

Projekt 1002, Artenhilfsprogramm-Perlmuschel

***Erfassung möglicher Wirt-Parasit-Koevolution zwischen
Bachforelle und Perlmuschel unter Betrachtung
funktionalgenetischer Aspekte***

Abschlussbericht

im Auftrag des Landesfischereiverbands Bayern e.V.



Projektleitung: PD Dr. Ralph Kühn

TU München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan
Fachgebiet für Wildbiologie und Wildtiermanagement
Am Hochanger 13
85354 Freising

Bearbeiter: Dr. Bernhard Gum, Michael Kolhasa

seit 02.11.2006 bzw. 01.05.2007

Bildungs- und Wissenszentrum Aulendorf
Fischereiforschungsstelle Baden-Württemberg
Untere Seestraße 81
D-88085 Langenargen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Literaturübersicht	5
2.1. Verbreitung, Systematik und Phylogenie der Bachforelle	5
2.2 Die Ökologie der Bachforelle	6
2.3 Die Bachforelle als Zwischenwirt der Flussperlmuschel	7
2.4. Phylogeographie der Bachforelle in Europa	9
2.4.1 Techniken der molekularen Phylogeographie	12
2.4.2 Mitochondriale DNA	12
2.4.3 Mikrosatelliten als genetische Marker	14
2.4.4 Microarray Analyse und quantitative PCR	14
3. Material und Methoden	16
3.1 Probenmaterial	16
3.1.1 Herkunft der Proben	16
3.1.2 Probennahme	16
3.2 Molekulargenetische Methoden	18
3.2.1 DNA Präparation aus Flossenstücken	18
3.2.2 Mikrosatelliten (STRs)	18
3.2.3 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)	19
3.2.4 Microarray und quantitative RT-PCR Analysen	21
3.3 Statistische Methoden	23
3.3.1 Allelfrequenz, Allele pro Locus, Allelic Richness	23
3.3.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	24
3.3.3 Heterozygotiegrad	24
3.3.4 Genetische Differenzierung	25
3.3.5 Assignment Test	25
4. Ergebnisse und Diskussion	26
4.1 Mitochondriale DNA-Analysen	26
4.1.1 Haplotypfrequenzen der ND5/6 Fragmente	26
4.1.2 Bayern als Kontaktzone der AT- und DA-Typen	29
4.1.3 Zusammenhang der Bachforellen-Haplotypen und der Perlmuschelbestände	29
4.2. Mikrosatelliten Analyse	31
4.2.1 Hardy-Weinberg Gleichgewicht	32
4.2.2 Genetische Variabilität innerhalb Populationen	32
4.2.3 Genetische Variabilität der Bachforelle im Vergleich zur Perlmuschel	36
4.2.4 Genetische Differenzierung der Populationen	37
4.3 Microarray und quantitative RT-PCR	41
5. Zusammenfassung	42
6. Literaturverzeichnis	44

1. Einleitung

Die Bachforelle (*Salmo trutta*) ist der am weitesten verbreitete, natürlich vorkommende Süßwasserfisch in der Paläarktischen Region (BERNATCHEZ 2001). Als Speisefisch wird die Forelle seit jeher vom Menschen wirtschaftlich genutzt, darum und nicht zuletzt auch aufgrund der Berufs- und Angelfischerei, unterliegt die Bachforelle einem starken anthropogenen Einfluß. Schon im Mittelalter wurden durch Besatzmaßnahmen die Ursprungspopulationen vermischt und die natürlichen Verbreitungsgrenzen verändert (PECHLAHNER 1984). Der größte Besatz fand in der Zeit des späten 19. Jahrhunderts und des frühen 20. Jahrhunderts statt, bevor man sich der Risiken der Einführung von exotischen Arten bewusst wurde (LAIKRE et al. 1999).

In Europa dient die Bachforelle der Flussperlmuschel (*Margaritifera margaritifera* L.) als Zwischenwirt für ihre Glochidien. Trotz der großen ökologischen Bedeutung der Perlmuschel für aquatische Systeme (z.B. Filtrierung, Stoffumsetzung, Sedimentdurchmischung), existieren noch immer Wissenslücken bezüglich der komplexen Biologie, in der die Ursachen für das rapide Schwinden der Muschelbestände zu suchen sind (GEIST 2005). Einige Autoren betrachten die Flussperlmuschel als die am stärksten vom Aussterben bedrohte Süßwassermuschel der Welt (MACHORDOM et al. 2003). Noch vor etwa einem Jahrhundert war die Flussperlmuschel bodendeckend in Gewässern vorhanden (ISRAEL 1913). Bis 1990 wurde ein Schwinden der Muschel in Europa von über 90% festgestellt (BAUER 1988), eine Tendenz, die noch immer andauert, oder sich verschlimmert. Das derzeitige Hauptproblem ist das Fehlen von Jungmuscheln in vielen europäischen Perlmuschelgewässern (GEIST 2005).

Nur wenige Arten dienen der Flussperlmuschel als Zwischenwirt. Als natürlich vorkommende Arten sind dies die Seeforelle (*Salmo trutta* f. *trutta*), die Bachforelle (*Salmo trutta* f. *fario*) und der Atlantische Lachs (*Salmo salar*) (YOUNG & WILLIAMS 1984). In Mitteleuropa stellt die Bachforelle (*Salmo trutta* f. *fario*) den einzigen geeigneten Wirtsfisch für die Flussperlmuschel dar (WÄCHTLER et al. 2001).

Direkte Bedrohungen der adulten Muscheln durch Perlräuberei und durch Fraßfeinde, wie der Bisamratte und dem Aal (Ernährung möglicherweise durch Jungmuscheln), haben nur einen begrenzten lokalen Einfluss und können nicht die globale Abnahme der Art erklären. Stattdessen sind indirekte Effekte, verbunden mit anthropogenen Störungen, wie Zerstörung des Lebensraumes durch wasserbauliche Maßnahmen, der Eintrag von Feinsedimenten und Eutrophierung vermutlich die wichtigsten Faktoren, die zu einer Abnahme der Bestände führen. Ein Mangel oder eine Abnahme der Wirtsfischpopulationen und eine Reihe zusätzlicher Störungen der Chemie, der Biologie, der Hydrologie und der Geomorphologie

der Gewässer können ebenfalls dazu beitragen (GEIST 2005). Nach GEIST et al. (2005) stellt der aktuelle Status (Biomasse und Anzahl) der Wirtsfischpopulationen keinen maßgeblichen Grund für das Fehlen von Jungmuscheln dar. Eine Verbindung zwischen fehlenden Jungmuscheln und einem Fehlen von geeigneten Wirtsfischen konnte nur selten beobachtet werden.

Es ist wichtig nach weiteren Gründen für das Schwinden der Flussperlmuscheln zu suchen. Möglicherweise lassen sich Zusammenhänge zwischen der genetischen Populationsstruktur von Bachforellen und der Struktur von Perlmuschelpopulationen finden.

Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit ist die Analyse der genetischen Struktur der Bachforellen (*Salmo trutta*) in ausgewählten Flussperlmuschelgewässern in Deutschland, Frankreich und Finnland anhand von mitochondrialer DNA und Mikrosatelliten. Es wurden Bachforellenproben aus den Gewässersystemen der Elbe, Donau, Weser, Aulne, Kemijoki und Tuloma mit teils noch intakten Flussperlmuschelpopulationen (mit Jungmuschelproduktion) und nicht mehr intakten Populationen (ohne Jungmuscheln) genommen. Insgesamt wurden 15 Populationen analysiert. Weiter soll durch einen Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien die Erkenntnisse der bisherigen Phylogeographie der Bachforellen überprüft und nach einem eventuellen Zusammenhang zwischen Perlmuschelpopulationen und der genetischen Struktur der Bachforellenpopulationen gesucht werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Verbreitung, Systematik und Phylogenie der Bachforelle

Die Bachforelle (*Salmo trutta* Linnaeus) ist ein Vertreter der Familie Salmonidae. Ihre natürliche Verbreitung erstreckt sich von Nordnorwegen und dem nordöstlichen Teil Ostrusslands nach Süden, bis hin zum Atlasgebirge Nordafrikas. Island stellt die westliche Verbreitungsgrenze, die Aralsee-Zuflüsse stellen die östliche Verbreitungsgrenze dar (MAC CRIMMON & MARSHALL 1968; BEHNKE 1986; BERNATCHEZ et al. 1992, ELLIOTT 1994). Die Bachforelle war ursprünglich in Europa, Nordafrika und dem Westen Asiens beheimatet. Doch wurde sie in mindestens 24 Ländern außerhalb Europas, einschließlich der USA, Kanada und Australien, sowie in einige Länder in Südamerika, in Afrika und in Asien eingeführt. Der früheste dokumentierte Besatz fand 1852 im Osten Russlands statt, in Neuseeland von 1867-1885, USA und Kanada jeweils 1883 und 1887, Australien 1888, Südafrika 1890, Japan 1892 und Südamerika zwischen 1904 und 1938. Innerhalb von weniger als 90 Jahren (1852-1938) entwickelte sich die Bachforelle von einer europäischen zu einer weltweiten Art (KLEMETSEN et al. 2003).

Gründe für das große geographische Verbreitungsgebiet dieser Art sind ihre ausgezeichnete Fähigkeit der Verbreitung und der Besiedelung neuer Gewässer, ebenso ihr Ruf als guter Speisefisch. Mit dem Einzug der Bachforelle als Wirtschaftsfisch in die Teichwirtschaft, fanden eine Erweiterung der natürlichen Verbreitungsgrenzen und eine Beeinflussung der Bestandszahlen durch künstlichen Besatz statt.

Es gibt 68 verschiedene Fischarten aus der Familie der *Salmonidae*. Sie lassen sich in 9 Gattungen und diese wiederum in drei Unterfamilien (*Coregoninae*, *Salmoninae*, *Thymallinae*) zusammenfassen (NELSON 1976). Es finden sich eine Vielzahl von geographischen und lokalen Formen, sowie Ökotypen: die anadrome Meerforelle (*S. trutta trutta*), die in Fließgewässern residente Bachforelle (*S. trutta f. fario*), und die in Seen lebende Seeforelle (*S. trutta f. lacustris*). Dieser Umstand hat seit Linné zur Beschreibung von über 50 Arten geführt, die jedoch heute zu einer einzigen polytypischen Art, *Salmo trutta*, zusammengefasst werden (BEHNKE 1986; KOTTELAT 1997).

Alle Arten der Familie *Salmonidae* bilden eine monophyletische Gruppe mit einem gemeinsamen tetraploiden Vorfahren, der sein gesamtes Genom vor ca. 20 bis 50 Millionen Jahren verdoppelt hat (ALLENDORF & THORGAARD 1984). Ein charakteristisches Merkmal der tetraploiden Salmoniden ist, dass noch immer eine Diploidisierung ihres Genoms stattfindet (JOHNSON et al. 1987) und sie sich somit in einer Phase der „Re-

Duplizierung“ befinden (ALLENDORF & THORGAARD 1984). Aus diesem Grund weisen Salmoniden, im Vergleich zu anderen Vertebraten, mitunter einen 4-fachen Satz (4n) einiger Chromosomen auf.

2.2 Die Ökologie der Bachforelle

Als Habitat bevorzugt die Bachforelle kalt stenotherme Gewässer, mit nicht mehr als 20-22°C Wassertemperatur im Sommer und einem hohen Sauerstoffgehalt (LELEK 1987). Als Leitfisch, der nach ihr benannten Forellenregion bieten ihr strukturreiche und hartgründige Gewässer Unterstand, sowie das erforderliche Laichsubstrat (LEUNER et al. 2000). Die Bachforelle laicht in gut durchspültem, kiesigem Untergrund (BRABRAND et al. 2002). Dazu schlägt das Weibchen mit seiner Schwanzflosse eine Laichgrube, die nach der Eiablage und der Befruchtung wieder mit lockerem Sand und Kies bedeckt wird (HAURY et al. 1999). Das Bedecken der Eier verhindert deren Verdriftung, sowie Zugriffe von Eiprädatoren. Das Lückensystem des Kiesbettes ist für die Entwicklung der Larven essentiell.

Die Art variiert in der Größe, den Wachstumsraten, der Einnischung bezüglich Nahrung und den Standorten innerhalb und zwischen Wasserläufen. Das phänotypische Erscheinungsbild der Bachforelle verändert sich mit dem jeweiligen Habitat und bis zu einem bestimmten Grad auch mit ihrer Ökologie (PAKKASMAA & PIIRONEN 2001). Es existieren residente und wandernde Formen innerhalb einer Art. Die wandernden Formen bestehen aus anadromen und in Seen lebenden Forellen. Die anadromen Forellen ziehen von den Flüssen oder Strömen herab bis ins Meer, wo sie bis zur Geschlechtsreife bleiben. Dann kehren sie wieder an ihren Ursprungsort zurück, um abzulaichen. Einige führen diese Wanderung auch nur zur Überwinterung durch. Die in Seen lebenden Formen schwimmen von ihren Herkunftsflüssen in Seen, zur Laichzeit kehren auch sie wieder in ihre Flüsse zurück. Residente Formen verbringen ihr gesamtes Leben in einem Fluss oder kleinen Strom und laichen oftmals in kleineren Nebenflüssen ab (ELLIOTT 1994). Residente und wandernde Forellenformen können in den Flüssen koexistieren und einige Studien (z.B. HINDAR et al. 1991) vermuten, dass sich diese beiden Formen gelegentlich kreuzen.

Aufgrund des gleichen Habitats besteht eine Konkurrenz zwischen der Bachforelle und dem Bachsaibling (*Salvelinus fontinalis*). Der Bachsaibling stammt aus dem Osten Nordamerikas und wurde 1884 in Europa eingeführt. Als Kaltwasserfisch bevorzugt er sauerstoffreiche Fließgewässer mit starker Strömung. Der Bachsaibling ist im Vergleich zur Bachforelle

weniger auf Unterstände angewiesen und reagiert weniger empfindlich auf Gewässerversauerung (TEROFAL 1984; LUBIENIECKI & STEINBERG 1987).

Der Lebensraum der Bachforelle wurde durch den Eingriff des Menschen, etwa durch wasserbauliche Eingriffe und Verschmutzung, aber auch durch sauren Regen und Grundwasserabsenkung verändert, was zur Folge hat, dass die für Bachforellen geeigneten Gewässersysteme immer seltener werden. So ist durch den Verschluss des Lückensystems, sowie durch das Verschwinden von Unterstandsmöglichkeiten, das natürliche Vorkommen stark zurückgegangen. Die Zunahme von Fraßfeinden hat zudem einen negativen Einfluss auf die Demographie der Bachforelle. Die Bachforelle ist als potentiell gefährdet einzustufen. Der einst reiche Bestand an Bachforellen in Gewässern der Forellenregion kann heute meist nur mehr durch künstlichen Besatz aufrechterhalten werden (LEUNER et al. 2000). Durch den Besatz wurde das Verbreitungsgebiet der Bachforelle künstlich erweitert, so dass auch untypische, und damit nur wenig oder ursprünglich nicht besiedelte Fließgewässer heute zu den Habitaten der Bachforelle hinzugerechnet werden. Die heutige weite Verbreitung der Bachforelle spiegelt laut BERG et al. (1989) weniger die ursprüngliche Verbreitung, sondern in vielen Fällen wohl eher die Besatzmaßnahmen wieder.

