, Heft 3. Landesanstalt für Ökologie, Bodenordnung und Forsten / Landesamt für Agrarordnung Nordrhein-Westfalen (LÖBF)
- Koli L (1969) Geographical variation of *Cottus gobio* L. (Pisces, Cottidae) in Northern Europe. Annales Zoologici Fennici, 6, 353-390.
- Kolkwitz, R, Marsson, M. (1902) Ökologie der tierischen Saprobien. Int. Rev. ges. Hydrobiol. 2, 126-152, 1909
- Kottelat M (1997) European freshwater fishes. An heuristic checklist of the freshwater fishes of Europe (exclusive of former USSR), with an introduction for non-systematists and comments on nomenclature and conservation. Biologia, Section Zoology 52 Suppl. 5:1-271.
- Ladiges W & Vogt D (1979) Die Süßwasserfische Europas. 299 Seiten, Hamburg Berlin (Parey Verlag)
- Laikre, L (Hrsg.) (1999) Conservation genetic management of brown trout (*Salmo trutta*) in Europe. Draft der Concerted Action "Trout Concert" der EU. 51 Seiten.
- Lampert W & Sommer U (1993) Limnoökologie. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg (1992) Handbuch Wasser 2, Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung Arbeitsanleitung. 1. Auflage Loseblattsammlung.
- Largiadèr CR & Scholl A (1995) Effects of stocking on the genetic diversity of brown trout populations of the Adriatic and Danubian drainages in Switzerland. Journal of Fish Biology 47 (Suppl. A):209-225.
- Largiadèr CR. & 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.
- Larimore RW & PW Smith (1963) The fishes of Champaign County, Illinois, as affected by 60 years of stream changes. Illinois Natural History Survey Bulletin 28,
- Le Cren ED & Lowe-McConnell RH (1980) The functioning of freshwater ecosystems. Cambridge University Press. Cambridge.
- Le Cren ED (1962) The efficiency of reproduction and recruitment in freshwater fish. The exploitation of natural animal populations (ed. E.D. Le Cren and M.W. Holgate), 283-96. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Le Cren ED (1965) Some factors regulating the size of populations of freshwater fish. Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie, 13, 88-105

- Lelek A (1987) The freshwater fishes of Europe. Threatened fishes of Europe. Wiesbaden: Aula. 346 Seiten.
- Leonard P & D Orth (1986) Application and testing of an index of biotic integrity in small, coolwater streams. Transactions of American Fisheries Society 115, 401-414
- Levinson G, Gutmann GA (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. Molecular Biology and Evolution, 4, 203-221.
- Lyons J, Wang L & T Simonson (1996) Development and validation of an index of biotic integrity for coldwater streams in Wisconsin. North American Journal of Fisheries Management Vol. 16 No. 2, Mai 1996
- Magnusson KP, Ferguson MM (1987) Genetic Analysis of four sympatric morphs of arctic charr *Salvelinus alpinus* from Thingvallavatn, Iceland. Environmental Biology of Fishes, 20, 67-74.
- Maitland PS (1984) Wild salmonids- are they at risk? Proceedings of the Institute of Fisheries Management Annual Study Course.: 15, 100-109
- Maitland PS & Lyle AA (1991) Conservation of freshwater fish in the British Isles: the current status and biology of threatened species. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems: 1, 25-54
- Maitland PS, Boom PJ & McLusky DS (1994) The fresh waters of Scotland. A national resource of international significance. John Wiley&Sons. Chichester-New York.
- Maitland PS, Lyle AA & Campbell R (1987) Acidification and Fish in Scottish Lochs. Institute of Terrestrial Ecology, Grange-over-Sands.
- Marr J.C. (1956) The critical period in the early life history of marine fishes. Journal du Conseil. Conseil permanent international pour l'exploration de la mer, 21, 160-70
- Martínez P, Arias J, Castro J & Sánchez L (1993) Differential stocking incidence in brown trout (*Salmo trutta*) populations from northwestern Spain. Aquaculture 114:203-216.