2.3 Die Bachforelle als Zwischenwirt der Flussperlmuschel

Flussperlmuscheln (*Margaritifera margaritifera* L.) weisen einen komplexen Entwicklungszyklus mit einem parasitären Stadium an einem Wirtsfisch auf (vgl. Abbildung 2.1). Die Flussperlmuschel ist getrenntgeschlechtlich. Die Weibchen sind in der Lage, sich im Falle einer geringen Populationsdichte in Hermaphroditen umzuwandeln (BAUER 1987). Wie alle Süßwassermuscheln (Unionoidea), weisen Flussperlmuscheln einen Entwicklungszyklus auf, der ein larvales, sog. Glochidien-Stadium, beinhaltet. In den Marsupien (Kiementaschen) wachsen die Zygoten zu zweiklappigen Glochidien heran. Nach ihrer Abgabe in das Gewässer werden sie von den Wirtsfischen eingeatmet.

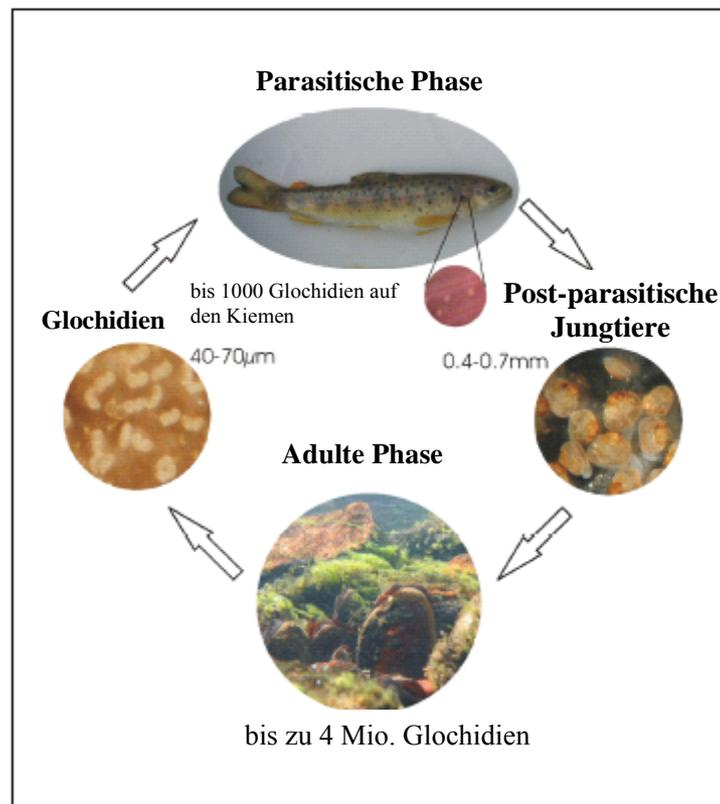


Abbildung 2.1: Lebenszyklus der Flussperlmuschel (*Margaritifera margaritifera* L.) (nach GEIST 2005)

Die Glochidien setzen sich innerhalb kurzer Zeit im Kiemengewebe der Wirtsfische fest und enzystieren dort für einen Zeitraum von bis zu 10 Monaten (BAUER 1994). Glochidien bleiben nur für einen Zeitraum von wenigen Tagen, und nur über eine kurze Distanz flussabwärts vom Ort der Abgabe infektiös (JANSEN et al. 2001).

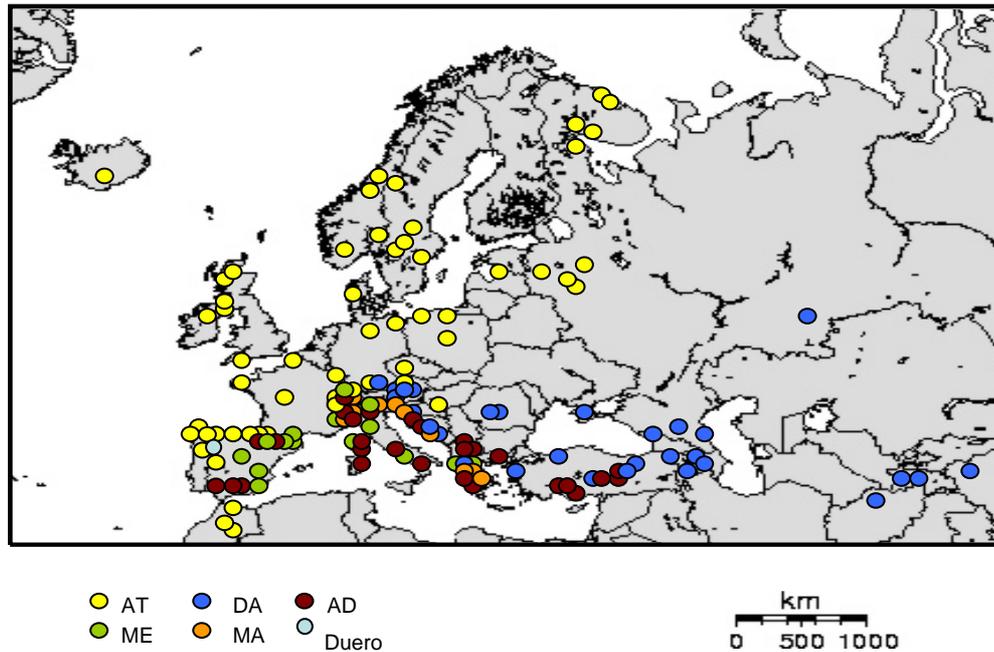
Die einzigen geeigneten Wirtsfische für die Flussperlmuschel sind Salmoniden. Der Atlantische Lachs (*Salmo salar* L.) scheint der Hauptwirt in Neuschottland (CUNJAK & MC GLADDERY 1991) und Russland (ZIUGANOV et al. 1994) zu sein. Wohingegen in Mitteleuropa die Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) den wichtigsten Wirt für die Flussperlmuschel darstellt (WÄCHTLER et al. 2001). Besonders Jungfische stellen einen wichtigen Verbreitungsvektor für die Flussperlmuschel dar. Nach zwei bis drei Infektionen können Immunreaktionen ausgelöst werden, die letztendlich zu einer Abstoßung der Glochidien führen (BAUER & VOGEL 1987). Aufgrund dieser Immunität gegenüber den Muschelglochidien, wie sie z.B. für die englische Bachforelle vermutet wird, wird empfohlen nur heimische und autochthone Bachforellen für den Besatz in Gewässern mit

Flussperlmuscheln zu verwenden. Dies entspricht den Verordnungen zur Ausführung des Fischereigesetzes für Bayern (AVFiG) Paragraph § 19.

2.4. Phylogeographie der Bachforelle in Europa

Der Begriff Phylogeographie wurde von AVISE et al. (1987) eingeführt. Darunter versteht man die Erforschung der Prinzipien und Prozesse, die die geographische Verbreitung genealogischer Linien beeinflussen (AVISE 1994).

Es ist nur sehr wenig über die Verbreitung der Salmoniden im voreiszeitlichen Europa bekannt. Jedoch wurde gezeigt, dass sich die Hauptlinien (BERNATCHEZ et al. 1992) vor etwa 0,5 bis 2 Millionen Jahren voneinander getrennt haben müssen (älteste *Salmo trutta* Fossilien aus dem frühen Pleistozän, vor etwa zwei Millionen Jahren (OSINOV & BERNATCHEZ 1996). Nach BERNATCHEZ (2001)) hat sich die Art aus fünf unterschiedlichen Entwicklungslinien, in geographischer Isolierung, während des Pleistozäns entwickelt und blieb seit damals weitestgehend allopatrisch. Die früheste und erste Abspaltung führte zu einer Fragmentierung zwischen den drei ursprünglichen Abstammungslinien. Diese sind die Atlantische (AT-Abstammung), die Ponto-Kaspische oder Danubische (DA) und die Mediterrane, gefolgt von einer anschließenden und möglicherweise gleichzeitigen Aufteilung innerhalb des mediterranen Beckens. Diese führte zur Differenzierung in die Mediterrane (ME), die Marmorata (MA) und die Adriatische (AD) Abstammungslinie (BERNATCHEZ 2001) (vgl. Abb. 2.2).



AT: Atlantische Linie DA: Danubische Linie AD: Adriatische Linie
 ME: Mediterrane Linie MA: Mormorata Linie Duero: Duero Linie

Abbildung 2.2: Geographische Verbreitung der Bachforellenlinien (kombiniert aus BERNATCHEZ 2001, SUÁREZ et al. 2001, WEISS et al. 2000)

Durch die Betrachtung der Umweltbedingungen in den Habitaten während des Pleistozäns, sowie die geographische Verbreitung und genetische Diversität der fünf Abstammungslinien der Bachforellen, ist es möglich, hypothetische Ursprungszentren der einzelnen Linien anzugeben.

Die AT-Linie kolonialisierte das Atlantische Becken von Marokko bis zum Weißen Meer. Bachforellen aus dem Atlantischen Becken konnten in Refugien am Rande der Eisflächen während der letzten Eiszeit überleben und von dort aus eine Neubesiedelung in den Warmzeiten einleiten (OSINOV & BERNATCHEZ 1996). BERNATCHEZ (2001) nimmt als Ursprungszentrum der AT-Linie eine weit im Süden gelegene Region an, eventuell Nebenflüsse an der Küste der Iberischen Halbinsel oder sogar Nordafrika. Diese Hypothese wird von WEISS et al. (2000) durch den Befund eines ausgeprägten Musters an genetischen Unterschieden innerhalb eines Stammes, sowie einer Vielzahl an Differenzierungen in südlich gelegenen Populationen gestützt.

Problematischer ist es ein Ursprungszentrum der DA-Linie anzugeben. Hier liegen weniger klare, direkte Einwirkungen durch den Habitatverlust während der Eiszeiten im Ponto-

Kaspischen Becken und ein sehr komplexer Sachverhalt bezüglich der Expansion, der Verkleinerung und der Quervernetzung des Schwarzen Meeres, des Kaspischen Meers, sowie des Aral-Sees vor (ARKHIPOV et al. 1995). Dennoch folgerte BERNATCHEZ (2001) aus Fossilienfunden und eigenen Studien ein mögliches Zentrum in Abflüssen, die mit dem Schwarzen Meer zusammenhängen. Die DA-Linie dominierte demnach das Ponto-Kaspische Becken.

Weitere Abstammungslinien (ME, MA, AD) weisen ebenfalls eine unterschiedliche Struktur der geographischen Verteilung auf. Es wurden drei Areale, ein südwestliches (Ibero-Mediterran), ein zentrales (Adriato-Mediterran oder Italien) und ein östliches (Balkan/Anatolien), festgestellt (KEITH 1998, BERNATCHEZ 2001).

In Süd-Europa war die MA-Linie, verwandt mit der Marmorataforelle, begrenzt auf einige Flüsse in Italien (hauptsächlich Po-Flussbecken), Kroatien und Slowenien. Diese mündeten offenbar während der größten eiszeitlichen Perioden in das Adriatische Meer ein und waren wahrscheinlich miteinander vernetzt (BIANCO 1990). GIUFFRA et al. (1996) unterstützen die Hypothese eines Nordadriatischen Ursprungs der marmorierten Forelle.

Die Dominanz der AD-Linie in östlichen mediterranen Nebenflüssen und eine höhere Stammdiversität in Populationen aus dem Balkan lässt vermuten, dass die AD Linie aus dem Balkan/Anatolien stammt und sich dort in dem Refugium während der Eiszeiten verbreitet hat.

Die Abundanz der ME-Linie in Flüssen, die in das westliche mediterrane Meer abfließen, legt die Vermutung nahe, dass sie aus dieser Region, aus isolierten Flüssen in Südfrankreich, die als eiszeitliche Refugien dienten, herkommt (BERNATCHEZ 2001).

Untersuchungen von SUÁREZ et al. (2001) erweiterten die von BERNATCHEZ (2001) überarbeiteten fünf Ursprungslinien. Durch vollständige Sequenzierung des D-Loops wurden weitere Unterteilungen der „Mediterranen“ Gruppe festgestellt. Es wurde eine Präzisierung der AD-Linie von Adriatisch zu Adriatisch-Andalusisch vorgenommen, sowie eine neue Duero-Linie der iberischen Halbinsel ermittelt (Abb. 2.2).

Durch eine Vielzahl an Studien (Tab. 2.1) konnte letztlich die von BERG (1948) stammende, auf morphologischen Unterschieden beruhende Hypothese, Populationen der oben genannten Becken als eigene evolutionäre Abstammungslinie anzusehen, erhärtet werden (BERNATCHEZ & OSINOV 1995, BERNATCHEZ 2001).

2.4.1 Techniken der molekularen Phylogeographie

Aufgrund der großen Anzahl unterschiedlichster phänotypischer Bachforellenformen, kann keine genaue Identifizierung phylogenetischer Beziehungen auf morphologischer Basis durchgeführt werden (BEHNKE 1972, LAIKRE et al. 1999). Teilweise können nur mit genetischen Methoden Wildfische und bereits an Gewässer adaptierte Satzfische eindeutig unterschieden werden (LEUNER et al. 2000, AURELLE et al. 1999, HANSEN et al. 2000a). Zur eindeutigen Identifizierung der phylogenetischen Beziehungen einzelner Populationen oder Individuen werden deshalb immer häufiger molekulargenetische Methoden angewendet (z.B. BERNATCHEZ 2001; HANSEN & LOESCHCKE 1996; APOSTOLIDIS et al. 1997).

2.4.2 Mitochondriale DNA

Analysen der mitochondrialen DNA (mtDNA) dienen zur Darstellung von übergeordneten Verwandtschaftslinien und zur Klärung phylogenetischer Fragestellungen innerhalb des Tierreichs (MORITZ et al. 1987) (vgl. Tab. 2.1). Mitochondriale DNA liegt in der Regel zirkulär vor, dupliziert sich selbständig, und es ist bei Vertebraten zwischen 15.000 und 20.000 Basenpaaren lang.

Von Vorteil ist auch hier der geringe Bedarf an Gewebematerial für Populationsstudien, da das mitochondriale Genom in allen Zellen in hoher Kopienzahl vorhanden ist. Hervorzuheben ist, dass bei mitochondrialer DNA keine Vererbung im Mendel'schen Sinne vorliegt, sie verläuft meist maternal, da paternale mtDNA in der Zygote meist rasch abgebaut wird (LIGHTOWLERS et al. 1997).

- ◆ Da das Mitochondriengenom nicht rekombiniert, und haploid vorliegt, lässt sich die Abstammungsgeschichte der mt-Linien leicht verfolgen, was Phylogenie-Rekonstruktion vereinfacht. Aufgrund der haploiden und maternalen Vererbung verringert sich die effektive Populationsgröße im Vergleich zu nukleärer DNA auf ein Viertel, gleiches Geschlechterverhältnis vorausgesetzt. Allelfrequenzunterschiede zwischen isolierten Populationen stellen sich so aufgrund der genetischen Drift schneller ein, und Populationsdifferenzierungen lassen sich somit eher detektieren (MEYER 1994; WARD & GREWE 1994). Verglichen mit dem Kerngenom weist mtDNA eine relativ hohe Evolutionsrate, (ca. 10^{-6}) auf (BROWN et al. 1982) und eignet sich daher sehr gut zur Rekonstruktion der Phylogenie.