- May RC (1974) Larval mortality in marine fishes and the critical period concept. The early life history of fish (ed. J.H.S. Blaxter), pp. 3-19. Springer-Verlag, Berlin.
- Mebes H (1992) Einfluß von Temperatur und Gewässerchemie auf das Wachstum und die Populationsstruktur der Bachforelle *Salmo trutta* morpho fario L. in den unterschiedlichen geologischen Gebieten Oberfrankens. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften. Lehrstuhl für Tierökologie. Universität Bayreuth.
- Meng HJ (1978) Leitfaden für die Elektrofischerei. Veröffentlichungen des Eidgenössischen Amtes für Umweltschutz und der Eidgenössischen Fischereiinspektion Nr. 35.
- Meyer D (1990) Makroskopisch-biologische Feldmethoden zur Wassergütebeurteilung von Fließgewässern. Arbeitsgemeinschaft Limnologie und Gewässerschutz e.V.. Hannover
- Miller DL, Leonard PM, Hughes RM, Karr J, Moyle P, Schrader L, Thompson BA, Daniels RA, Fausch K, Fitzhugh GA, Gammon JR, Halliwell DB, Angermeier PL & DJ Orth (1988) Regional Applications of an Index of Biotic Integrity for Use in Water Resource Management. Fisheries, Vol. 13, Nr.5
- Milne A (1957) The natural control of insect populations. Canadian Entomologist: 89, 193-213.
- Minns et al. (1993) An index of biotic integrity (IBI) for fish assemblages in the littoral Zone of Great Lakes' areas of concern. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences Vol. 51, 1804-1822.
- Morán P, Pendás, AM, García-Vásquez E & Izquierdo J (1991) Failure of a stocking policy, of hatchery reared brown trout, *Salmo trutta* L, in Asturias, Spain, detected using Ldh-5-* as a genetic marker. Journal of Fish Biology 39 (Supplement A):117-121.

- Morán P, Pendás AM, García-Vásquez E, Izquierdo JI & Lobon-Cervia J (1995) Estimates of gene flow among neighbouring populations of brown trout. *Journal of Fish Biology* 46:93-602.
- Moritz C (1994) Applications of mitochondrial DNA analysis in the conservation: a critical review. *Molecular Ecology* 3:401-411.
- Morris RW (1956) Some aspects of the problem of rearing marine fishes. *Bulletin de l'Institut océanographique*: 1082, 1-61
- Morrison B (1989) Freshwater life in acid streams and lochs. In *Acidification in Scotland*, pp. 82-91, Scottish Development Department, Edinburgh.
- Müller H (1983) *Fische Europas*. Deutscher Taschenbuchverlag. Stuttgart.
- Müller R (1993) Zusammenfassung des Kurzvortrages "Gefahren für die autochthone Kleinfischfauna der Mittelgebirge". 3. Workshop in Innsbruck: Biologie und Gefährdung heimischer Kleinfischarten. Institut für Zoologie, Universität Innsbruck, Alpenzoo Innsbruck/Tirol
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 23, 341-369.
- Nesbø CL, Fossheim T, VØllestad LA, Jakobsen KS (1999) Genetic divergence and phylogeographic relationships among European perch (*Perca fluviatilis*) populations reflect glacial refugia and postglacial colonization. *Molecular Ecology*, 8, 1387-1404.
- Nielsen E E, Hansen MM & Loeschcke V (1998) Improved primer sequences for the mitochondrial ND1, ND3, ND5/6 segments in salmonid fishes: application to RFLP analysis of Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 53, Seite 21##
- Nyman L (1972) A new approach to the taxonomy of the *Salvelinus alpinus* species complex". Institute of Freshwater Research Drottningholm, 52, 103-131.
- Nyman L, Hammar J, Gydemo R (1981) The systematics and biology of land-locked populations of Arctic char from northern Europe. Institute of Freshwater Research Drottningholm, 59, 128-141.
- Oberdorff, T & Porcher P (1994) An index of biotic integrity to assess biological impacts of salmonid farm effluents on receiving waters. *Aquaculture*: 119, 219-235
- Oberdorff T & RM Hughes (1992) Modification of an index of biotic integrity based on fish assemblages to characterize rivers of the Seine Basin, France. *Hydrobiologia*: 228, 117-130
- Ohio EPA (1987) Users manual for biological field assessment of Ohio surface waters. Ohio Environmental Protection Agency, Division of Water Quality Monitoring and Assessment, Surface Water Section, Columbus, OH
- Osinov, AG, & Bernatchez L (1996) "Atlantic" and "Danubian" phylogenetic groupings of brown trout *Salmo trutta* complex: Genetic divergence, evolution, and conservation. *Journal of Ichthyology* Vol.36, No. 6, Seiten 762-786.
- Pauly D (1983) Some simple methods for the assessment of tropical fish stocks. *FAO Fish. Tech. Pap.*: 234, 52 ff.
- Pechlaner R (1984) Historical Evidence for the Introduction of Arctic Charr into High-Mountain Lakes of the Alps by Man. p. 549-557. In L Johnson and B. L. Burns [eds.] *Biology of the Arctic charr*, Proceedings of the International Symposium on Arctic Charr, Winnipeg, Manitoba, may 1981, Univ. Manitoba Press, Winnipeg.
- Persat H, Berrebi P (1990) Relative ages of present populations of *Barbus barbus* and *Barbus meridionalis* (Cyprinidae) in southern France: preliminary considerations. *Aquatic Living Resources*, 3, 253-263.
- Pflieger WL (1975) *The fishes of Missouri*. Missouri Department of Conservation, Jefferson City.

- Poteaux, C, D Beaudou & P. Berrebi (1998) Temporal variations of genetic introgression in stocked brown trout populations. *Journal of Fish Biology* 53: 701-713.
- Rannala B & JL Mountain (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9197-9221.
- Rassmann K, Schlötterer C, Tautz D (1991) Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 12, 113-118.
- Raymond M, Rousset F (1995a) GENEPOP3.1d (update of version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248-249.
- Raymond M, Rousset F (1995b) An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49, 1280-1283.
- Reisinger E (1953) Zum Saiblingsproblem. *Carinthia II*, 63, 74-102.
- Reist JD, Gyselman E, Babaluk JA, Johnson JD, Wissink R (1995) Evidence for Two Morphotypes of Arctic Charr (*Salvelinus alpinus* L.) from Lake Hazen, Ellesmere Island, Northwest Territories, Canada. *Nordic Journal of Freshwater Research*, 71, 396-410.
- Riffel M, Schreiber A (1995) Coarse-grained population structure in Central European sculpin (*Cottus gobio* L.): secondary contact or ongoing genetic drift? *Journal of Zoological and Systematic Evolutionary Research*, 33, 173-184.
- Riffel M, Schreiber A (1998) Morphometric differentiation in populations of the Central European sculpin *Cottus gobio* L., a fish with deeply divergent genetic lineages. *Canadian Journal of Zoology*, 76, 876-885.
- Riffel M, Storch V & Schreiber A (1995) Allozyme variability of brown trout (*Salmo trutta* L.) populations across the Rhenanian-Danubian watershed in southwest Germany. *Heredity* 74:241-249.
- Riggs L (1990) Principles for genetic conservation and production quality. Report for the Northwest Power Planning Council (NNNP), Portland, OR, USA (Contract No. C90-005), 20 pp. plus appendices.
- Röhl A (1998) Network 1.8. A program package for calculating phylogenetic networks. University of Hamburg.
- Rümmler F, Schreckenbach K & Pfeifer M (1998) Auswirkungen der Elektrofischerei auf Fische. *Fischer & Teichwirt* 3/1998, Seiten 88-92.
- Rychlik W (1992) Oligo 4.05 Macintosh, National Biosciences, Inc., Plymouth, MN, USA.
- Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution* 1:9-10.