Tabelle 2.1: Studien an Bachforellen in Europa unter Verwendung von Mikrosatelliten und mitochondrialer DNA Analysen

Fragestellung	Marker	Land/Region	Quellen
genetische Differenzierung von Besatz- und Wildfisch	STR	Ostsee	WAS & WENNE 2002
	STR/mtDNA	Dänemark	HANSEN et al. 2000b, 2001
	STR	Dänemark	FRITZNER et al. 2001, HANSEN 2002
räumliche und zeitliche Untersuchung der Populationsstruktur	mtDNA	Gotland, Schweden	LAIKRE et al. 2002
Phylogeographische Studien	mtDNA	Österreich	DUFTNER et al. 2003
	mtDNA	Österreich	WEISS et al. 2001
	mtDNA	Spanien	CORTEY et al. 2004
	mtDNA	Griechenland	APOSTOLIDIS et al. 1997
	mtDNA	Deutschland	MILLER 1999
	mtDNA	Italien	GIUFFRA et al. 1994
Haplotypenanalyse, Rekolonialisierung von Habitaten	mtDNA	Portugal	WEISS et al. 2000
Evolutionsgeschichte der Bachforelle	mtDNA	europaweit	BERNATCHEZ et al. 1992, BERNATCHEZ 2001
Untersuchung endemischer Arten	mtDNA	Balkan, See Ohrid	SELL & SPIRKOVSKI 2004
Phylogeographie der Paläarktik, Sequenzierung	mtDNA	Iberische Halbinsel	SUÁREZ et al. 2001
Gründer Effekte	mtDNA	Dänemark	HANSEN & MENSBERG 1996
Genetisches Monitoring	STR	Dänemark	HANSEN et al. 2000a
<i>Methodikstudien:</i>			
Analyse mikrogeographischer Differenzierung	STR/ Allozyme	Frankreich	ESTOUP et al. 1998
Mikrosatelliten als diagnostische Marker für Besatz	STR	Frankreich, Schweiz, Italien	ESTOUP et al. 2000
Mikrosatelliten, Artificial Neural Networks, Unterscheidung zwischen Besatz und Wildfischen	STR	Frankreich	AURELLE et al. 1999

Speziell in fischgenetischen Studien haben sich folgende mtDNA-Regionen als sehr informativ erwiesen:

- ◆ Teilsequenzen der Untereinheiten der NADH Dehydrogenase (z.B. NIELSEN et al. 1996)
- ◆ kodierende Bereiche des Cytochrom b Gens (z.B. McVEIGH & DAVIDSON 1991)
- ◆ Teilsequenzen der ATPase (z.B. MEYER 1993)
- ◆ Cytochrom Oxidase (z.B. NORMARK et al. 1991)

Mitochondriale Kontrollregion (D-Loop) (z.B. GIUFFRA et al. 1994, BERNATCHEZ 2001).

2.4.3 Mikrosatelliten als genetische Marker

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Populationsstruktur ist die Verwendung von Mikrosatelliten. Als Mikrosatelliten (simple tandem repeats, STRs) werden Abschnitte der DNA mit einfachen, sich tandemartig wiederholenden, Sequenzmotiven bezeichnet. Sie gehören zur Gruppe der VNTRs (variable number of tandem repeats). Die Wiederholungseinheiten sind in der Regel zwei, drei oder vier Basenpaare lang. Man spricht daher von Di-, Tri- oder Tetranucleotiden (TAUTZ 1989).

In wie weit STRs selektiv neutral sind, wird derzeit diskutiert. Möglicherweise unterliegen STRs, wie im obigen Fall dargestellt, der natürlichen Selektion. Bis jetzt nimmt man allerdings an, dass STRs in nicht kodierenden Bereichen selektiv neutral sind (SCHLÖTTERER & WIEHE 1999).

Verglichen mit dem codierenden Bereich des Genoms liegt die Mutationsrate von Mikrosatelliten relativ hoch, zwischen 10^{-2} und 10^{-5} je haploidem Genom je Generation (WEBER & WONG 1993).

2.4.4 Microarray Analyse und quantitative PCR

Zur Erfassung, ob Ökotypen der Bachforelle tatsächlich funktionale Unterschiede anhand möglicher Variationen von Genexpressionen zeigen, muss der Schritt von der Genomik (Variationen bzw. Mutationen auf kodierenden und nicht kodierenden genetischen Markern) zur Transkriptomik (Variation der Expression von Genen) durchgeführt werden. Die Fertigstellung von Microarrays mit 16.000 Genen der verwandten Art *Salmo salar* seit Mitte 2005 durch die Norwegische Arbeitsgruppe GARSP bietet bei Übertragung auf die Bachforelle die Möglichkeit der genetisch-funktionalen Unterscheidung der über den populationsgenetischen Teil dieser Studie ermittelten evolutiven Linien. Hierzu gibt es bis

heute nur eine Arbeit welche die globale Genexpression mit dem Migrationsverhalten von Bachforellen verbindet (GIGER et al 2006). Es wurden dabei durch Mikrosatellitenanalysen zunächst die unterschiedlichen Linien differenziert und anschließend die funktionalgenetischen Unterschiede anhand von Microarrays erfasst. Auf genomischer Ebene ließen sich die geographischen Linien und auf transkriptomischer Ebene die Linien unterschiedlichen Verhaltens klar trennen.

3. Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

3.1.1 Herkunft der Proben

Die Gewebeproben der untersuchten Bachforellen stammen von 14 Populationen aus den Gewässereinzugsgebieten der Donau (Kleine Ohe, Biberbach, Dorfen, Fischbach, Reichenaubach, Jachen), der Elbe (Zinnbach, Wolfsbach), der Weser (Lutter), des Kemijoki (Pikku-Luiro) und des Tuloma (Kuutusojä, Ruohojärvenojä) sowie der Aulne (Elez).

Bei der Befischung des Pikku-Luiro fiel auf, dass innerhalb des oberen Flussabschnittes (mit Muschelvorkommen) überwiegend Alttiere und im unteren Abschnitt (ohne Muschelvorkommen) gehäuft Jungtiere auftraten. Es bestand der Verdacht, es könne sich um zwei Linien, eine migratorische und eine residente, handeln. Deshalb wurden die Proben (PI und PID) aus diesen beiden Flussabschnitten zunächst als getrennte Populationen behandelt. Zusätzlich stammen Gewebeproben aus einem Beispielbetrieb des Bezirks Oberfranken, der Fischzuchtanstalt Aufseß, die einen Teil des in Bayern für Perlmuschelgewässer verwendeten Besatzmaterials liefern (vgl. Tab 3.1).

3.1.2 Probennahme

Zur Probennahme wurde die von HALL & NAWROCKI (1995) beschriebene „fin-clip-sampling“ Methode verwendet, eine mittlerweile standardisierte Methode (GROSS et al. 2001, GUM et al. 2003). Die Fische wurden im Rahmen von Elektrobefischungen gefangen und die Proben in 96-99% Ethanol überführt. Das Tier wurde im Anschluss wieder in das Gewässer ausgesetzt. Die Elektrobefischung und die schonende Gewebeentnahme hat erwiesenermaßen keine dauerhafte Schädigung der Fische zur Folge (RÜMMLER et al. 1998). Insgesamt wurden 407 Proben aus 15 Populationen gesammelt (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Probenmaterial, Herkunftsort, Code, Anzahl (N), Besatz

Vorfluterfolge		Population	Code	Land	Perlmuschel- gewässer	N	Besatz
Zuchtstation		Aufseß	AO	D	nein	25	Zucht
Elbe	Sächsische Saale	Zinnbach	ZI	D	ja	20	-
Elbe	Sächsische Saale	Wolfsbach	WB	D	ja	20	-
Donau	Naab	Biberbach	BI	D	ja	25	+
Donau	Isar	Dorfen	D	D	nein	28	+
Donau	Isar	Fischbach	FB	D	nein	42	-
Donau	Isar	Reichenaubach	R	D	nein	72	-
Donau	Isar	Jachen	J	D	nein	25	-
Donau	Gaißa	Kleine Ohe	KO	D	ja	25	-
Weser	Aller	Lutter	LU	D	ja	25	-
Aulne		Elez	EL	F	ja	29	-
Kemijoki	Luiro	Pikku-Luiro	PI	FIN	ja	32	-
Kemijoki	Luiro	Pikku-Luiro	PID	FIN	ja	22	-
Tuloma	Suomujoki	Kuutusojä	KU	FIN	ja	6	-
Tuloma	Lutto	Ruohojärvenoja	FR	FIN	ja	11	-

D: Deutschland; F: Frankreich; FIN: Finnland; N: Anzahl, - : kein Besatz seit 1998; + : gelegentlich Besatz seit 1998

3.2 Molekulargenetische Methoden

3.2.1 DNA Präparation aus Flossenstücken

Die Präparation der genomischen DNA aus den Flossenstücken erfolgte mittels der DNA-Extraktions-Methode von HOGAN et al. (1986).

Die in Ethanol konservierten Proben wurden mit destilliertem Wasser gespült und kurz trockengetupft. Die tiefgefrorenen Proben konnten direkt verwendet werden.

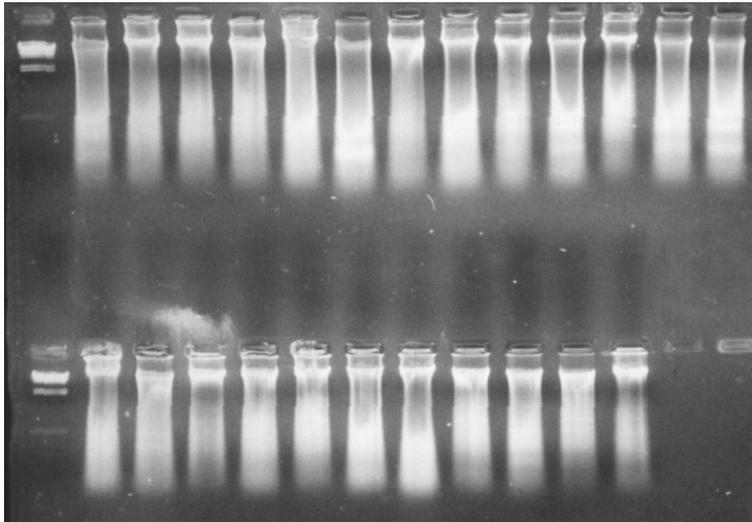


Abbildung 3.1: Kontrolle der Quantität und Qualität der DNA der Biberbach Proben

3.2.2 Mikrosatelliten (STRs)

Es wurden 9 Primerpaare aus den empfohlenen Mikrosatelliten des Trout Concert (<http://www.qub.ac.uk/bb/prodohl/TroutConcert/troutconcert.htm>) ausgewählt.

Die Auswahl der Mikrosatelliten erfolgte aufgrund der verschiedenen, in den Literaturstellen (Tab. 3.2) angegebenen Allellängen und nach einer, mit jeweils einigen Vergleichstieren durchgeführten, Test-Typisierung.

Tabelle 3.2: Ausgewählte Mikrosatellitensysteme

Name	Allele*	Länge*	Primersequenz	Quelle
Str15INRA	10	193-225	5'-TGCAGGCAGACGGATCAGGC-3' 5'-AATCCTCTACGTAAGGGATTTGC-3'	ESTOUP et al. (1993)
Str60INRA	9	87-111	5'-CGGTGTGCTTGTCAGGTTTC-3' 5'-GTCAAGTCAGCAAGCCTCAC-3'	ESTOUP et al. (1993)
Str73INRA	11	138-162	5'-CCTGGAGATCCTCCAGCAGGA-3' 5'-CTATTCTGCTTGTAAGTAGACCTA-3'	ESTOUP et al. (1993)
Str85INRA	19	146-200	5'-GGAAGGAAGGGAGAAAGGT-3' 5'-GGAAAATCAATACTAACA-3'	PRESA & GUYOMARD (1996)
Str543INRA	24	119-169	5'-ATTCTTCGGCTTTCTCTTGC-3' 5'-ATCTGGTCAGTTTCTTTATG-3'	PRESA & GUYOMARD (1996)
BS131	10	149-177	5'-CACATCATGTTACTGCTCC-3' 5'-CAGCCTAATTCTGAATGAG-3'	ESTOUP et al. (1998)
Str43INRA	Str43-1: 3	141-161	5'-GTTGTGGGCTGAGTAATTGG-3' 5'-CTCCACATGCATCTTACTAACC-3'	ESTOUP et al. (1998)
	Str43-2: 7	180-192		
Ssa171	22	201-243	5'-TTATTATCCAAAGGGGTCAAAA-3' 5'-GAGGTCGCTGGGGTTTACTAT-3'	O'REILLY et al. (1996)
Ssa85	9	104-120	5'-AGGTGGGTCCTCCAAGCTAC-3' 5'-ACCCGCTCCTCACTTAATC-3'	O'REILLY et al. (1996)
OmyFgt1TUF	27	187-263	5'-AGATTTACCCAGCCAGGTAG-3' 5'-CATAGTCTGAACAGGGACAG-3'	SAKAMOTO et al. (1994)

* Angaben laut Quellenangabe

3.2.3 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Mit Hilfe von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen konnten die ersten Nukleosidvariationen dargestellt werden. Zur Bildung von RFLPs werden Restriktionsenzyme eingesetzt, welche die DNA an für das jeweilige Enzym spezifischen Sequenzen erkennt und schneidet. Durch Kombination der PCR-Technik und der RFLP-Analyse ist es möglich DNA sehr rasch und kostengünstig auf Polymorphismen hin zu analysieren (z.B. BERNATCHEZ & OSINOV 1995, HANSEN et al. 1995).

Zur Untersuchung der mtDNA der Bachforellenproben wurde das mitochondriale Fragment ND5/6 ausgewählt, um einen Vergleich der Ergebnisse mit den von MILLER (1999) für Bayern ermittelten Daten zu ermöglichen. Dieses Fragment wurde bereits in Studien mit Bachforellen verwendet (z.B. BERNATCHEZ et al. 1992, BERNATCHEZ 1995, 2001, APOSTOLIDIS 1997). Das ND5/6 Fragment umfasst die NADH-Dehydrogenase-Untereinheiten 5 und 6 mit einer Größe von insgesamt 2470bp. Die Primer zur Amplifikation dieses Locus entstammen Literaturangaben (NIELSEN et al. 1998) und sind der Tabelle 3.8 zu entnehmen.

Tabelle 3.3: Sequenzen der ND5/6 Primer

Name	Primersequenz	Quelle
ND5/6A	forward : 5'-AATAGCTCATCCATTGGTCTTAGG-3'	NIELSEN et al. (1998)
ND5/6B	reverse : 5'-TAACAACGGTGGTTTTTCAAGTCA-3'	

Bei der Untersuchung von bayrischen Bachforellenpopulationen ist besonders die Unterscheidung zwischen den atlantischen und danubischen Typen interessant. Zur Vergleichbarkeit wurden Restriktionsenzyme gewählt, die sich bereits in vorangegangenen Studien bewährt haben (BERNATCHEZ et al. 1992, APOSTOLIDIS 1997, BERNATCHEZ 2001, SELL & SPIRKOVSKI 2004, MILLER 1999). Die Enzyme in Tabelle 3.9 wurden während des ersten Workshops des TROUT CONCERTs (EU FAIR-Programm CT973882, vom 29.6.-5.7.1998 in Silkeborg, Dänemark) als besonders geeignet eingestuft.

Tabelle 3.4: Verwendete Restriktionsenzyme und deren Erkennungs-/Schnittstellen

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz und Schnittstelle ()
AluI	AG CT
AvaII	G GACC oder G GTCC
MboII	(N) ₇ TCTTC
TaqI	T CGA

Nach dem Restriktionsverdau wurden die einzelnen Restriktionsfragmente auf einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht (Abb. 3.2). Zur Auswertung der RFLP-Gele wurden unterschiedliche Fragmentmuster eines jeden Restriktionsenzym mit einem Großbuchstaben benannt. Aus der Kombination der Schnittmuster in der Reihenfolge der Enzyme AluI, AvaII, MboII und TaqI ergab sich ein

Haplotyp. Dieser wird im Folgenden als RFLP-Haplotyp bzw. ND5/6-Haplotyp bezeichnet (z.B. ABBA für die unterschiedlichen Schnittmuster der vier Enzyme). Die RFLP-Haplotypenfrequenzen wurden durch einfaches Auszählen ermittelt.

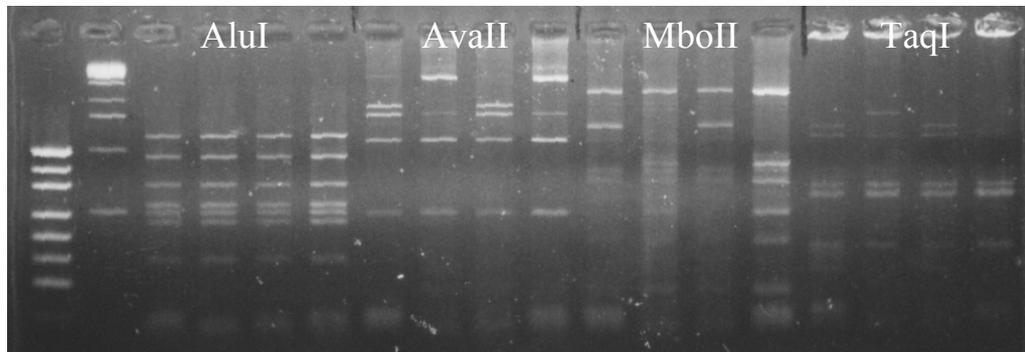


Abbildung 3.2: Restriktionsfragmente der Proben WB01, WB02, WB03, WB04 (Enzyme AluI, AvaII, MboII, TaqI)

3.2.4 Microarray und quantitative RT-PCR Analysen

Um eine sinnvolle Analyse der funktionalgenetischen Unterschiede durchzuführen müssen zunächst über die genomische Analyse die unterschiedlichen evolutiven Linien ermittelt und anschließend unter den gleichen Umweltbedingungen behandelt werden. In der vorliegenden Studie wurden je 8x5 Individuen (Fingerlingstadium) von Bachforellenlinien des atlantischen und danubischen Haplotyps in einem Rinnensystem an der AG für Fischbiologie TUM für fünf Tage nach folgendem Schema gehältert (Abb.3.3).

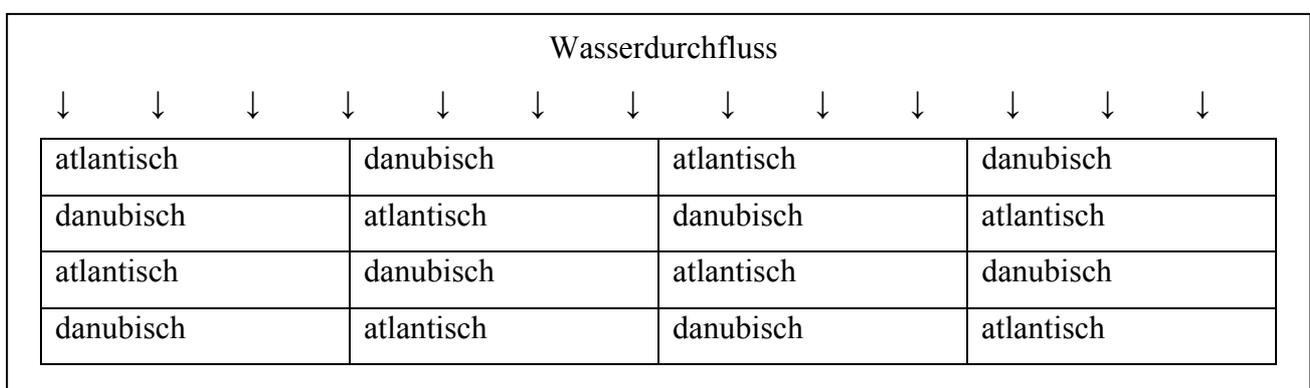


Abbildung 3.3: Tiermodell zur Transkriptionsanalyse

Anschließend wurden die Proben auf -196 C° bis zur RNA-Präparation gelagert und nach dem Protokoll des RNA-Prep-Kits von Quiagen die RNA isoliert. Die extrahierten RNA-Proben lagern bei -196C° an der AG Molecular Ecology and Conservation Genetics.

Die Hybridisierung der Microarrays erfolgte nach den Vorgaben der Arbeitsgruppe GARSP. Die Auswertung erfolgte mit dem Softwarepaket TIGR.

Zur intensiveren Untersuchung der Expressionsunterschiede wurden und werden intronüberspannende Fragmente der Superoxiddismutase SOD, Catalase (Cat) und Glutathionperoxidase (GPX) mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Als housekeeping gene dient β -Aktin. Das Softwarepaket STATISTIKA dient zur Auswertung.

Tabelle 3.5: Ausgewählte Genexpressionssysteme

Name	Länge*	Primersequenz
SOD	337	5'- GGGACCGTATTCTTTGAGCA-3' 5'- TTCCCAGATCATCAGCCTTC-3'
CAT	174	5'- GCCAAGGTGTTTGAGCATGT-3' 5'- AAAGAAGATGGGGGTGTTGTT-3'
GPX	138	5'- GGTGCCCTGCAA(T/C)CAGTT-3' 5'- TCCTTCCCATTCACATCCA-3'
β -Actin	103	5'- CATGTTTGAGACCTTCAACACC-3' 5'- ACCGGAGTCCATGACGATAC-3'

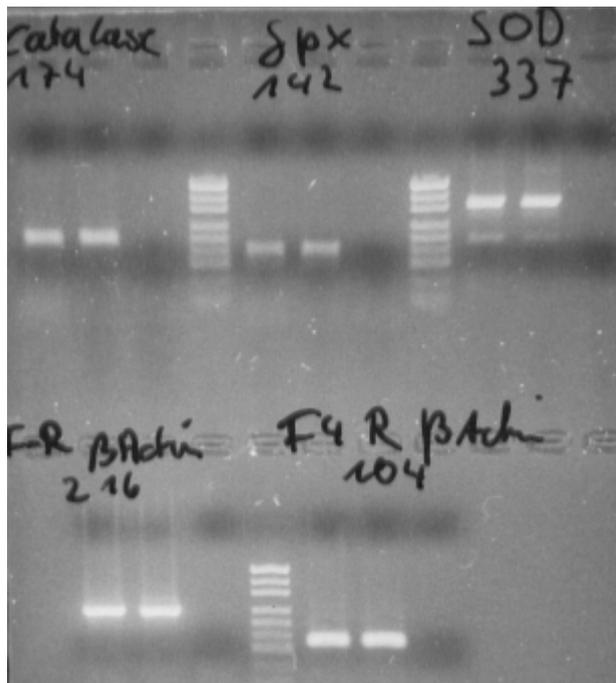


Abb.3.3: RT-PCR Amplifikate der Gene Catalase (Cat), Glutathionperoxidase (GPX) Superoxiddismutase SOD und β -Aktin unter Verwendung von Bachforellen RNA.

3.3 Statistische Methoden

Die durchgeführten Wahrscheinlichkeitstests basieren auf der Markov-Chain-Methode (GUO & THOMPSON 1992; RAYMOND & ROUSSET 1995 b). Bei den multiplen Tests fand eine Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni statt (RICE 1989).

3.3.1 Allelfrequenz, Allele pro Locus, Allelic Richness

Die Verteilung und Anzahl der Allele gibt einen Hinweis auf die genetische Diversität einer Population. Das genetische Potential einer Population ist umso variabler anzusehen, je mehr Allele in einer Population vorliegen und je gleichmäßiger diese Allele in ihr verteilt sind.

Die Allelfrequenzen, die Anzahl der Allele pro Locus (A) als auch die Allelic Richness (A_R) wurden mit dem Softwareprogramm FSTAT v.2.9.3 (GOUDET 2001) berechnet. Die Allelic Richness gibt die durchschnittliche Anzahl von Allelen je Locus unabhängig vom Stichprobenumfang an und wird häufig zur Beurteilung der genetischen Variation von Populationen herangezogen (LEBERG 2002).

3.3.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die Genhäufigkeiten in Populationen stehen in Idealpopulationen in einem stabilen Gleichgewicht zueinander. Unter der Annahme einer Idealpopulation stellt sich nach einer Generation das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Hardy-Weinberg equilibrium) ein (HARDY 1908, WEINBERG 1908).

Folgende Ereignisse werden für eine Idealpopulation angenommen:

- eine sich bisexuell fortpflanzende Population ist groß genug, so dass Zufallsschwankungen vernachlässigt werden können;
- jedes Individuum hat die gleiche Chance sich mit jedem anderen Geschlechtspartner zu paaren (Panmixie);
- es finden keine zufälligen oder beabsichtigten Veränderungen der Genhäufigkeiten durch Mutation, Selektion, Migration und Drift statt.

Durch Analyse der jeweiligen Populationen wird überprüft, ob diese den Annahmen einer Idealpopulation entspricht. Ergeben sich Abweichungen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, so trifft eine der oben getroffenen theoretischen Annahmen nicht zu. Mit Hilfe des Programms GENEPOP v.3.3 (RAYMOND & ROUSSET 1995a) wurden die Allelfrequenzen jeder Population und Loci auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht getestet. Alle ermittelten Werte des Hardy-Weinberg Gleichgewichts wurden nach Bonferroni (RICE 1989) korrigiert.

3.3.3 Heterozygotiegrad

Man unterscheidet zwischen dem erwarteten und dem beobachteten Heterozygotiegrad (H_e , H_o). Sie geben den Anteil der heterozygoten Tiere in einer Population an und stellen wichtige und häufig verwendete Parameter zur Quantifizierung der genetischen Variabilität von Populationen dar. Der erwartete Heterozygotiegrad H_e wird auch als Gendiversität bezeichnet (NEI 1987). Die Werte H_o und H_e wurden mittels des Softwareprogramms FSTAT v.2.9.3 (GOUDET 2001) errechnet.

3.3.4 Genetische Differenzierung

Der F_{ST} -Wert (WEIR & COCKERHAM 1984) wurde im paarweisen Vergleich der Populationen mit dem Softwareprogramm GENEPOP v.3.3 (RAYMOND & ROUSSET 1995a) ermittelt. F_{ST} wird zur Abschätzung der genetischen Unterschiede zwischen Populationen verwendet. Weicht der F_{ST} -Wert signifikant von Null über alle Loci ab, so kann man von einer genetischen Differenzierung der Populationen ausgehen (ESTOUP et al. 1996). Mit dem Programm STATISTICA 6.0 wurde eine Korrespondenzanalyse (KA) (BENZÉRCI 1973) durchgeführt um weitere Anhaltspunkte über den Grad der genetischen Differenzierung zu erhalten. Als erste verwendeten GREENACRE & DEGOS (1977) und SHE et al. (1987) diese Analysenmethode für genetische Datensätze. Die Korrespondenzanalyse gibt eine Beschreibung der Beziehungen zwischen Zeilen und Spaltenprofilen (Populationen und deren Allelfrequenzen aller Loci) einer Korrespondenztabelle in einem Raum mit wenigen Dimensionen wieder. Mittels der KA ist die genetische Differenzierung zwischen einzelnen Populationen in einem dreidimensionalen Raum darstellbar.

3.3.5 Assignment Test

Der Assignment Test (CORNUET et al. 1999, „as it is“-Option) wurde für alle Populationen nach der Bayesischen Methode mit Hilfe des Programms GENECLASS 1.0.02 (PIRY & CORNUET 1999) ausgeführt. Der Test dient der Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, dass ein Individuum aufgrund seines Genotyps der Population, aus der es entnommen wurde, zugeteilt wird.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Mitochondriale DNA-Analysen

4.1.1 Haplotypfrequenzen der ND5/6 Fragmente

Es wurden insgesamt 14 verschiedene RFLP-Haplotypen in den untersuchten Proben festgestellt. In Tabelle 4.1 ist die Anzahl der RFLP-Haplotypen für die einzelnen Populationen dargestellt.

Tabelle 4.1: ND5/6 Haplotypen-Verteilung (Anzahl, Gewässereinzug, Populationen)

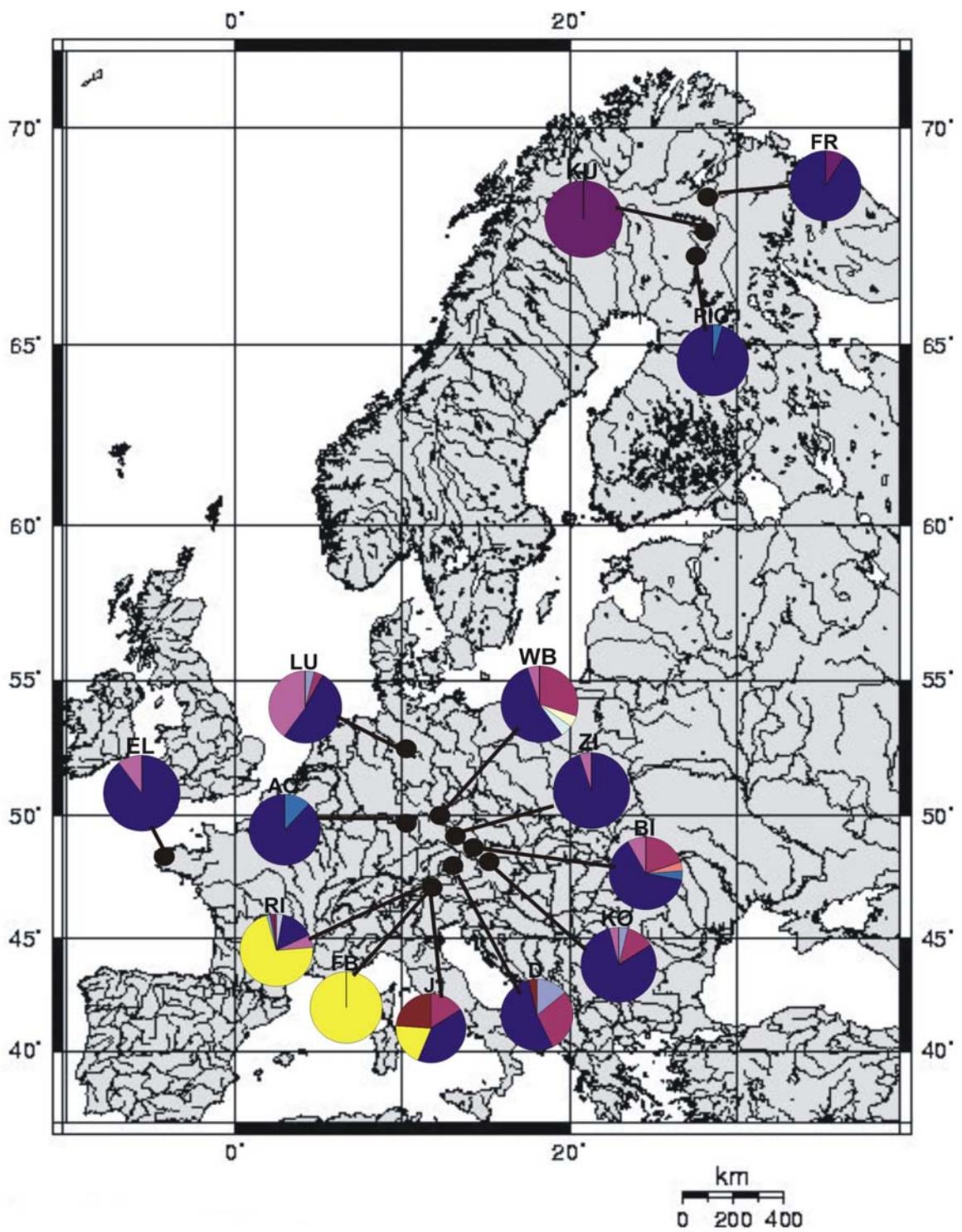
Haplotyp	Elbe			Donau				Weser	Aulne	Kemijoki		Tuloma		Zucht	Summe:
	ZI	WB	BI	KO	FB	R	J	D	LU	EL	PI	PID	KU	FR	
AABA				1				4	1						6
AAAA		6	5	3			4	8	1						27
BBBB		1													1
CAAA		1													1
ACBA												6	1		7
AADA			1												1
ABCB			1								1	1		3	6
ABAB						2									2
ABBB	19	11	16	20		11	10	15	13	26	31	21	10	22	225
ABBA	1	1	2	1		4			10	3					22
Atlantik	20	20	25	25	0	17	14	27	25	29	32	22	6	11	25
DCAC					42	52	5								99
DCBC						1									1
DCBD						1									1
DCAD						1	6	1							8
Donau	0	0	0	0	42	55	11	1	0	0	0	0	0	0	111

Die ND5/6-Haplotypen trennen sich auf in eine atlantische und eine danubische Line. Besonders erwähnenswert sind die Populationen FB, die ausschließlich Haplotypen der danubischen Linie aufweist, sowie die Populationen ZI, WB, BI, KO, LU, EL, PI, PID, KU, FR und AO, mit Haplotypen die ausschließlich der atlantischen Linie zugehören. Dabei sind der Haplotyp ABBB für die atlantische Line und der Haplotyp DCAC für die danubische Line dominierend. Die Populationen R, J und D zeigen sowohl Haplotypen der danubischen als auch atlantischen Line und müssen daher als Mischpopulationen bezeichnet werden. Auffällig ist, dass die Populationen des südlichen Einzugsgebietes der Donau (FB, R, J und

D), Haplotypen der danubischen Linie aufzeigen, wohingegen die des Nordeinzugsgebietes der atlantischen Linie zugehören.

Auf der Ebene der mtDNA zeigt die Population R mit 7 Haplotypen die größte genetische Variabilität, wobei hier nochmals erwähnt werden muss, dass diese eine Mischpopulation aus atlantischen und danubischen Haplotypen ist. Die Population WB hat mit 5 der atlantischen Linie zugehörigen Haplotypen ebenfalls eine große genetische mtDNA-Variabilität. Die Population FB nimmt eine Sonderstellung mit nur einem Haplotypen der danubischen Linie ein und ist daher bei Managementmaßnahmen mit besonderer Sorgfalt zu behandeln.

In Abbildung 4.2 sind die übertragenen Daten der ND5/6-Haplotypen gezeigt. Die Populationen PI und PID wurden hierbei zu einer Population (PI_G) zusammengefügt, da keine signifikanten Unterschiede in ihrer Haplotypenfrequenzen vorlagen.



Atlantischer Typ ■ AABA ■ AAAA ■ BBBB ■ CAAA ■ ACBA ■ AADA ■ ABCB ■ ABAB ■ ABBB ■ ABBA

Danubischer Typ ■ DCAC ■ DCBC ■ DCBD ■ DCAD

Abbildung 4.1: ND5/6 Haplotypenverteilung

4.1.2 Bayern als Kontaktzone der AT- und DA-Typen

Drei Wasserscheiden treffen sich in Bayern, die Oberläufe des Mains, der Elbe und der Donau. Geographisch liegen die Habitate der Bachforellen dieser drei Einzugsgebiete teilweise nur einige Kilometer auseinander. Zwischen den Eiszeiten oder währenddessen konnten sich diese getrennten Flussläufe verbinden (HANTKE 1993). Dadurch könnten sich Tiere des Donaeinzugsgebietes mit AT-Typen und umgekehrt gemischt haben. Nordbayern stellt somit eine Kontaktzone dieser beiden Typen dar.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, treten im Bereich der nördlichen Zuflüsse der oberen Donau (BI, KO) tatsächlich AT-Haplotypen auf. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden dass BI besetzt wurde. Studien, die mit Proben aus Bayern und Österreich durchgeführt wurden, zeigen ähnliche Ergebnisse (MILLER 1999, RIFFEL et al. 1995, BERNATCHEZ 1992, SUÁREZ 2001, WEISS et al. 2001). So zeigte MILLER (1999), je nördlicher der Donau die Proben entstammten, desto geringer war der Anteil an DA- Linien (3 - max. 26%). Südlich der Donau gehörten zwischen 7- 94% der untersuchten Bachforellen dem DA-Haplotypen an. Die vorliegende Arbeit bestätigt dieses Ergebnis und zeigt für die Populationen des südlichen Einzugsgebietes FB, R, J und D Anteile des danubischen Haplotyps von 100%, 76%, 0,44% und 0,04%. Es ist davon auszugehen, dass die Population Dorfen mit Tieren des atlantischen Typs besetzt wurde und somit nur noch ein geringer Anteil danubische Haplotypen vorhanden ist.

4.1.3 Zusammenhang der Bachforellen-Haplotypen und der Perlmuschelbestände

Um einen Zusammenhang zwischen einzelnen Haplotypen der Bachforellen und den Beständen der Flussperlmuscheln zu ermitteln, fand ein Vergleich der wichtigsten Studien zu diesem Gebiet statt (MILLER 1999, BERNATCHEZ 2001, GEIST 2005, CORTEY et al. 2004, SUÁREZ 2001). MILLER (1999) bearbeitete ebenfalls Populationen aus Flussperlmuschelgewässern. Diese waren im Folgenden: Wolfertsriederbach (Donau), Steinselb (Elbe/Nord), Höllbach (Elbe/Nord), Mähringsbach (Elbe/Nord), Grenzbach (Elbe/Süd) (vgl. MILLER (1999), GEIST et al. 2005). Aus den Daten wurden folgende Berechnungen angestellt: Im Wolfertsriederbach waren 12% des danubischen-Typen, sowie 88% des atlantischen-Typen zu finden. In Steinselb, Mähringsbach und Höllbach wiesen alle zu 100% den atlantischen-Haplotyp auf, im Grenzbach waren nur 5% danubischen und 95% atlantischen Typs vertreten. Ergänzt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, lässt sich ein Zusammenhang zwischen atlantischen Haplotypen der Bachforellen und dem Flussperlmuschelvorkommen sowie dem der danubischen Haplotypen und dem

Nichtvorkommen der Perlmuschel ziehen. Abbildung 4.2 zeigt die Karte des Verbreitungsgebietes der Flussperlmuschel und der atlantischen-Haplotypen.

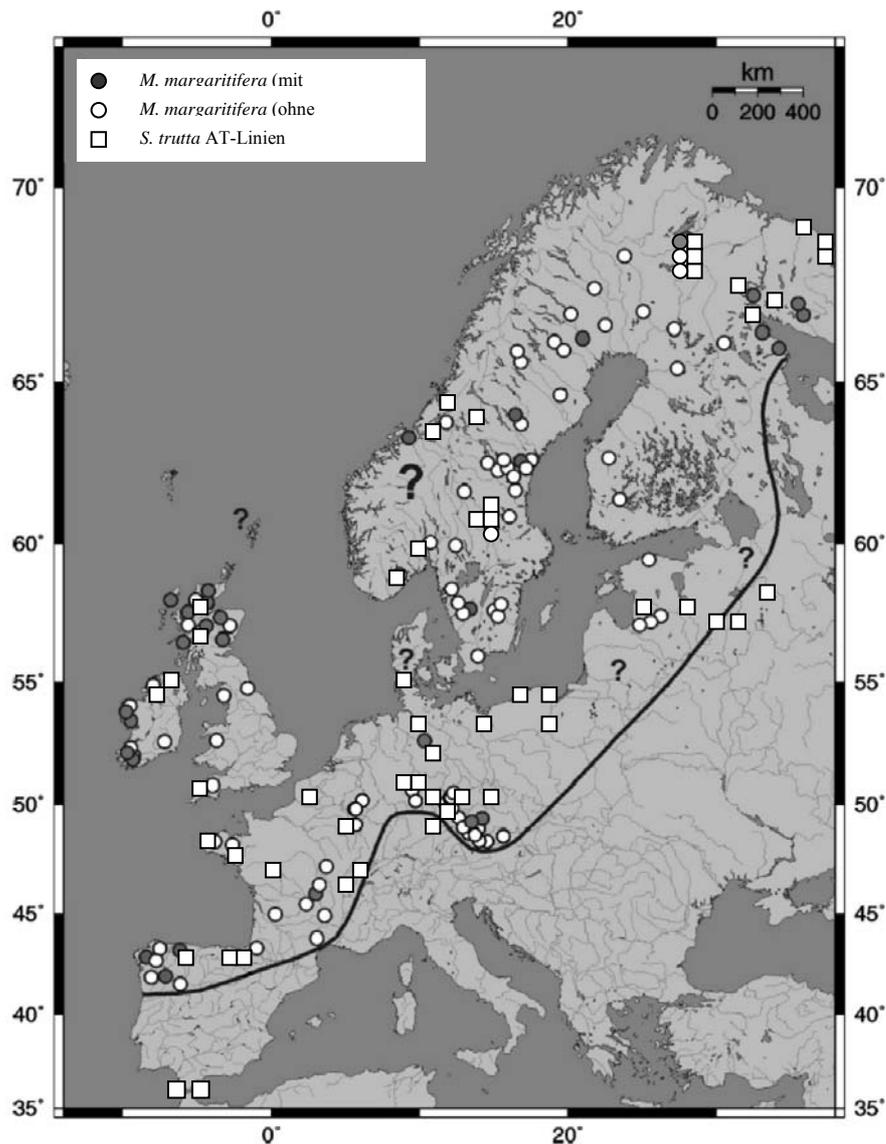


Abbildung 4.2: Flussperlmuschelpopulationen und Bachforellen AT-Linien in Europa (kombiniert aus vorliegenden Daten, GEIST 2005, BERNATCHEZ 2001, MILLER 1999, SUÁREZ 2001, CORTEY et al. 2004)

Wie aus der Karte in Abbildung 4.2 ersichtlich ist, liegt die Vermutung nahe, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Verbreitung der Perlmuschel und des AT-Typen in Europa besteht. Die Flussperlmuschel ist anscheinend nur in Gewässern zu finden, in denen ein deutliches Übergewicht des AT-Typen vorhanden ist. In Gewässern mit anderen Haplotypenverteilungen sind keine Flussperlmuscheln zu finden.

Es wird angenommen, dass die großen Süßwassermuscheln der Ordnung Unionoida (Unionacea) sich aus einer bisher nicht identifizierten marinen Gruppe des Trias entwickelt haben (WATTERS 2001). Sollte sich der Zusammenhang zwischen atlantischen Haplotypen der Bachforellen und dem Flussperlmuschelvorkommen bestätigen, so könnte dies ein weiterer Beweis des mutmaßlichen marinen Ursprungs der Flussperlmuschel sein. Bei einem marinen Ursprung der Flussperlmuschel liegt eine koevolutive Anpassung der Perlmuschel an die AT-Haplotypen der Bachforelle nahe. Mittels Infektionsversuchen von danubischen Haplotypenlinien von Bachforellen mit Perlmuschelglochidien ließe sich diese Hypothese überprüfen.

Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die Flussperlmuschel nur in kalkarmen Gebieten bzw. Flüssen Europas zu finden ist. Die Linie in Abbildung 4.2 stellt die südliche Verbreitungsgrenze der Flussperlmuschel innerhalb Europas dar (GEIST 2005). Es bleibt zu überprüfen, ob der gefundene Zusammenhang nicht durch eine zufällige Übereinstimmung der kalkarmen Regionen mit den Habitaten der AT-Linien zustande kommt.

Eine ursprüngliche Besiedlung Europas durch die Flussperlmuschel wäre theoretisch, außer durch die Bachforelle auch durch den Atlantischen Lachs (*Salmo salar* L.), möglich, der jedoch heute nur noch in den Gewässern Nordeuropas als Wirt der Perlmuschel dient. Alle untersuchten Proben stammen jedoch aus Gewässern, die als einzigen Wirtsfisch die Bachforelle aufweisen (GEIST et al. 2005). Auch hier könnten Infektionsversuche mit Perlmuschelglochidien weitere Erkenntnisse zur Koevolution von Perlmuschel und Salomiden liefern, die wichtige Grundlagen zur Erarbeitung von Erhaltungsstrategien bieten.

4.2. Mikrosatelliten Analyse

Da die Bachforelle tetraploiden Ursprungs ist (ALLENDORF & THORGAARD 1984), kommt es vor, dass ein einzelnes Primerpaar einen zweiten Locus amplifiziert. Dies ist bei dem verwendeten Mikrosatelliten Str43INRA der Fall. Er wurde in der Auswertung in die Mikrosatelliten Str43-1 und Str43-2 aufgeteilt, und im Folgenden wie zwei Mikrosatellitenloci behandelt.

4.2.1 Hardy-Weinberg Gleichgewicht

11 der 15 Populationen (AO, KO, LU, EL, BI, ZI, PI, PID, FB, R, J,D) zeigten signifikante Abweichungen von den erwarteten Hardy-Weinberg Verhältnissen, nach der erfolgten Korrektur nach Bonferroni. Die Populationen FR, KU, WB lagen im Hardy-Weinberg Gleichgewicht. Über die Loci betrachtet zeigten die Loci Str60 und Str85 keine Abweichungen vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht. Die Forellenpopulation des Reichenaubaches zeigte mit 8 signifikant abweichenden Loci das Maximum.

4.2.2 Genetische Variabilität innerhalb Populationen

Mittels der verwendeten 10 Mikrosatelliten konnten bei den 15 untersuchten Populationen insgesamt 146 verschiedene Allele gefunden werden. In Tabelle 4.2 sind die Allelfrequenzen der untersuchten Mikrosatelliten über alle Populationen dargestellt.

Die Mikrosatelliten Omyfgt1 und Str543 wiesen mit 34 und 24 detektierten Allelen die größte Allelzahl auf. Nur vier verschiedene Allele ließen sich mit Str43-2 nachweisen. Der erwartete Heterozygotiegrad (H_e) der Mikrosatelliten lag zwischen 0,237 (Str43-2) und 0,808 (Omyfgt1), der beobachtete Heterozygotiegrad (H_o) der Mikrosatelliten zwischen 0,234 (Str43-2) und 0,629 (BS131) (Tab. 4.2).

Tabelle 4.2: Mikrosatellitensysteme, Anzahl Allele, Allellänge, erwarteter (H_e) und beobachteter (H_o) Heterozygotiegrad

Locus	Anzahl Allele	Allellänge (bp)	H_o	H_e
BS131	16	129-179	0,629	0,614
Omyfgt1	34	183-255	0,590	0,808
Ssa85	10	104-126	0,513	0,555
Str15	12	209-227	0,615	0,655
Str43-1	5	141-155	0,437	0,502
Str43-2	4	176-190	0,234	0,237
Str543	24	119-169	0,583	0,636
Str60	5	93-105	0,421	0,410
Str73	8	136-150	0,518	0,568
Str85	14	146-182	0,498	0,500

Die erwarteten (H_e) und beobachteten (H_o) Heterozygotiegrade der einzelnen Populationen variierten zwischen 0,357 (FB) und 0,694 (KO) bzw. zwischen 0,243 (FB) und 0,636 (WB) (Tab. 4.3). Die Allelic Richness (A_R) bewegte sich zwischen 2,151 (FB) und 4,544 (KO). Bei

diesen drei wichtigsten Parametern zur Beschreibung der genetischen Variabilität von Populationen zeigte sich FB sehr auffällig. Mit 8 bzw. 7 Privatallelen grenzen sich die Populationen EL und KO stark von den anderen untersuchten Populationen ab.

Durch geographische bzw. anthropogen bedingte Barrieren ist Panmixie unterbunden, und eine genetische Durchmischung kann nicht mehr stattfinden. In diesem Fall bilden sich durch Drift Inselformationen aus. Dies bedingt nach WRIGHT (1943) eine Reduktion der Heterozygotiegrade und steht in engem Zusammenhang mit Inzucht und einem Verlust der genetischen Variabilität durch Drift. Inzucht ist definiert als die Paarung von Tieren, die stärker miteinander verwandt sind, als es dem Durchschnitt der Population entspricht (PIRCHNER 1979). Zufällige Veränderungen der Allelfrequenzen (Drift) aufgrund demographischer Prozesse führen zu einer genetischen Differenzierung (KUEHN 2004). Die Population FB kann aufgrund ihrer genetischen Variabilität und ihrer großen genetischen Distanzen zu den anderen untersuchten Populationen (Tab 4.5) als Inselformation angesehen werden und sollte bei Managementmaßnahmen besonders berücksichtigt werden.

Wichtig für die Bewertung der H_o , H_e , sowie der Allelic Richness der Aufseß-Zuchtstation (AO) ist zu beachten, dass es sich um einen neuen Zuchtstamm handelt. Dieser stammt von ca. 28 Tieren, die aus der Wiesent entnommen wurden (KLUPP, Fachberatung für Fischerei, Oberfranken, mdl. Aussage). In diesem Gewässer findet jährlich Besatz statt (Manfred Herrmann, Fliegenfischer-Schule, Hammermühle, mdl. Aussage). So lässt es sich erklären, weshalb eine geringe Allelic Richness und dennoch ein hoher, vom H_e abweichender, beobachteter Heterozygotiegrad zu finden sind (Tab. 4.3).

In Tabelle 4.3 sind die finnischen Populationen, abgesehen von der Fischbachpopulation (FB), diejenigen Populationen mit einem niedrigen beobachteten Heterozygotiegrad und den geringsten Werten der Allelic Richness.

Eine Besiedelung Finnlands konnte erst nach dem Rückgang der letzten Gletscher, vor etwa 10.000 Jahren stattfinden (SIEGERT & DOWDESWELL 2004). Somit ergeben sich für die geringen genetischen Variabilitäten der finnischen Populationen mehrere mögliche Erklärungen: 1) die geringen Werte beruhen auf den geringen Populationsdichten und der damit verbundenen Drift. 2) die Besiedelung durch wenige Gründertiere vor relativ kurzer Zeit lässt auf einen Flaschenhalseffekt schließen. Dies und natürlich die geographische Distanz (Isolation by Distanz) zu den anderen untersuchten Gebieten (Tab. 4.5) bedingt die großen genetischen Distanzen.

Tabelle 4.3: Populationen, Anzahl der Proben (N), durchschnittliche Anzahl von Allelen (A_D), Allelic Richness (A_R), Privatallele (A_{priv}), erwarteter (H_e) und beobachteter (H_o) Heterozygotiegrad

Population	N	A_D	A_R	A_{priv}	H_e	H_o
AO	25	3,40	2,779	0	0,504	0,620
BI	25	5,90	3,945	3	0,617	0,548
D	28	6,90	4,257	1	0,649	0,466
EL	29	6,50	4,005	8	0,616	0,600
FB	42	2,90	2,151	1	0,357	0,243
FR	11	2,70	2,432	0	0,419	0,400
J	25	6,40	4,116	3	0,598	0,483
KO	25	7,20	4,544	7	0,694	0,616
KU	6	2,40	2,400	0	0,418	0,433
LU	25	5,90	3,876	1	0,630	0,636
PI	32	3,20	2,453	0	0,402	0,406
PID	22	3,10	2,518	0	0,429	0,414
R	72	7,50	4,131	5	0,616	0,487
WB	20	5,00	3,656	1	0,628	0,633
ZI	20	5,40	3,570	3	0,623	0,575

Mit Hilfe des Assignment Tests wurde überprüft, wie viele Tiere mittels der Mikrosatelliten Analyse eindeutig zu ihrer Ursprungspopulation zugeordnet werden (Tab. 4.5). Durchgeführt wurde der Assignment Test mit dem Programm GENECLASS 1.0.02 (PIRY & CORNUET 1999) nach der Bayesischen Methode („leave one out“-Option). 81,33% der untersuchten Individuen konnten genetisch korrekt zu ihrer geographischen Herkunft zugeordnet werden. Eine 100% korrekte Zuordnung trat bei den FB und EL auf. Daher sollten wiederum diese Populationen bei Managementmaßnahmen besonders berücksichtigt werden. Die geringsten Werte einer korrekten Populationszuordnung zeigten die Dorfen (D) und die Jachen (J), und natürlich PI und PID.

Betrachtet man die Auswertung auf die jeweiligen Drainagen bezogen, so weist die Population Dorfen (D) eine starke genetische Durchmischung auf die durch den beschriebenen Besatz begründet ist.

Tabelle 4.4: Assignment Test der Bachforellenpopulationen (Bayesische Methode, „as it is“-Option, GENECLASS 1.0.02 (PIRY & CORNUET 1999))

Drainage	Elbe		Donau					Weser	Aulne	Kemijoki		Tuloma		Zucht	
Population	ZI	WB	BI	KO	FB	RI	J	D	LU	EL	PI	PiD	KU	FR	AO
ZI	16	2						2							
WB		18						1	1						
BI			20	2				2							1
KO			2	20		1	1	1							
FB					42										
RI			1			66	4	1							
J				2		7	15	1							
D	4		2	1		1	1	17	1					1	
LU							1	1	23						
EL			2	1			1			25					
PI											21	11			
PiD											10	12			
KU													4	2	
FR													1	10	
AO				1											24
% korr. zugeordnet	80,0%	90,0%	74,1%	74,1%	100,0%	88,0%	65,2%	65,4%	92,0%	100,0%	67,7%	52,2%	80,0%	76,9%	96,0%

4.2.3 Genetische Variabilität der Bachforelle im Vergleich zur Perlmuschel

Einen tieferen Einblick in die Koevolution zwischen Bachforelle und Perlmuschel liefert der Vergleich der beobachteten Heterozygotiegrade dieser beiden Arten. Bachforellenpopulationen ohne Perlmuschelvorkommen wurden aus diesem Datensatz entnommen.

Tab.: 4.5 Beobachtete Heterozygotie von Bachforelle und Perlmuschel (Geist and Kuehn 2005)

Population	H_o Bachforelle	H_o Perlmuschel
BI	0,548	0,278
EL	0,6	0,004
FR	0,4	0,483
KO	0,616	0,369
KU	0,433	0,484
LU	0,636	0,412
PI	0,41	0,484
WB	0,633	0,245
ZI	0,575	0,372

Zur Ermittlung der Regression zwischen den beobachteten Heterozygotiegraden der Bachforellen- und der Perlmuschelpopulationen wurde die Perlmuschelpopulation EL als Ausreißer ermittelt und in der weiteren Berechnung nicht berücksichtigt. Diese Population zeigte einen extrem niedrigen Heterozygotiegrad an nur einem von neun Mikrosatellitenlocus. Alle anderen Loci waren monomorph. Durchgeführt wurde die Regression mit dem dem Programm STATISTICA 6.0. Mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,56 konnte eine signifikant negative Regression ($p=0,033$) von -0,75 zwischen den Heterozygotiegraden der Perlmuschel und der Bachforellenpopulation ermittelt werden (Abb.4.6).

Dieser interessante Sachverhalt ist damit zu erklären, dass die Perlmuschel ein sehr oligotrophes Habitat bevorzugt und hierin die geringsten Driftwirkungen für diese Art auftreten. Demgegenüber steht die Bachforelle die in diesen Habitaten keine optimale Lebensgrundlage findet und daher stärkeren Driftwirkungen unterliegt.

Aus der Sicht des Populationsmanagements der Bachforelle, macht dies einen fundierten und sehr umsichtigen Managementplan notwendig.

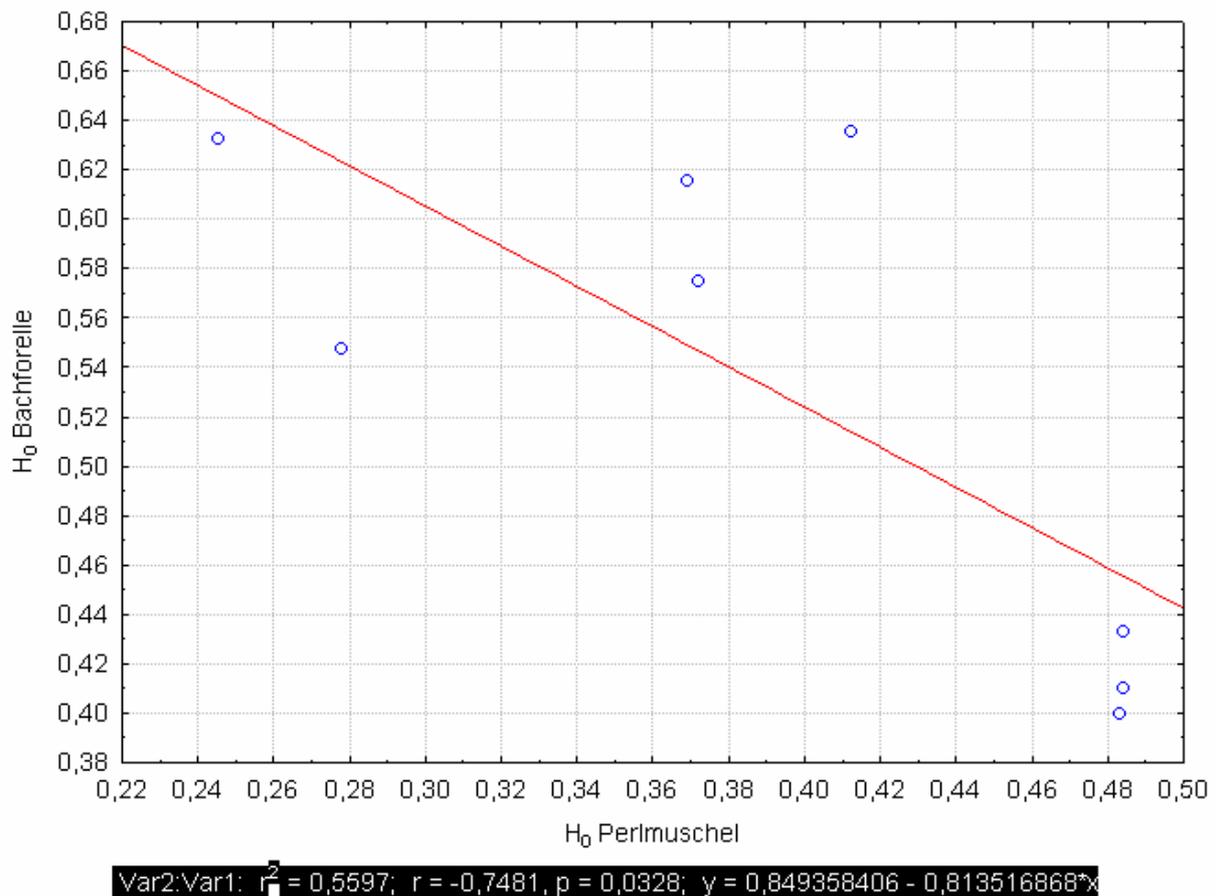


Abb. 4.6: Regression der beobachteten Heterozygotiegrade der Bachforelle und der Perlmuschel.

4.2.4 Genetische Differenzierung der Populationen

Als Parameter der genetischen Differenzierung zwischen Populationen dient der F_{ST} -Wert (WEIR & COCKERHAM 1984). In Tabelle 4.5 sind die paarweise ermittelten F_{ST} -Werte aller Populationen wiedergegeben. Die F_{ST} -Werte lassen sich wie folgt skalieren: geringe (0 – 0,05), moderate (0,05 – 0,15), hohe (0,15 – 0,25) und starke (> 0,25) Differenzierung (WRIGHT 1978, HARTL & CLARK 1997). Eine Strukturierung der untersuchten Populationen wird durch einen von Null abweichenden F_{ST} -Wert angezeigt, ein F_{ST} -Wert = „0“ deutet auf Panmixie hin. Ein hoher Polymorphiegrad der analysierten Loci kann jedoch die absoluten F_{ST} -Werte verringern und ein geringer F_{ST} -Wert von 0,05 kann dennoch auf eine nennenswerte Populationsdifferenzierung hinweisen. Aus diesem Grund, ist es nur sinnvoll F_{ST} -Werte derselben Studie zu vergleichen, um mögliche Beeinflussungen dieser Werte berücksichtigen zu können.

Die F_{ST} -Werte der Bachforellenpopulationen nahmen Werte von 0,0305 bis 0,3980 an. Dies spricht für eine geringe bis starke Differenzierung der einzelnen Populationen. Ausser PI und

PID sowie FR und KU zeigten die Populationen eine signifikante Populationsdifferenzierung nach Bonferoni-Korrektur.

Sehr auffällig ist wiederum die Population Fischbach (FB) mit hoher (zu allen Populationen der Donau) bis starker (alle anderen) Differenzierung. Die isolierte Stellung dieser Population spiegelt sich auch in einem hohen durchschnittlichen F_{ST} -Wert von 0,119 zwischen den Populationen der Donau wieder. Wie mehrfach erwähnt sollte daher die Fischbachpopulation bei Managementmaßnahmen besonders berücksichtigt werden.

Tabelle 4.5 : Paarweise ermittelte F_{ST} -Werte über alle 15 Populationen (WEIR & COCKERHAM 1984)

Drainage	Elbe		Donau					Weser	Aulne	Kemijoki		Tuloma		Zucht	
Population	ZI	WB	BI	KO	FB	R	J	D	LU	EL	PI	PID	KU	FR	AO
ZI															
WB	0,0383														
BI	0,0788	0,0984													
KO	0,0613	0,0753	0,0429												
FB	0,2634	0,2346	0,2414	0,2212											
R	0,1166	0,1152	0,0962	0,0879	0,1884										
J	0,1255	0,1214	0,1208	0,0877	0,2137	0,0563									
D	0,0548	0,0781	0,0522	0,0421	0,2274	0,0496	0,0571								
LU	0,0643	0,1014	0,0666	0,0850	0,3158	0,1600	0,1573	0,0788							
EL	0,1115	0,1291	0,1180	0,0979	0,3342	0,1284	0,1574	0,1096	0,1279						
PI	0,2988	0,2833	0,2552	0,2696	0,4215	0,2578	0,2420	0,2567	0,2732	0,3115					
PID	0,2782	0,2683	0,2225	0,2372	0,4061	0,2365	0,2191	0,2258	0,2338	0,2984	0,0305				
KU	0,1540	0,1591	0,1432	0,1360	0,3544	0,1850	0,1892	0,1351	0,1654	0,2202	0,3651	0,3326			
FR	0,2089	0,2156	0,1627	0,1414	0,3777	0,2228	0,2243	0,1758	0,2191	0,2352	0,3980	0,3567	0,0809		
AO	0,1937	0,1485	0,1489	0,1590	0,2539	0,1344	0,1529	0,1520	0,2343	0,2321	0,2571	0,2704	0,2570	0,3196	

Tabelle 4.6 zeigt die F_{ST} -Werte zwischen den Hauptdrainagen und lässt den Schluss zu, dass jede Drainage eine eigenständige evolutive Einheit darstellt und zudem isolierte Populationen beinhaltet. Daher müssen bei Managementmaßnahmen die evolutiven Einheiten der Drainagen, aber auch innerhalb dieser die besonderen genetischen Konstitutionen einzelner Populationen berücksichtigt werden.

Tabelle 4.6 : Paarweise ermittelte F_{ST} -Werte über alle 15 Populationen (WEIR & COCKERHAM 1984)

Drainage	Elbe	Donau	Weser	Aulne	Kemijoki	Tuloma	Zucht
Elbe							
Donau	0,119						
Weser	0,083	0,144					
Aulne	0,12	0,158	0,128				
Kemijoki	0,282	0,271	0,254	0,305			
Tuloma	0,184	0,204	0,192	0,228	0,363		
Zucht	0,171	0,167	0,234	0,232	0,264	0,288	

Durch die Korrespondenzanalyse mittels des Programms STATISTICA 6.0, wurden anhand der verschiedenen Allelfrequenzen die genetischen Unterschiede der einzelnen Populationen in einer 3D Graphik dargestellt (Abb. 4.6). Die Populationen PI und PID stehen getrennt von den anderen Populationen. Die beiden Populationen des Tuloma (FR und KU) gruppieren sich ebenfalls getrennt von den restlichen Populationen. Die deutschen Bachforellenpopulationen zeigen eine Tendenz der Gruppierung nach Drainagen, doch wird anhand der Korrespondenzanalyse die isolierte Stellung verschiedener Populationen wiederum deutlich und ergänzt somit die Ergebnisse der F_{ST} -Analyse.

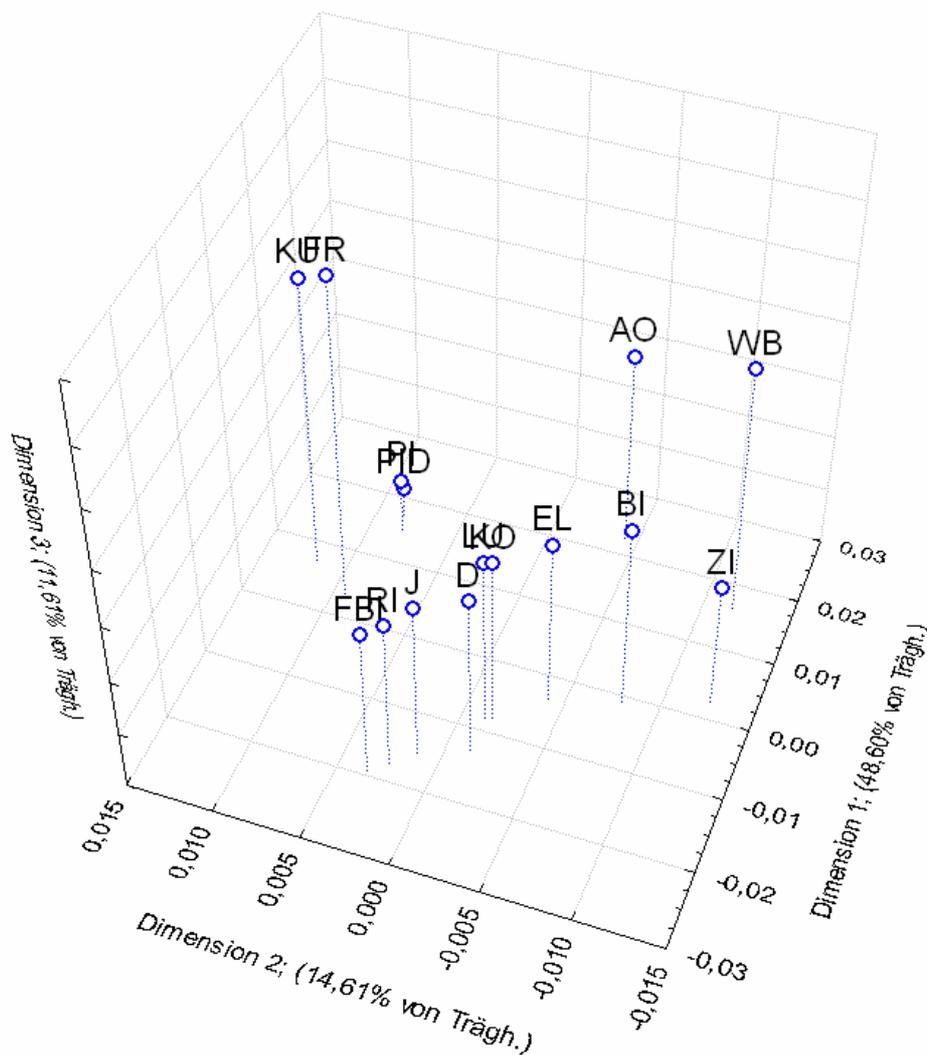


Abbildung 4.6: Korrespondenzanalyse der untersuchten Populationen (STATISTICA 6.0)

4.3 Microarray und quantitative RT-PCR

Die vorläufigen Ergebnisse der Mikroarrayanalysen deuten auf Expressionsunterschiede der danubischen und atlantischen Linien hin, doch müssen aufgrund großer Expressionsvarianzen noch weitere Versuche durchgeführt werden, um dieses Ergebnis absichern zu können. Da das unter 3.2.4 dargestellte Tiermodell nur einmal im Jahr durchführbar ist, sind hierdurch zeitliche Verzögerungen bedingt.

Die quantitativen Ergebnisse der RT-PCR von SOD, Cat, und GOX zeigen ebenfalls Tendenzen unterschiedlicher Expressionsstärken der atlantischen und danubischen Linien. Auch hier müssen die Ergebnisse in einer weiteren Versuchsdurchführung bestätigt und abgesichert werden.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, mit Hilfe von Mikrosatelliten und mitochondrialen Genen die genetische Struktur von Bachforellen (*Salmo trutta*) aus Flussperlmuschelgewässern (*Margaritifera margaritifera* L.) darzustellen, evolutive Einheiten zu ermitteln und mögliche Genexpressionsvariationen zu erfassen.

Zur phylogeographischen und populationsgenetischen Analyse wurden 407 Proben aus 14 verschiedenen Populationen der Gewässersysteme Elbe, Donau, Weser, Aulne, Kemijoki und Tuuloma mit teils noch funktionalen Flussperlmuschelpopulationen (mit Jungmuschelproduktion) und nicht mehr funktionalen Populationen und eine Zuchtpopulation untersucht. Ergebnisse vorhandener Studien konnten verifiziert werden. Weiter wurde ein Vergleich mit Bachforellen- und Flussperlmuschelstudien durchgeführt, um den coadaptiven Zusammenhang zwischen Bachforellen- und Perlmuschelpopulationen zu erarbeiten.

Durch RFLP-Analyse eines mitochondrialen Gens konnte die Populationen in die atlantische und danubische Abstammungslinie eingeordnet werden. Durch Kombination der eigenen Ergebnisse mit Bachforellen- und Perlmuschelstudien konnte eine Übereinstimmung des Verbreitungsgebietes des atlantischen Bachforellenhaplotypen und der Perlmuschelbestände in Europa festgestellt werden. Dies legt die Vermutung einer Koevolution der, als Glochidien auf der Bachforelle parasitierenden, Flussperlmuschel und dem atlantischen Haplotypen der Bachforelle nahe.

Zur detaillierten Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse und der genetischen Diversität auf Individuen- und Populationsebene wurden 10 unterschiedlich polymorphe Mikrosatellitensysteme genotypisiert. Die Ergebnisse der Allelic Richness, der erwarteten (H_e) und beobachteten (H_o) Heterozygotiegrade der einzelnen Populationen zeigten eine geringe Variabilität der Population des Fischbachs (FB). Mittels des Assignment Tests wurde die genetische Reinheit der Populationen erfasst. Die paarweisen F_{ST} -Werte sowie die Korrespondenzanalyse zeigten eine deutliche Differenzierung der Hauptdrainagen und lässt den Schluss zu, dass jede Hauptdrainage eine eigenständige evolutive Einheit darstellt die jedoch in sich isolierte Populationen beinhaltet. Bei Managementmaßnahmen ist dies zu berücksichtigen.

Die vorläufigen Ergebnisse der funktionalgenetischen Analysen mittels Microarrays und quantitativer RT-PCR zeigen Genexpressionsunterschiede der danubischen und atlantischen Linien, doch sind für eine gesicherte Aussage noch weitere Untersuchungen nötig. Die vorliegende Arbeit unterstützt die These, dass sowohl für das Bachforellen- als auch für das

Perlmuschelmanagement die Einhaltung evolutiver Einheiten, die sich in den Hauptdrainagen sowie im speziellen Fall der Donau im nördlichen und südlichen Einzugsgebiet widerspiegeln, als auch die Berücksichtigung einzelner Populationen besonderer genetischer Konstitution in allen geplanten Erhaltungsstrategien einbezogen werden müssen.

6. Literaturverzeichnis

- Allendorf F & Thorgaard G 1984: Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. In: The Evolutionary Genetics of Fishes (ed Turner BJ) Plenum Publishers New-York :1-53
- 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 :531-542
- Arkhipov SA, Ehlers J, Johnson RG & Wright HE Jr 1995: Glacial drainages towards the Mediterranean during middle and late Pleistocene. *Boreas* 24 :196-206
- Aurelle D, Lek S, Giraudel J-L & Berrebi P 1999: Mikrosatellites and artificial neural networks: tools for the discrimination between natural and hatchery brown trout (*Salmo trutta* L) in Atlantic populations. *Ecological modelling* 120 :313-324
- Avise J C 1994: Molecular markers natural history and evolution. New York Chapman & Hall :514
- Avise J C, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel J E, Reeb C A & Saunders N C 1987: Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 18 :489-522
- Bauer G 1987: Reproductive strategy of the freshwater pearl mussel *Margaritifera Margaritifera*. *Journal of Animal Ecology* 56 :691-704
- Bauer G & Vogel C 1987: The parasitic stage of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*). I Host relationships *Archiv für Hydrobiologie* 76 :413-423
- Bauer G 1988: Threats to the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* in central Europe. *Biological Conservation* 45 :239-253
- Bauer G 1994: The adaptive value of offspring size among freshwater mussels (Bivalvia: Unionoidea). *Journal of Animal Ecology* 63 :933-944
- Behnke R J 1972: The systematics of salmonid fishes of recently glaciated lakes. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 29 :639-671
- Behnke R J 1986: Brown trout. *Trout* 27: 42-47
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N & Bonhomme F 1996–2001: GENETIX 4.0.2 logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome Populations Interactions CNRS UMR 5000 Montpellier France: Université de Montpellier II
- Benzécri J 1973: L'analyse des données Tome I: La taxinomie; Tome II: L'analyse des correspondances. Paris
- Berg R, Blank S & Strubelt T 1989: Fische in Baden-Württemberg. Ministerium für ländlichen Raum Ernährung Landwirtschaft und Forsten Baden-Württemberg :158

Berg LS 1948: Freshwater fishes of the Soviet Union and adjacent countries. Vol1 Akademy Nauk Moskow

Bernatchez L & Osinov A 1995: Genetic diversity of trout (genus *Salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variation. *Molecular Ecology* 4 :285-297

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 2001: The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic nested clade and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution* 55 :351-379

Bianco P G 1990: Potential role of the palaeohistory of the Mediterranean and Paratethys basins on the early dispersal of Euro-Mediterranean freshwater fishes. *Ichthyological Explorations of the Freshwaters Vol1 No 2* :167-184

Brabrand A, Koestler AG & Borgstrøm R 2002: Lake spawning of brown trout related to groundwater influx. *Journal of Fish Biology* 60 :751-763

Brohede J & Ellegren H 1999: Microsatellite evolution: polarity of substitution within repeats and neutrality of flanking sequences. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 266 :825-833

Brown M, Prager EM, Wang A & Wilson A C 1982: Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution* 18 :225-239

Cornuet JM, Piry S, Luikart G, Estoup A & Solignac M 1999: New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153 :1989-2000

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

Cunjak RA & McGladdery SE 1991: The parasite-host relationship of glochidia (Mollusca: Margaritiferidae) on the gills of young-of-the-year Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Zoology* 69 :353-358

Duftner N, Weiss S, Medgyesy N & Sturmbauer C 2003: Enhanced phylogeographic information about Austrian brown trout populations derived from complete mitochondrial control region sequences. *Journal of Fish Biology* 62 :427-435

Elliott JM 1994: *Quantitative Ecology and the Brown Trout*. Oxford: Oxford University Press xi+ 286

Estoup A, Presa P, Krieg F, Vaiman D & Guyomard R 1993: (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity* 71 :488-496

- 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 :339-353
- Estoup A, Solignac M, Cornuet JM, Goudet J & Scholl A 1996: Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. *Molecular Ecology* 5 (1) :19-31
- Estoup A, Largiadere CR, Cornuet JM, Gharbi K, Presa P & Guyomard R 2000: Juxtaposed microsatellite systems as diagnostic markers for admixture: an empirical evaluation with brown trout (*Salmo trutta*) as model organism. *Molecular Ecology* 9 :1873-1886
- Fritzner NG, Hansen MM, Madsen S & Kristiansen K 2001: Use of microsatellite markers for identification of indigenous brown trout (*Salmo trutta* L.) in a geographical region heavily influenced by stocked domesticated trout. *Journal of Fish Biology* 58 :1197-1210
- Geist J 2005: Conservation Genetics and Ecology of European Freshwater Pearl Mussels (*Margaritifera margaritifera* L.) Dissertation an der Fakultät des Wissenschaftszentrums Weihenstephan für Ernährung Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München :121
- Geist J, Porkka M & Kuehn R accepted 2005: The status of host fish populations and fish species richness in European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) streams. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*
- Geist J & Kuehn R 2005: Genetic diversity and differentiation of central European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) populations: implications for conservation and management. *Molecular Ecology* 14 :425-239
- 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 :207-220
- 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(2) :161-171
- Greenacre MJ & Degos L 1977: Correspondence analysis of HLA gene frequency data from 124 population samples. *American Journal of Human Genetics* 29 :60-75
- Gross R, Kuehn R, Baars M, Schröder W, Stein H & Rottmann O 2001: Genetic differentiation of European grayling populations across the Main Danube and Elbe drainages in Bavaria. *Journal of Fish Biology* 58 :264–280
- Goudet J 2001: FSTAT a program to estimate and test gene diversities and fixation indices Version 2.9.3.
- Gum B, Gross R, Rottmann O, Stein H, Schröder W & Kuehn R 2003: Microsatellite variation in Bavarian populations of European grayling (*Thymallus thymallus*): implications for conservation Conservation. *Genetics* 4 :659-672

- Guo SW, Thompson EA 1992: Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48 (2) :361–372
- Hall HJ & Nawrocki LW 1995: A rapid method for detecting mitochondrial DNA variation in the brown trout *Salmo trutta* *Journal of Fish Biology* 46 360-364
- Hänfling B & Brandl R 1998: Genetic variability population size and isolation of distinct populations in the freshwater fish *Cottus gobio* L. *Molecular Ecology* 7 :1625-1632
- Hansen MM 2002: Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (*Salmo trutta*) populations: an approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Molecular Ecology* 11 :1003-1015
- Hansen MM, Hynes RA, Loeschcke V & Rasmussen G 1995: Assessment of stocked or wild origin of anadromous brown trout (*Salmo trutta* L.) in Danish river system using mitochondrial DNA RFLP analysis. *Molecular Ecology* 4 :189-198
- Hansen MM & 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 :422-436
- Hansen MM & Mensberg K-L D 1996: Founder effects and genetic population structure of brown trout (*Salmo trutta*) in a Danish river system. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53 :2229-2237
- Hansen MM, Nielsen EE, Ruzzante DE, Bouza C & Mensberg K-L D 2000a: Genetic monitoring of supportive breeding in brown trout (*Salmo trutta* L.) using microsatellite DNA markers. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57 :2130-2139
- Hansen MM, Ruzzante DE, Nielsen EE & Mensberg K-L D 2000b: Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery trout and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Molecular Ecology* 9 :583-594
- Hansen MM, Ruzzante DE, Nielsen EE & Mensberg K-L D 2001: Brown trout (*Salmo trutta*) stocking impact assessment using microsatellite DNA markers. *Ecological Apply* 11 :148-160
- Hantke R 1993: *Flußgeschichte Mitteleuropas*. 460 Seiten Stuttgart Enke
- Hardy GH 1908: Mendelian proportions in a mixed population. *Science* 28 :49-50
- Hartl DL & Clark AG 1997: *Principles of Population Genetics* Sinauer Ass Sunderland Mass
- Haury J, Ombredane D & Baglinière JL 1999: The habitat of the brown trout (*Salmo trutta* L.) in water courses. In: Baglinière JL & Maisse G eds *Biology and ecology of the brown trout and sea trout* Berlin: Springer-Praxis Series in Aquaculture and Fisheries :37–89
- Hindar K, Jonsson B, Ryman N & Ståhl G 1991: Genetic relationships among landlocked resident and anadromous brown trout *Salmo trutta* L.. *Heredity* 66 :83-91

Hogan BLM, Constantini F & Lacy E 1986: Manipulating the mouse embryo section D. Cold Springs Harbor Laboratory Press Cold Springs Harbor New York

Israel W 1913: Biologie der europäischen Süßwassermuscheln. KG Lutz Verlag Stuttgart :44-47

Jansen W, Bauer G & Zahner-Meike E 2001: Glochidial mortality in freshwater mussels; In: Bauer G and Wachtler K (eds) Ecology and Evolutionary Biology of the freshwater mussels Unionoidea. Ecological Studies 145 Springer Verlag Heidelberg :185-211

Johnson KR, Wright JE Jr & May B 1987: Linkage relationships reflecting ancestral tetraploidy in salmonid fish. Genetics 116 :579-591

Keith P 1998: Evolution des peuplements ichtyologiques de France et stratégies de conservation. PhD diss Université de Rennes I France

Klemetsen A, Amundsen P-A, Dempson JB, Jonsson B, Jonsson N, O'Connell MF & Mortensen E 2003: Atlantic salmon *Salmo salar* L. brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. Ecology of Freshwater Fish 12 :1-59

Kottelat M 1997: European freshwater fishes. Biologia (Bratislava) 52 Suppl 5 :1-271

Kuehn R 2004: Genetische Ansätze der Molekularen Ökologie zur Sicherung der Biodiversität. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia Legendi für Molekulare Ökologie und Conservation Genetics an der Technischen Universität München :382

Laikre L, Järvi T, Johansson L, Palm S, Rubin J-F, Glimsäter CE, Landergren P & Ryman N 2002: Spatial and temporal population structure of sea trout at the Island of Gotland Sweden delineated from mitochondrial DNA. Journal Fish Biology 60 :49-71

Laikre et al 1999: Conservation Genetic Management of Brown Trout (*Salmo trutta*) in Europe Report by the Concerted action on identification management and exploitation of genetic resources in the brown trout (*Salmo trutta*). ("TROUTCONCERT"; EU FAIR CT97-3882)

Lagiardér C R & Scholl A 1995: Effects of stocking on the genetic diversity of brown trout populations to the Atlantic and Danubian drainages in Switzerland. Journal of Fish Biology 47 (Suppl A) :209-222

Leberg PL 2002: Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. Molecular Ecology 11 :2445-2449

Lelek A 1987: The freshwater fishes of Europe. Threatened fishes of Europe Wiesbaden Aula :346

Leuner E, Klein M, Bohl E & Jungblut JH 2000: Ergebnisse der Artenkartierungen in den Fließgewässern Bayerns - Fische Krebse Muscheln. Hrsg: Bayerisches Staatsministerium für Ernährung Landesanstalt und Forsten Dezember 2000 :212

- Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM & Howell N 1997: Mammalian mitochondrial genetics: heredity heteroplasmy and disease. *Trends in Genetics* 13 :450-455
- Lubieniecki B & Steinberg L 1987: Die Auswirkungen von anthropogener Gewässerversauerung auf die Ichthyofauna - insbesondere der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario* L.) - in ausgesuchten Mittelgebirgsbächen. *Fischwirt* 37 (4): 25–30, (5): 33–38
- MacCrimmon H L & Marshall T L 1968: World distribution of brown trout *Salmo trutta*. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 25 :2527-2548
- Machordom A, Araujo R, Erpenbeck D & Ramos MA 2003: Phylogeography and conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionoidea). *Biological Journal of the Linnean Society* 78 :235-252
- McVeigh HP & Davidson WS 1991: A salmonid phylogeny inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Journal of Fish Biology* 39 (Suppl A) :277-282
- Meyer A 1994: DNA technology and Phylogeny of fish. In: *Genetics and evolution of aquatic organisms* (ed) Beaumont AR Capman and Hall London :177-199
- Meyer A 1993: Evolution of mitochondrial DNA in fishes In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Volume 2* (ed) Hochachka PW & Mommsen TP Elsevier New York :1-38
- Miller M 1999: Populationsgenetische Analyse bayrischer Bachforellen *Salmo trutta* Linnaeus 1758 anhand von mitochondrialen Restriktionfragmentlängenpolymorphismen (mtRFLP's) (Teleostei: Salmoniformes), Diplomarbeit an der LMU München
- Moritz C, Dowling TE & Brown W M 1987: Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18 :269-292
- Nei M 1987: *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ Press New York
- Nelson JS 1976: *Fishes of the world*. Wiley New York
- Nielsen EE, Hansen MM & Loeschke 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 :216-220
- Nielsen EE, Hansen MM & Loeschke V 1996: Genetic structure of European populations of *Salmo salar* L. (Atlantic salmon) inferred from mitochondrial DNA. *Heredity* 77 :351-358
- Normark PP, McCune AR & Harrison RG 1991: Phylogenetic relationships of Neopterygian fishes inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 8 :819-834
- O'Reilly PT, Hamilton LC, McConnell SK & Wright JM 1996: Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53 :2292-2298

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 :762-786

Pakkasmaa S & Piironen J 2001: Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations Biological Journal of the Linnean Society 72 :231–239

Pechlahner R 1984: Historical evidence for the introduction of arctic charr into high mountain lakes of the Alps by man. In: Johnson L and Burns B (Hrsg) Biology of the arctic charr University of Manitoba Press :594-557

Pirchner F 1979: Populationsgenetik in der Tierzucht. Verlag Paul Parey Hamburg und Berlin

Piry S & Cornuet JM 1999: GENECLASS: A Program for Assigination and Exclusion using Molecular Markers. France URLB/INRA

Presa P & Guyomard R 1996: Conservation of microsatellites in three species of salmonids. Journal of Fish Biology 49 :1326-1329

Raymond M & Rousset F 1995a: GENEPOP (version 33): 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

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

Rice WR 1989: Analysing tables of statistical tests. Evolution 43 :223-225

Rümmler F, Schreckenbach K & Pfeifer M 1998: Auswirkungen der Elektrofischerei auf Fische. Fischer & Teichwirt 3/1998 :88-92

Ryman N 1983: Patterns of distribution of biochemical genetic variation in salmonids: differences between species. Aquaculture 33 :1-21

Sakamoto T, Okamoto N, Ikeda Y, Nakamura Y & Sato T 1994: Dinucleotide-repeat polymorphism in DNA of rainbow trout and its application in fisheries science. Journal of Fish Biology 44 :1093-1096

Schlötterer C & Wiehe T 1999: Microsatellites a neutral marker to infer selective sweeps. In: Microsatellites: Evolution and applications (Eds: Goldstein DB & Schlötterer C) Oxford University Press Oxford :238-247

Sell J & Spirkovski Z 2004: Mitochondrial DNA differentiation between two forms of trout *Salmo letnica* endemic to the Balkan Lake Ohrid reflects their reproductive isolation. Molecular Ecology 13 :3633-3644

- She J-X, Autem M, Kotoulas G, Pasteur N, Bonhomme F 1987: Multivariate analysis of genetic exchanges between *Solea aegyptiaca* and *Solea senegalensis* (Teleosts Soleidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 32 :357-371
- Siegert MJ & Dowdeswell JA 2004: Numerical reconstructions of the Eurasian Ice Sheet and climate during the Late Weichselian. *Quaternary Science Reviews* 23 :1273-1283
- Suárez J, Bautista JM, Almodóvar A & Machordom A 2001: Evolution of the mitochondrial control region in Palaeartic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian Peninsula. *Hereditary* 87 :198-206
- Svardson G 1945: Chromosome studies of salmonidae. Report of the Sweden State Institute of Freshwater Fisheries Research 23 :1-151
- Tautz D 1989: Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research* 17 :6463-6471
- Terofal F 1984: Süßwasserfische in europäischen Gewässern. Mosaik Verlag München
- Wächtler K, Dreher-Mansur MC & Richter T 2001: Larval types and early postlarval biology in naiads (Unionoidea). In: Bauer G Wächtler K (eds) *Ecology and evolution of the freshwater mussels Unionoidea Ecological Studies 145* Springer Verlag Heidelberg :93-125
- Ward RD & Grewe PM 1994: Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4 (3) :300-325
- Was A & Wenne R 2002: Genetic differentiation in hatchery in wild sea trout (*Salmo trutta*) in the Southern Baltic at microsatellite loci. *Aquaculture* 204 :493-506
- Watson JD, Gilman M, Witkowski J & Zoller M 1992: *Recombinant DNA*. Scientific American Books 2. Auflage
- Watters GT 2001: The evolution of the Unionacea in North America and its implications for the worldwide fauna In: Bauer G Wächtler K (eds) *Ecology and Evolution of the freshwater mussels Unionoidea. Ecological Studies 145* Springer Verlag Heidelberg :281-307
- Weber JL & Wong C 1993: Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2 (8) :1123-1128
- Weinberg WR 1908: Über Vererbungsgesetze beim Menschen. *Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre* 1 :377-392 und 440-460
- Weiss S, Antunes A, Schlötterer C & Alexandrino P 2000: Mitochondrial haplotype diversity of brown trout *Salmo trutta* L. in Portuguese rivers supports a simple broad-scale model of the Pleistocene recolonization of northern Europe. *Molecular Ecology* 9 :691-698
- Weiss S, Schlötterer C, Waidbacher H & Jungwirth M 2001: Haplotype (mtDNA) diversity of brown trout *Salmo trutta* in tributaries of the Austrian Danube: massive introgression of Atlantic basin fish - by man or nature? *Molecular Ecology* 10 :1241-1246
- Weir BS 1996: *Genetic Data Analyses. II* Sinauer Associates Sunderland Massachusetts

Weir BS & Cockerham CC 1984: Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38 :1358–1370

Wright S 1943: An analysis of local variability of flower color in *Linanthus parrya*. *Genetics* 28 :139–156

Wright S 1978: *Evolution and the genetics of populations*, vol. 4, Variability within and among natural populations University of Chicago Press Chicago IL

Young MR, Williams JC 1984: The reproductive biology of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (Linn) in Scotland. I *Field Studies Archiv für Hydrobiologie* 99: 405-422

Ziuganov V, Zotin A, Nezhlin L & Tretiakov V 1994: *The freshwater pearl mussels and their relationships with salmonid fish*. VNIRO Russian Federal Institute of Fisheries and Oceanography Moscow, 104 Seiten