- Ryman N (1983) Patterns of distribution of biochemical genetic variation in salmonids: differences between species. *Aquaculture* 33, Seiten 1-21.
- Ryman N (1991) Conservation genetics considerations in fishery management. *Journal of Fish Biology* 39 (Supplement A):211-224.
- Saitou RK, Nei M (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schadt, J. (1993) Fische, Neunaugen, Krebse und Muscheln in Oberfranken. Vorkommen und Verbreitung als Grundlage für den Fischartenschutz. Bezirk Oberfranken. Fachberatung für Fischerei
- Schillinger A (1901) Der Tiefseesaibling. *Allgemeine Fischereizeitung*. NF 16, 149-151

- Schmedtje U (1985) Vergleich der Makroinvertebraten, der submersen Makrophyten und des Chemismus der Moosach (Münchener Ebene) in Hinblick auf die Gewässergütebeurteilung. Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Alber-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br..
- Schneider S, Kueffer JM, Roessli D, Excoffier L (1997) Arlequin version 1.1.. A software for population genetic data analysis.
- Schwörbel (1987) Einführung in die Limnologie. 6. Auflage. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart.
- Sedlak E (1985) Bestimmungsschlüssel für mitteleuropäische Köcherfliegenlarven. 2., ergänzte Auflage. In "Wasser und Abwasser: Beiträge zur Gewässerforschung XV. Band 29" (Kohl, W., ed.).
- Shannon CE & W Weaver (1949) The mathematical theory of communication. Univ.Illinois Press, Urbana, 125 ff
- Sinclair A (1989) The regulation of animal populations. Ecological Concepts, British Ecological Society Symposium (ed. M. Cherrett), 197-241. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Slettan A, Olsaker I, Lie Ø (1995) Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL311, SSOSL417 loci. Animal Genetics, 26, 277-285.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) Biometry: the principles and practice of statistics in biological research, 3rd edition, by WH Freeman and Company, USA.
- Steedman (1988) Modification and assessment of an index of biotic integrity to quantify stream quality in Southern Ontario. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 45:492-501
- Strimmer K, von Haeseler A (1996) Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. Molecular Biology and Evolution, 13, 964-969.
- Studemann D, Landolt P, Sartori M, Hefti D. & Tomka I (1992) Ephemeroptera. 9. Auflage in Insecta Helvetica Fauna (Schweizerische Entomologische Gesellschaft, ed.).
- Swofford DL (1999) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods).Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. Molecular Biology and Evolution, 10, 512-526.
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research, 17, 6463-6467.
- Tautz D (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: DNA fingerprinting: State of the science (Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ eds.), Birkhäuserverlag, Basel.
- Taylor EB (1991) A review of local adaptation in Salmonidae, with particular reference to Pacific and Atlantic salmon. Aquaculture 98:185-207.
- ter Braak CJF (1986) Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. Ecology 67, 1167-1179
- ter Braak CJF (1988) Partial correspondence analysis. In: Classification and related methods of data analysis. Bock HH (ed), North Holland, Amsterdam, 551-558
- ter Braak CJF (1998) CANOCO 4. Software and Handbook for Canonical Community Ordination. Center for Biometry Wageningen
- Tesch, F. (1968) Age and growth. In "Methods for assessment of fish production in fresh waters" (W.E. Ricker, ed.). IBP Handbook No. 3. Blackwell. London
- Thienemann A (1950) Verbreitungsgeschichte der Süßwasserwelt Europas. Versuch einer historischen Tiergeographie d. europäischen Binnengewässer. Die Binnengewässer 18, 1-809.

- Thompson DH. & FD Hunt (1930) The fishes of Champaign County: a study of the distribution and abundance of fishes in small streams. Illinois Natural History Survey Bulletin 19
- Thomson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acid Research, 22, 4673-4680.
- Turnpenny A & Williams R (1980) Effects of sedimentation on the gravels of an industrial river system. Journal of Fish Biology: 17, 681-693.
- Verneaux J (1976) Application de la méthode des 'indices biotiques à l'échelle d'un réseau hydrographique: cartographie de la qualité biologique des eaux. In P. Pesson (ed.): La pollution des eaux continentales. Gauthier-Villars, Bordas, Paris, France, 221-228
- Verneaux J (1981) Les poissons et la qualité des cours d'eau. Ann. Sci. Univ. Franche-Comté: 2, 33-41
- Verneaux J & G Tuffery (1967) Méthode zoologique pratique de détermination de la qualité biologique des eaux courantes. Indices biotiques. Ann. Sci. Univ. Besancon, Zool.: 3, 79-89
- Vøllestad LA, L'Abée-Lund JH (1994) Evolution of the life history of Arctic charr *Salvelinus alpinus*. Evolutionary Ecology, 8, 315-327.
- Volpe JP, Ferguson MM (1996) Molecular genetic examination of the polymorphic Arctic charr *Salvelinus alpinus* of Thingvallavatn, Iceland. Molecular Ecology, 5, 763-772.
- Waples R S (1991) Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp., and the definition of "species" under the Endangered Species Act. Marine Fisheries Review 53 (3), Seiten 11-22.
- Waterstraat A (1992) Investigations on the ecology of *Cottus gobio* L. and other fish species from two lowland streams of Northern Germany. Limnologica, 22, 137-149.
- Weatherley, A. (1984) Biology of fish growth. Blackwell, Oxford.
- Weatherley, A, Rogers, S (1978) Some aspects of age and growth. In "Ecology of Freshwater Fish Production" (S.D. Gerking, ed.). Blackwell, Oxford.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimation F-statistics for the analysis of population structure. Evolution, 38, 1358-1370.
- Weiss S & Kummer (1999a) Movement of wild and experimentally stocked brown trout, *Salmo trutta* L., before and after a flood in a small Austrian stream. Fisheries management and ecology 6, 35-45
- Weiss S & Schmutz S (1999b) Performance of hatchery-reared Brown trout and their effects on wild fish in two small austrian streams. Transactions of the American Fisheries Society 128, 302-316
- 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, im Druck
- Wilkinson GS, Chapman AM (1991) Length and Sequence variation in evening bat D-loop mt DNA. Genetics, 128, 607-617.
- Wilson AC, Cann RL, Carr SM, George M, Gyllenstein UB, Helm-Bychowski KM, Higuchi RG, Palumbi SR, Prager EM, Sage RD, Stoneking M (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biological Journal of the Linnean Society, 26, 375-400.
- Wilson CC, Hebert PDN, Reist JD, Dempson JB (1996) Phylogeography and postglacial dispersal of arctic charr *Salvelinus alpinus* in North America. Molecular Ecology, 5, 187-197.
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution, 19, 395-420.

- Wüstemann (1993) Der Hasel: ein schützenswerter Kleinfisch unserer Gewässer oder lästiger "Kulturfolger"? 3. Workshop in Innsbruck: Biologie und Gefährdung heimischer Kleinfischarten. Institut für Zoologie, Universität Innsbruck, Alpenzoo Innsbruck/Tirol
- Wynne-Edwards VC (1962) Animal dispersion in relation to social behaviour. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Wynne-Edwards VC (1986) Evolution through group selection. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Wynne-Edwards, VC (1991) Ecology denies neo-Darwinism. *The Ecologist*: 21, 136-41.
- Zhang DX, Hewitt GM (1996) Nuclear integrations: Challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology and Evolution*, 6, 247-251.
- Zischler H, Geisert H, von Haeseler A, Pääbo S (1995) A nuclear fossil of the mitochondrial D-loop and the origin of modern humans. *Nature*, 378, 489-492.

10 Erläuterungen der Abkürzungen

bp	Basenpaare
CCA	Canonical Correspondence Analysis
cf	confer
ESU	Evolutionary Significant Unit
IBI	Index of Biotic Integrity
OCU	Operational Conservation Unit
PCCA	Partial Canonical Correspondence Analysis
RFLP	Restriktionslängenpolymorphismus
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure