



**Angewandte Genomics: Dokumentation, Analyse und Aquakulturpotential natürlicher aquatischer Ressourcen: Seesaiblings-
Populationen (*Salvelinus cf. umbla*) in Deutschland**

Projekt Nr.: 07BM025

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz

(BMELV)

Betreut durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

(BLE)

Laufzeit: 07.10.2008 – 31.07.2010

Projektnehmer: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)

Institut für Fischerei

Weilheimer Straße 8, 82319 Starnberg

E-Mail: Fischerei@LfL.bayern.de

Telefon: 08151 2692-0

Abschlussbericht

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung6
2	Stand des Wissens.....7
2.1	Biologie des Seesaiblings7
2.2	Verbreitungsgebiet8
2.3	Aquakultur.....9
2.4	Genetik11
3	Berichtsteil I: Untersuchungen zur Aquakultur15
3.1	Material und Methoden15
3.1.1	Projektskizze15
3.1.2	Projektdurchführung.....16
3.1.3	Auswahl der Gewässer16
3.1.4	Befischungstermine18
3.1.5	Befischung und Eigewinnung18
3.1.6	Erbrütung.....18
3.1.7	Anfütterung19
3.1.8	Aufzucht19
3.1.9	Herkunftsvergleich19
3.1.9.1	Versuchsordnung19
3.1.9.2	Versuchsanlage.....21
3.1.9.3	Haltungsumwelt21
3.1.9.4	Fütterung21
3.1.9.5	Leistungsparameter21
3.1.9.6	Statistik.....24
3.2	Ergebnisse25
3.2.1	Laichfischfang25
3.2.2	Eimengen und Größen.....25
3.2.3	Erbrütung.....26
3.2.4	Anfütterung28
3.2.5	Herkunftsvergleich29
3.2.5.1	Ausgangsqualität29
3.2.5.2	Wasserparameter29
3.2.5.3	Leistungseigenschaften30
3.3	Diskussion38

3.3.1	Laichfischfang	38
3.3.2	Erbrütung.....	38
3.3.3	Anfütterung	38
3.3.4	Eignung für die Aquakultur.....	39
3.3.5	Zusammenfassende Leistungsbewertung	41
3.4	Fotodokumentation.....	44
4	Berichtsteil II: Untersuchungen zur Genetik	56
4.1	Material und Methoden	56
4.1.1	Auswahl der beprobten Populationen	56
4.1.2	Vorbereitung der rezenten Proben.....	56
4.1.3	Vorbereitung der historischen Schuppenproben	56
4.1.4	Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Analyse.....	57
4.1.5	Mikrosatellitentypisierung	62
4.1.6	Datenauswertung	65
4.1.7	Statistische Auswertung	65
4.1.7.1	Populationsgenetische Analysemethoden	65
4.2	Ergebnisse	68
4.2.1	Untersuchte Hypothesen	68
4.2.2	Analyseergebnisse	68
4.2.2.1	Auswertbare Proben	68
4.2.2.2	AFLP –Daten.....	69
4.2.2.3	Mikrosatelliten-Daten.....	78
4.2.3	Zusammenfassung der Genetik-Ergebnisse	88
4.2.3.1	Überprüfung der Hypothesen/Teilhypothesen	88
4.2.3.2	Identifizierung ursprünglicher vs. veränderter bayerischer Seesaiblingsbestände	89
4.3	Diskussion	91
5	Literaturverzeichnis.....	93

Zusammenfassung

In einem vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) finanzierten und von der Bundesanstalt für Landwirtschaft (BLE) betreuten Projekt zu den aquatisch genetischen Ressourcen in Deutschland wurden Seesaiblingspopulationen aus sieben voralpinen (Ammersee, Königssee, Tegernsee, Walchensee, Hintersee, Bodensee und Starnberger See) und drei hochalpinen Seen (Soiernsee, Grünsee, Seealpsee) dokumentiert und eine genetische Analyse zur Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse, der Veränderung der Populationen im historischen Vergleich durchgeführt. Die genetischen Daten der rezenten Populationen wurden sowohl untereinander, als auch mit denen historischer Gewebeproben verglichen. Darüber hinaus wurden während der Laichsaison Elterntiere aus den voralpinen Seen gefangen und abgestreift. Die Eier wurden unter kontrollierten Bedingungen erbrütet und die Larven angefüttert. Stichproben von fünf ausgewählten Herkünften (Tegernsee, Walchensee, Hintersee, Bodensee und Starnberger See) wurden für die Dauer von sieben Monaten unter praxisüblichen Aquakulturbedingungen aufgezogen. Dabei wurden die Wachstumsleistung, Futterverwertung, Überlebensrate, Kondition und der Gesundheitsstatus untersucht.

Aquakultur:

Während der Aufzucht stellte sich die Anfütterung der Wildfisch-Nachzuchten problematisch dar: Anfänglich wurden die angebotenen Trockenmischfuttermittel kaum angenommen. Erst die übergangsweise Zufütterung von gefrorenem Zooplankton verbesserte die Futterakzeptanz. Die vergleichenden Untersuchungen während der Aufzuchtphase ergaben eine grundsätzliche Eignung aller einbezogenen Herkünfte für die Aquakultur. Bei geringer Verlustrate wuchsen die Gruppen in den ersten Monaten gut ab, allerdings verringerte sich die Futteraufnahme und Wachstumsleistung in der zweiten Versuchshälfte, in der bereits die Gonadenreifung begann. Die Auswertung am Versuchsende ergab insgesamt gut konditionierte, gesunde Fische. Auffallend war das ungleichmäßige Individualwachstum, was insbesondere bei den schlecht wachsenden Herkünften Tegernsee und Walchensee auffiel. Die Fische aus dem Hintersee und Starnberger See zeigten dagegen deutlich bessere Leistungen. Aus der Gesamtauswertung ergab sich, dass die Seesaiblinge aus dem Bodensee unter den gegebenen Beprobungs- und Aufzuchtbedingungen die beste Leistungsfähigkeit zeigten.

Genetik:

Die genetische Dokumentation und Analyse der untersuchten Populationen auf der Basis zweier Markersysteme (AFLPs, Mikrosatelliten) ergab verschiedene Ergebnisse. Für alle historisch und aktuell typisierbaren Populationen liegt eine Dokumentation ihrer genetischen Diversität an ca. 2000 anonymen Genorten (AFLPs) und sechs einzeln ansprechbaren Genorten vor. Die vergleichende Analyse der Populationen miteinander ergab in den meisten Fällen signifikante Unterschiede, die darauf hindeuten, dass sowohl historische als auch rezente Populationen in ihrer genetischen Ausstattung differieren. Im Zusammenhang mit dem Aquakulturpotential ausgewählter rezenter Populationen kann davon ausgegangen werden, dass diese Populationen sich nicht nur in etwa 2000 „neutralen“, sondern auch in selektierbaren genetischen Merkmalen unterscheiden und die Stämme deshalb eine diverse und solide Grundlage für züchterische Optimierungen in der Aquakultur ergeben.

Durch die genetische Verwandtschaftsanalyse im historischen Vergleich konnten rezente deutsche Populationen identifiziert werden, die über die Zeit wenig verändert sind und deshalb die ursprüngliche Diversität der aquatischen genetischen Ressource „Seesaibling“

in Bayern am deutlichsten repräsentieren: Ammersee, Königssee. Andererseits ergaben sich im historischen Populationsvergleich deutliche Veränderungen für den Starnberger See und den Tegernsee. Diese Veränderungen sind durch den Zusammenbruch dieser Populationen durch die Eutrophierung dieser Seen in den 1970er Jahren erklärlich (Starnberger See, Tegernsee). Deswegen erstaunt es auch nicht, dass die beiden neu aufgebauten Populationen große genetische Ähnlichkeiten haben. Die Population des historischen Walchensees unterscheidet sich ebenfalls deutlich von der aktuellen, jedoch nur in einem Teil der Individuen. Diese Population entstammt Besatzmaßnahmen im Mittelalter und ist nachträglich mit verschiedenen künstlichen Populationen augmentiert worden. Die Population des Bodensees unterscheidet sich am deutlichsten von allen anderen, was durch die geographische Separation erklärt werden kann. Wie auch die Population des Hintersees wurde sie nicht als natürliche Population beprobt, sondern es konnten nur Brütlinge (Bodensee), bzw. Jährlinge (Hintersee) untersucht werden. Die Interpretation im natürlichen evolvierten Kontext ist daher eingeschränkt. Die Probennahme kann erklären, warum der rezente Hintersee einen größeren Anteil an Bodensee-ähnlichen genomischen Anteil enthält, die Selektion in der *ex-situ* Aquakultur dieser Proben entstanden sein kann. Die Hochgebirgs-Population des Soiernsees ist mit hoher Wahrscheinlichkeit durch eine kleine Gründerpopulation in ihrer genetischen Vielfalt reduziert und deshalb in sich sehr homogen. Ihre Ähnlichkeit mit historischen Populationen aus dem Tegernsee, Walchensee und Schliersee zeigt an, dass sich in Hochalpenseen historische Replikat aquatischer genetischer Ressourcen gehalten haben könnten.

1 Einleitung

Die Nutzung der natürlichen aquatischen genetischen Ressourcen in der Binnenfischerei und Aquakultur Deutschlands beruht vor allem auf der Basis natürlicher Bestände der Bachforelle (*Salmo trutta*) und des Karpfens (*Cyprinus carpio*). Neben anderen Nebenfischarten wird insbesondere dem Seesaibling (*Salvelinus cf. umbla*) ein hohes Potential in der Forellenteichwirtschaft eingeräumt (FEAP, 2005). Nur wenige Teichwirtschaften in Deutschland verfügen bislang über eigene Seesaiblingsbestände. Es wird erwartet, dass dem Seesaibling in der zukünftigen Aquakultur eine größere Bedeutung zuteil wird, und für viele Fischzüchter ist der Ausbau ihrer Produktpalette für einen dauerhaften wirtschaftlichen Erfolg unumgänglich. In der Regel handelt es sich bei den auf den Betrieben gehaltenen Seesaiblingsbeständen um importierte Stämme aus Skandinavien oder Kanada. Kaum ein Betrieb greift auf natürliche genetische Ressourcen aus deutschen Gewässern zurück. Zu den Leistungseigenschaften der verschiedenen heimischen Herkünfte in der Aquakultur gibt es zudem kaum wissenschaftliche Untersuchungen.

Im Gegensatz zu reinen Zuchtstämmen sind die natürlichen Populationen besonders in der zweiten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts durch Besatzmaßnahmen und zum Teil durch drastische Umweltveränderungen beeinträchtigt, d.h. die genetische Integrität und Diversität rezenter Populationen entspricht zum Teil nicht mehr ihrem ursprünglichen Zustand. Durch die Verbesserung molekulargenetischer Labortechniken erschließen sich seit kurzer Zeit Möglichkeiten, Populationen natürlich evolvierter aquatischer genetischer Ressourcen-Arten auf genomischer Ebene zu charakterisieren und ihren Veränderungsgrad in genomischer Hinsicht differenziert abzuschätzen. Diese Erkenntnisse dienen dazu Grundlagen für die Analyse des genetischen Potentials natürlicher aquatischer Ressourcen in Bezug auf aquakulturrelevante Merkmale zu liefern.

Vor diesem Hintergrund erhielt das Institut für Fischerei der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) den Auftrag, aus ausgewählten bayerischen Gewässern Seesaiblinge zu untersuchen. Betreut wurde das Projekt durch das Referat Agrarforschung (514) der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE). Der Abschlussbericht wurde nach einem einführenden Teil in den Berichtsteil I: „Untersuchungen zur Aquakultur“ und einen Berichtsteil II: „Untersuchungen zur Genetik“ gegliedert.

2 Stand des Wissens

2.1 Biologie des Seesaiblings

Seesaiblinge (Familie Lachsartige –Salmonidae) aus dem Formenkreis um *Salvelinus alpinus* (,Seesaiblings-Formenkreis oder „Arctic Charr complex“) sind sehr gut an die extremen Lebensbedingungen der arktischen und alpinen Gewässer angepasst. Sie tolerieren tiefere Temperaturen als alle anderen Salmoniden und sind ausgesprochene Habitat- und Ernährungsgeneralisten (KLEMETSEN et al., 2003). In Deutschland kommen Seesaiblinge typischerweise in kalten und nährstoffarmen Seen des Alpen- und Voralpengebietes vor, sind aber in der Arktis auch in Flusssystemen anzutreffen. Als individuell extrem anpassungsfähige Nahrungsgeneralisten nutzen sie in der Arktis fast das gesamte Nahrungsnetz des Gewässers (KLEMETSEN et al., 2003, 2010). Die Hauptnahrung juveniler Fische stellen kleine Crustaceen und Insekten dar (CAVALLI UND CHAPPAZ, 1996; KLEMETSEN et al., 2003, 2010). Die Seesaiblinge der verschiedenen Lokalitäten können eine extrem große Variabilität in phänotypischen Merkmalen aufweisen, z.B. in Färbung, in Größe oder Alter zur Geschlechtsreife, in Wachstum und in ihrer Lebensweise (JOHNSON, 1980; VØLLESTAD UND LÁBÉE-LUND, 1994; KLEMETSEN et al., 2003, 2010). Die verschiedenen Ökotypen oder Formen gehen in vielen Fällen auf einen genetisch kaum fixierten Polymorphismus zurück, in einigen Fällen handelt es sich aber auch genetisch deutlich unterschiedliche Formen, die sich nicht mehr untereinander kreuzen (JONSSON UND JONSSON, 2001, KLEMETSEN et al., 2003, 2010). Auch innerhalb eines Gewässers können unterschiedliche Typen von Seesaiblingen vorkommen. Dort nutzen diese separaten ökologischen Nischen und zeigen dementsprechend differenzierte Lebensweisen. Ein Beispiel dafür ist das Vorkommen von vier Formen in einem einzigen See, die auf einer genetischen Basis differenziert sind, ist der Bestand im isländischen Thingvalla (MAGNUSSON UND FERGUSON, 1987; SANDLUND et al., 1992). Dort treten neben einer großwüchsigen pelagischen Form, die sich piscivor ernährt, eine planktivore Normalform im Freiwasser sowie zwei benthivore Formen mit unterschiedlichen Endgrößen auf. Eine Aufspaltung in verschiedene Formen ist auch in einigen Gewässern des Alpenraums zu beobachten, allerdings scheinen diese Formen nicht genetisch differenziert zu sein, sondern entwickeln sich jeweils neu. Dort tragen diese drei Freiwasser-Formen die Namen Wildfangsaibling (großwüchsig), Normalsaibling (mittlere Größe) und Schwarzreuter oder Schwarzreiter (kleinwüchsig) (KOTTELAT UND FREYHOF, 2007). Zudem wurden aus dem Bodensee und aus dem Ammersee sogenannte Tiefseesaiblinge mit stark unterständigem Maul und benthischer Lebensweise beschrieben. Über die korrekte Artbezeichnung der verschiedenen alpinen Seesaiblingspopulationen herrschte lange Zeit Unklarheit. Zurzeit werden die Tiefseesaiblinge aus dem Bodensee und Ammersee jeweils als eigene Arten geführt, die innerhalb des „Arctic Charr complex“ der alpinen Art *Salvelinus umbla* zuzuordnen sind (*Salvelinus profundus* und *Salvelinus evasus*) (BEHNKE, 1984; FREYHOF UND KOTTELAT, 2007). Zur Laichzeit erscheinen manche Formen fast farblos (z.B. im Ammersee), dagegen weisen die meisten anderen eine stark bunte Färbung mit karminroten Flanken und weißgeränderten Flossen auf (KLEMETSEN et al., 2003, 2010; KOTTELAT UND FREYHOF, 2007; JOHNSON, 1980). Die Laichzeit des Seesaiblings erstreckt sich über die Monate September bis Dezember, wobei auch einige Populationen zu späteren Zeitpunkten laichen können. Von den Tiefseesaiblingen des Ammersees werden das ganze Jahr über laichreife Tiere gefangen (FREYHOF UND KOTTELAT, 2005). Bei Wassertemperaturen von etwa 4 °C werden im Kies des Gewässergrundes flache Laichgruben ausgewedelt, in die die Seesaib-

linge hinein laichen. In Abhängigkeit von der Wassertemperatur schlüpfen die Larven nach 65 bis 100 Tagen.



Abb. 1: Seesaiblinge *Salvelinus cf. umbla* aus deutschen Voralpenseen (Hintersee oben; Königssee mitte und unten) (Fotos: A. Hartl)

2.2 Verbreitungsgebiet

Die Seesaiblinge aus dem Seesaiblings-Formenkreis wurden erstmals von LINNAEUS (1758) als *Salmo alpinus* und *Salmo umbla* beschrieben. Seesaiblinge haben das größte Verbreitungsgebiet aller Lachsartigen, und sind die am nördlichsten vorkommenden Süßwasserfische der Erde (JOHNSON, 1980; KLEMETSEN, 2010). Die Heimatgewässer in Küstennähe erstrecken sich von Nordamerika über Grönland, Island, Großbritannien, den Färöer Inseln und Skandinavien bis nach Sibirien. In der Regel kommen Seesaiblinge nicht weiter als ungefähr 100 km von der Küste landeinwärts entfernt vor. Ausnahmen bilden einige sibirische Seen um und weit jenseits des Baikalsees, die – wie viele andere Seenpopulationen auch – von nicht wandernden (stationären) Formen besiedelt wurden. Zudem kommen sie in Zentraleuropa weit entfernt vom Meer in den Seen der Alpen und Pyrenäen vor. Dorthin gelangten sie den schmelzenden Gletschern folgend über die drei Flusssysteme

teme Rhein, Rhone und Donau (BRUNNER et al., 1998) und bilden postglaziale Reliktvoorkommen. Sie leben dort in den tiefen Voralpenseen, aber auch in hochalpinen Seen in Höhen von 2000 m über dem Meeresspiegel vor. Die Bestände der hochgelegenen Seen gehen jedoch sicher auf Besatzmaßnahmen zurück, die teilweise bereits im Mittelalter durchgeführt wurden (PECHLANER, 1984). Im Genfersee befindet sich die südlichste, natürlich verbreitete Seesaiblings-Population (RUBIN, 1993). Über 65° Nord in Europa und 49° Nord in Nordamerika gibt es anadrome Populationen, die im Spätsommer und Herbst wieder ins Süßwasser ziehen (JOHNSTON, 2002). In den südlich liegenden Breitengraden gibt es ausschließlich stationäre oder vom Meer isolierte Bestände (KLEMETSEN et al., 2003). Weltweit schätzt MAITLAND (1995) etwa 50.000 Populationen. Seesaiblinge wurden auch außerhalb ihres natürlichen Verbreitungsgebietes besetzt, z.B. südlich des Alpenhauptkammes im Luganer See und Comer See, sowie im Lago Maggiore. Im letzten Jahrhundert gelangten Seesaiblinge auch Zypern oder Serbien Montenegro (WELCOMME, 1988), wo sie sich erfolgreich in den Gewässern etablierten. Nach BARTLEY (2006) wurden Seesaiblinge sogar bis zu den vor der Antarktis liegenden Kerguelen transportiert und dort mit Erfolg in Gewässer eingesetzt. Dagegen verliefen Besatzbemühungen in Dänemark (HOLCIK, 1991) oder Marokko im Jahre 1948 (WELCOMME, 1988) nicht erfolgreich.

In Deutschland sind natürliche Populationen sicher aus dem Hintersee (Berchtesgaden), dem Königssee (mit dem verbundenen Obersee), dem Tegernsee, Schliersee, Starnberger See, Ammersee und Bodensee bekannt. Die Population aus dem Walchensee wurde nach SCHRANK (1793) im Jahre 1503 durch Besatz mit Tieren aus dem Tegernsee gegründet, wobei nicht gesichert ist, ob es im Walchensee bereits davor Seesaiblinge gegeben hat. Sicher in historischer Zeit besetzte Hochalpenseen sind der Vilsalpsee, der Grünsee und dem Soiernsee (KUSSMAUL, 1986). Der Bestand aus dem Saiblingssee südlich von Hohenschwangau, den SCHRANK (1786) erwähnt, scheint zwischenzeitlich ebenso erloschen zu sein (SCHLIEWEN, unveröffentlicht), wie der von QUINDT (1980) im Funtensee erwähnte. Im vergangenen Jahrhundert sind Seesaiblinge verschiedenster Herkünfte in Talsperren, weitere Hochgebirgsseen, aber auch im ursprünglich seesaiblingsfreien Chiemsee und Kochelsee eingesetzt worden. Durch die Eutrophierung vieler Voralpenseen in der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts waren die Bestände im Starnberger See und im Schliersee erloschen (KUSSMAUL, 1986). Bestrebungen, die Wachstumsleistung der autochthonen Bestände zu steigern führten seit etwa 1890 zu Besatzmassnahmen. Darüber hinaus kam es aufgrund zurückgehender Bestandszahlen in den 1970er Jahren vermehrt zu Besatzmaßnahmen, die z.B. zum erfolgreichen Wiederaufbau einer stabilen Population im Starnbergersee geführt hat. Als Quellen für Besatzmaßnahmen in bayerischen Seen werden in der Literatur unter anderem schwedische, österreichische (Fuschlsee und Grundlsee) und kroatische Herkünfte genannt (SCHILLINGER, 1896; KUSSMAUL, 1986; KLEIN, 1988).

2.3 Aquakultur

In den siebziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts erkannten Fischzüchter das Potential des Seesaiblings für die Aquakultur (JOBILING et al., 1993a; BOHL, 1999). In nordeuropäischen Ländern und Kanada wurde schon früh damit begonnen, aus Seesaiblingspopulationen (*Salvelinus alpinus*) geeignete Zuchtstämme aufzubauen. Einerseits sollten damit die bedrohten Wildbestände aufgestockt werden, andererseits wurden Seesaiblinge für den Speisefischmarkt produziert (JOHNSTON, 2002; JOBILING et al., 1993a). So steigerte Island als wichtigstes Erzeugerland seine jährliche Produktionsmenge im Jahr 2008 auf 3340 t (FEAP, 2008). Weitere Produzenten sind Kanada, Schweden und

Norwegen. Als Nebenfisch der Forellenteichwirtschaft ist der Saibling auch in der deutschen Aquakultur vertreten. Laut Jahresbericht der deutschen Binnenfischerei wurden im Jahr 2008 730 t Saiblinge in Deutschland produziert (BRÄMICK, 2009). Insbesondere aufgrund einer hohen Robustheit gegenüber den Forellenkrankheiten und einer ansteigenden Nachfrage des Marktes wächst die Produktion stetig an. Dennoch bezieht sich die wachsende wirtschaftliche Bedeutung in Deutschland hauptsächlich auf den nordamerikanischen Bachsaibling (*Salvelinus fontinalis*) oder auf den Elsässer Saibling, eine Kreuzung aus Bach- und Seesaibling. Obwohl vor allem in den Alpen- und Voralpenregionen die Produktion von Seesaiblingen lukrativ sein kann, verfügen nur wenige Betriebe über eigene Laichfischbestände (REITER, 2006). So beschäftigten sich im Jahre 2006 in Bayern sieben Betriebe mit der Vermehrung und Zucht von Seesaiblingen (SCHMIDT UND WEDEKIND, 2007). In der Regel gehen diese Bestände auf nordeuropäische oder kanadische Herkünfte zurück. Nachteilig an diesen nicht heimischen Herkünften ist die notwendige künstliche Anpassung des Bestandes an die in Mitteleuropa vorherrschenden saisonal variierenden Umweltbedingungen (MAYER, 2001). Das Aquakulturpotential der in den Alpen beheimateten Seesaiblinge (*Salvelinus cf. umbla*) ist dagegen nur wenig erforscht, und es existieren kaum kommerziell genutzte Zuchtstämme daraus.

Seesaiblinge können bei hohen Bestandsdichten gehalten werden, zu niedrige Besatzdichten können die Wachstumsleistung verringern (WALLACE et al., 1988a; JOBLING et al., 1993a; JØRGENSEN et al., 1993; Jobling et al., 1998). Sie gelten als robust und können die modernen Trockenmischfuttermittel effektiv verwerten (JOBLING et al., 1993a). Andererseits reagieren Seesaiblinge empfindlich auf organische Belastungen des Wassers, was die Anzahl an potentiellen Standorten in Deutschland reduziert. Während der Erbrütung sind Temperaturen von 4 - 6° C einzuhalten, um eine gute Eientwicklung und hohe Überlebensraten zu garantieren. Bei Temperaturen über 10° C steigt die Mortalität an (STEINER, 1984; JUNGWIRTH UND WINKLER, 1984). Während der Aufzucht werden die besten Leistungen bei Temperaturen von 12 bis 15 °C erzielt (JOBLING et al., 1993a). Temperaturen darüber führen vermehrt zu Ausfällen durch Bakteriosen und Pilzerkrankungen (GLEBE UND TURNER, 1993). Ein Vorteil gegenüber den anderen Forellenartigen ist die Fähigkeit des Seesaiblings noch bei sehr geringen Wassertemperaturen Nahrung aufnehmen und gut verwerten zu können (BRÄNNÄS UND LINNER, 2000). Als Aufzuchteinrichtungen werden in Nordeuropa in der Regel Netzgehege oder Kaltwasser-Kreislaufanlagen genutzt. In Mitteleuropa dagegen werden Seesaiblinge als Nebenfisch der Forellenteichwirtschaft hauptsächlich in Teich- oder Rinnenanlagen aufgezogen. Die Nährstoffansprüche des Seesaiblings entsprechen weitgehend den Ansprüchen anderer Salmoniden (JOBLING et al., 1993a). JOHNSTON ermittelte 2002 geeignete Futtermittelzusammensetzungen für die verschiedenen Wachstumsstadien. Für die Anfütterung und Aufzucht empfiehlt er Futtermittel mit 60 % bzw. 54 % Rohprotein und jeweils 20 % Rohfett. Bei der anschließenden Mast können Futtermittel mit 40 bis 50 % Rohprotein und einem Rohfettanteil von 15 bis 30 % gefüttert werden (TABACHEK, 1986). Das Fütterungsregime sollte den spezifischen Ansprüchen des Seesaiblings Rechnung getragen werden. Untersuchungen zeigen, dass die Fressaktivität im jahreszeitlichen Verlauf von exogenen und endogenen Einflüssen abhängt. Die beste Futteraufnahme findet während der Morgenstunden statt. Im jahreszeitlichen Verlauf unterliegen die Fische einem endogenen Rhythmus. Während in den Frühlings- und Sommermonaten die Fressaktivität ansteigt, sinkt sie in den Herbst- und Wintermonaten ab (SAETHER et al., 1996).

Herkunftsvergleiche sind eine in der Fischereiforschung häufig verwendete Methode zur Untersuchung der Eignung neuer Fischarten oder –populationen für die Aquakultur (z.B. BIESTER, 1986; MORKRAMER, 1983; MORKRAMER et al., 1985; WEDEKIND, 1991, 1993).

Dabei liegt zumeist die Frage nach dem Verhalten und der Leistungsfähigkeit der Fische unter den intensiven Haltungsbedingungen der Aquakultur zu Grunde, die sich wesentlich von den Verhältnissen im natürlichen Lebensraum der Fische unterscheiden: Die chemisch-physikalischen Wasserqualität unterliegt in der Fischhaltung kaum jahreszeitlichen Schwankungen, sondern wird im optimalen Bereich eingestellt. Auch hinsichtlich der Individuendichte liegen in der Aquakultur völlig andere Verhältnisse vor, woraus sich ein grundsätzlicher Unterschied zwischen natürlichen Populationen und den Verhältnissen in der Aquakultur ergibt (DUNHAM et al., 2001, BILIO, 2002). Bei der Aufzucht von Seesaiblingen, die direkt aus Wildpopulationen entnommen wurden, fehlen jegliche Erfahrungen zur Besatzdichte, Fütterung und zur Leitungsfähigkeit unter intensiven Aufzuchtbedingungen. Die vorliegende Untersuchung soll in diesem Zusammenhang zu einer Verbesserung des Wissens beitragen

2.4 Genetik

Natürliche deutsche Seesaiblings-Populationen differenzierten sich nach der letzten Eiszeit über einer Periode von etwa 10.000 Jahren. Dieser evolutionäre Differenzierungsprozess hat auf genomischer Ebene Signaturen hinterlassen, die mit Hilfe moderner molekulargenetischer Methoden abgebildet und analysiert werden können. In diesem Zusammenhang ist die postglazial entstandene Diversität der unterschiedlichen Herkünfte und Ökotypen von Seesaiblingen besonders interessant für die Aquakultur, denn viele der entstandenen Eigenschaften betreffen auch Merkmale mit Aquakulturrelevanz. Sowohl Aufzuchtversuche, als auch molekulargenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass es für den Grad der Differenzierung von Seesaiblingsformen eine genetische und damit auch selektierbare Grundlage gibt. Diese genetische Grundlage kann wie im isländischen Thingvallavatn genetisch fixiert sein oder ontogenetisch innerhalb einer Generation auf der Basis jeweils neu exprimiert werden. Besonders im letzteren Fall spielen auch Umweltfaktoren für die individuelle Differenzierung eine große Rolle (KLEMETSEN et al., 2010; JANHUNEN et al., 2009, 2010).

Die sich z. Zt. rasant entwickelnden genomischen Charakterisierungsmethoden haben auch für die genomische Kartierung einzelner Aquakultur-relevanter Faktoren beim Seesaibling Fortschritte gebracht. So wurde eine relativ grobe Karte des Genoms erstellt (WORAM et al., 2004) und es konnten genomische Regionen (QTLs) identifiziert werden, deren Variabilität mit der des Konditionsfaktors korrelieren (REID et al., 2005). Allerdings befindet sich die Genomik-Forschung an Seesaiblingen im Vergleich zu anderen Aquakultur-Arten, z.B. dem Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) oder Tilapia (*Oreochromis niloticus*) noch in einem rudimentären Stadium. Als weniger wichtige Art in der globalen Aquakultur liegen daher noch keine umfassenden genomischen Ressourcen, z.B. annotierte Kompletgenome vor.

Die Grundlage für jegliche Evaluierung einzelner natürlich evolvierter Saiblingsstämme und Formen ist die Identifizierung genetisch differenzierter Einheiten. Diese kann auch ohne umfangreiche genomische Ressourcen an Nicht-Modellorganismen realisiert werden, in dem Populationen mit einigen bis vielen genetischen Markersystemen miteinander verglichen und auf Ihre eigenständige Identität hin untersucht werden. In den europäischen Kulturlandschaften kommt hierbei dem Vergleich zwischen natürlicherweise vorhandenen und in der Kulturlandschaft veränderten Populationen besondere Bedeutung zu. Historisch gesammelte Schuppenproben liefern für Süßwasserfisch-Populationen historisch einordenbare DNA-Belege, die im Vergleich mit rezenten Populationen analysiert werden können (HANSEN et al. 2006, NIELSEN et al. 2008). Ebenso können allein aus dem Diffe-

renzierungsgrad rezenter Populationen Rückschlüsse über den Grad ihrer Veränderung über die Zeit anhand populationsgenetischer Parameter gezogen werden (GUM et al. 2006; KOSKINEN et al., 2002; TURGEON UND BERNATCHEZ, 2001; DUCHESNE UND TURGEON, 2009).

Genetische Marker, die zur Analyse der Populationsstruktur von Nicht-Modellorganismen ohne umfangreichen Genom-Datenbanken verwendet werden, sind heute vor allem so genannte Mikrosatelliten und AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms). Beide Markersysteme haben Vor- und Nachteile, zeichnen sich aber dadurch aus, dass viele verschiedene Einzelgenorte auf dem Kerngenom simultan analysiert werden können. Der Vorteil dieser Marker hat dazu geführt, dass die früher häufig verwendeten Isoenzym-Marker, aber auch die alleinigen Verwendung nur eines einzelnen genetischen DNA-Sequenzmarkers, z.B. die Sequenzierung einzelner mitochondrialer Sequenzabschnitte, für populationsgenetische Fragestellung kaum mehr Anwendung findet.

Mikrosatelliten sind einzelne hochvariable Genorte, die sich durch eine sehr einfache Tandemstruktur auszeichnen. Pro Genort sind zwei Allele bei diploiden Organismen zu erwarten, für den sie entweder homo- oder heterozygot sein können (TAUTZ 1989). Mikrosatelliten-Genorte müssen für jede Organismengruppe separat etabliert werden, können also nicht ad hoc angewendet werden, ohne Vorinformationen aus dem Genom zu haben. Sie werden mit Hilfe der PCR-Methode aus dem Genom heraus amplifiziert und sind auch für historische Proben anwendbar, weil die amplifizierten Genorte relativ kurz sind und deshalb auch für die stark degradierte DNA historischer Proben weitgehend anwendbar sind. Die Analyse der DNA von historischen Schuppenproben mit Mikrosatellitenmarkern erfordert jedoch besondere Sorgfalt sowohl bei der DNA-Extraktion (Kontaminationsgefahr durch moderne DNA) als auch bei der Genotypisierung, denn bei der Genotypisierung von DNA-Extrakten mit schlechter DNA-Qualität treten eher auf als bei hochmolekularen Proben (TABERLET et al., 1999; POMPANON et al., 2007).

Trotz der hohen Variabilität einzelner Mikrosatelliten bleibt die Zahl analysierbarer Genorte im genomischen Kontext vergleichsweise klein, weil nur relativ wenige bei Nicht-Modellorganismen etabliert sind. Auch für Seesaiblinge wurden schon di-allelische Mikrosatellitenmarker etabliert, die in einigen Studien an alpinen Seesaiblingen Anwendung fanden (s.u.). Beim der populationsgenetischen Analyse von Seesaiblingen ist die Verwendung di-allelischer Marker besonders kritisch, weil ein Teil des Salmoniden-Genoms nicht diploid, sondern tetraploid ist (ALLENDORF UND THOORGAARD, 1984; WORAM et al., 2004), und die gemischte Analyse von diploiden und tetraploiden Loci mit klassischen populationsgenetischen Methoden Schwierigkeiten bereitet.

AFLPs sind einzelne Genorte, die ohne Vorinformationen über das Genom an jedem Organismus typisierbar sind (VOS et al. 1995). Mit relativ geringem Aufwand können hunderte bis tausende weit über das Genom verstreute Genorte analysiert werden, wodurch ein sehr repräsentatives und deutlich differenzierteres Bild der populationsgenomischen Zusammensetzung und Unterscheidung von Populationen entsteht. Im Gegensatz zu Mikrosatelliten sind die einzelnen Genorte nicht hochvariabel, sondern es gibt nur zwei allelische Zustände: Genort bestimmter Fragmentgröße amplifiziert oder nicht amplifiziert. AFLP-Daten lassen sich deshalb nicht mit klassischen populationsgenetischen Methoden analysieren, weil zwischen Heterozygotie und Homozygotie nicht unterschieden werden kann. Direkte Vergleiche mit Mikrosatelliten-Analysen haben aber gezeigt, dass das Auflösungs-potential schon von wenigen hundert AFLP-Loci deutlich über dem von relativ wenigen Mikrosatelliten liegt (CAMPBELL et al. 2003; MEUDT UND CLARKE 2007). Wegen ihrer Auflösungskraft werden AFLPs heute besonders für die Analyse evolutionär junger

Modellsysteme, deren Populationsstruktur allein mit Mikrosatellitenmarkern nicht differenziert genug zu analysieren war, verwendet (z.B. ALBERTSON et al. 1999; GEIGER et al. 2010). Besonders attraktiv ist der quantitative Aspekt der durch AFLPS möglichen fein auflösenden genomischen Differenzierung nahe verwandter Populationen. Mit Hilfe von so genannten AFLP-Genomscans ist es möglich, den numerischen Anteil genomisch differenzierter Marker zu quantifizieren, der die Unterschiedlichkeit nahe verwandter Populationen ausmacht (LUIKART et al., 2003). Dieser Ansatz erlaubt erste Einblicke in die Komplexität der Merkmalsentwicklung auch aquakulturrelevanter genomischer Unterschiede. Ein gewichtiger Nachteil der AFLP-Methode liegt jedoch darin, dass sie nur für hochmolekulare, nicht degradierte DNA-Proben angewandt werden kann. Sie ist also nicht auf historische Schuppenproben-Extrakte anwendbar.

Deutsche Seesaiblingspopulationen wurden genetisch bisher wenig analysiert. HECHT et al. (1992) untersuchten mit der aus heutiger Sicht wenig trennscharfen Isoenzym-Methode 257 Seesaiblinge des Königssees, 229 des mit dem Königssee in Verbindung stehenden Obersees, sowie 81 Individuen des hochalpinen Grünsees, der seit dem Mittelalter mit Seesaiblingen aus dem Königssee besetzt worden war. Insgesamt waren nur 4 der untersuchten 18 Isoenzym-Genorte polymorph, wobei sich kleine aber signifikante Unterschiede zwischen Seenpopulationen, nicht aber zwischen den Ökotypen Wildfangsaibling, Schwarzreuter und Normalsaibling beschreiben ließen.

BRUNNER et al. (1998) untersuchte 15 alpine Seesaiblingspopulationen aus drei Einzugsgebieten (Rhone, Rhein und Donau), darunter auch fünf deutsche Populationen: Drei Bodensee-Populationen (nicht näher bezeichneter Herkunft), die Ammersee- und die Königssee-Population. Er charakterisierte einen Teil des nur mütterlicherseits vererbten mitochondrialen Genoms mit Hilfe der inzwischen überholten RFLP-Methode und typisierte zusätzlich alle 440 Seesaiblingsindividuen für 7 hochpolymorphe Mikrosatelliten-Genorte. Auf mitochondrialer Ebene erwiesen sich 439 Individuen als einheitlich, alle Tiere bis auf eines wiesen einen mitochondrialen Haplotypen auf, der nach BRUNNER et al. (2001) auch in Skandinavien und Grönland vorkommt. Auf Mikrosatelliten-Ebene dagegen war der Datensatz informativ. Wahrscheinlich unbeeinflusste Populationen ähnelten sich in Abhängigkeit vom jeweiligen Einzugsgebiet. Die beiden deutschen Populationen aus dem Donau-Einzugsgebiet (Ammersee, Königssee) gruppieren in einer Ähnlichkeitsanalyse miteinander und waren auch der einzigen österreichischen Donau-Einzugsgebietspopulation (Grundlsee) ähnlich. Die drei nicht näher definierten Bodensee-Populationen waren sich zueinander am ähnlichsten, wiesen aber dennoch signifikante Unterschiede zueinander auf. Populationen mit historisch belegtem Besatzeinfluss gruppieren hingegen nicht im autochthonen Einzugsgebiet.

ENGLBRECHT et al. (2002) lieferten die bisher umfangreichste Arbeit zur Populationsstruktur ostalpiner Seesaiblingspopulationen, hatten aber ebenfalls keinen Zugang zu historischen Schuppenproben. Neben einer Population aus dem Bodensee wurden Tiere des Königssee-Systems (Königssee, Obersee, Grünsee), und des Ammer- und des Starnbergersees untersucht. Dazu kamen österreichische Populationen aus dem Donau-Einzugsgebiet: Plan- und Heiterwangersee, dem Grundl- und Fuschlsee. Es wurden insgesamt 302-308 Individuen sowohl für einen Teilabschnitt des mitochondrialen D-Loops als auch für 6 Mikrosatelliten-Genorte analysiert. Die Stichprobengröße lag zwischen 20 und 84 Individuen pro Population, bis auf den Obersee (7 Individuen) dem Heiterwangersee (8 Individuen). Anders als bei BRUNNER et al. (1998) konnten auf mitochondrialer Ebene signifikante Unterschiede zwischen Populationen festgestellt werden, weil ein anderer Abschnitt der D-Loop analysiert wurde. Insgesamt wurden 17 verschiedene Haplotypen identifiziert,

wobei als einzige Population die des Ammersees ausschließlich vier nur in diesem See vorkommende („private“) Haplotypen trug. Auch das Königssee-System (Königssee/Obersee) war durch eine große Anzahl nur dort vorkommender Haplotypen gekennzeichnet, teilte allerdings den häufigsten Haplotypen mit vielen anderen Seen, darunter auch mit dem vom Königssee aus besetzten Grünsee. Alle anderen Populationen wiesen Haplotypen auf, die sie mit anderen Seen teilten, unterschieden sich aber dennoch signifikant in der Haplotypen-Zusammensetzung voneinander, sofern die Stichprobengröße ausreichend war. Auch auf Mikrosatelliten-Ebene war das Ergebnis differenziert. Fast alle Bestände unterschieden sich signifikant voneinander. Die jeweils meisten Tiere wurden in so genannten Selbstzuordnungstests jeweils ihrer eigenen Population zugeordnet, was auf eine hohe eigene Populationsidentität schließen lässt. Erwartungsgemäß war der erst neu aufgebaute Bestand aus dem Starnberger See im Gegensatz zu allen anderen untersuchten ostalpinen Seen nicht den geographisch am nächsten liegenden Populationen am ähnlichsten, sondern gruppierte mit den beiden österreichischen Seen; diese Tendenz hatte sich auch schon auf der Basis der mitochondrialen Daten angedeutet.

Bis dato konnten also weder Aquakultur-relevante Eigenschaften natürlicher deutscher Seesaiblings-Populationen untersucht werden, noch ist die natürlich gewachsene Populationsstruktur in der Gesamtschau ausreichend analysiert worden. Die bisherigen Teilergebnisse zeigen jedoch auf, dass zwischen den bisher untersuchten deutschen Populationen signifikante Unterschiede sowohl in aquakulturrelevanten Merkmalsausprägungen als auch auf genomischer Ebene bestehen. Historische Veränderungen einzelner Populationen sind durchaus wahrscheinlich, konnten aber wegen fehlender historischer DNA-Belege, unvollständigem Populations-Sampling und fehlender Auflösungskraft der damals verwendeten Methoden nicht verifiziert werden. Eine modellhafte Verknüpfung von genetischer Populationscharakterisierung und differenzierter Analyse der Aquakulturrelevanz im Freiland vorkommender Seesaiblingspopulationen fehlte bisher.

3 Berichtsteil I: Untersuchungen zur Aquakultur

Gregor Schmidt und Dr. Helmut Wedekind, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei (IFI)

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Projektskizze

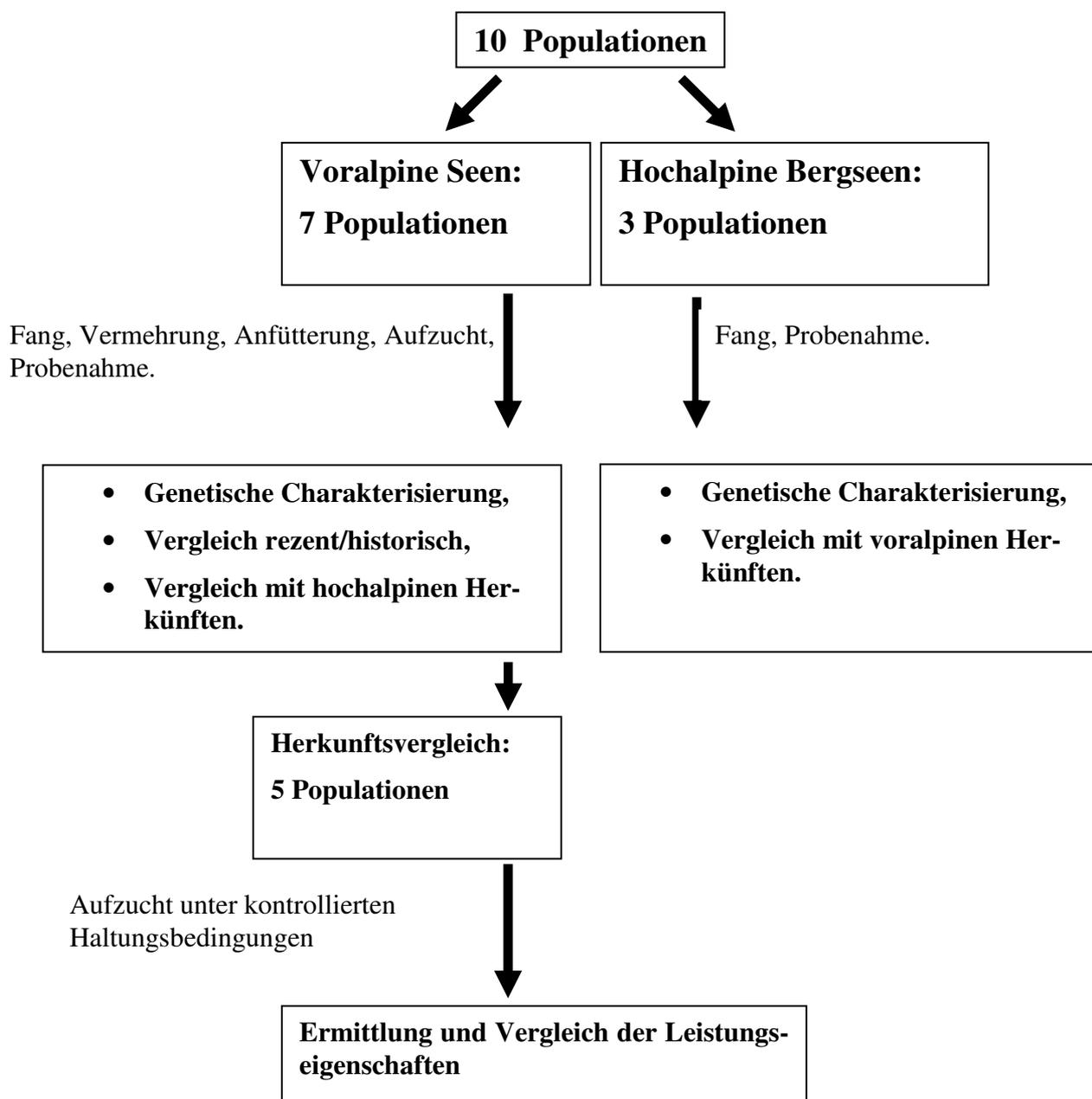


Abb. 2: Projektschema.

3.1.2 Projektdurchführung

Zu Projektbeginn wurden Seesaiblinge aus folgenden 10 Gewässern mit Stellnetzen gefangen:

Starnberger See, Walchensee, Ammersee, Bodensee, Königssee, Tegernsee, Hintersee, Soiernsee, Seealpsee, Grünsee.

Von jedem untersuchten Bestand wurden von 30 Fischen Gewebeproben gesammelt (Flossenschnitte), die anschließend vom Unterauftragnehmer genetisch charakterisiert wurden. Daneben wurde DNA aus Schuppenproben von historischen Fängen von Seesaiblingen aus den Probegewässern extrahiert und sequenziert. Die laichreifen Seesaiblinge aus sieben voralpinen Gewässern (Starnberger See, Walchensee, Ammersee, Bodensee, Hintersee, Tegernsee, Königssee) wurden abgestreift. Die befruchteten Eier wurden in die Brutanlage des Instituts für Fischerei verbracht und getrennt erbrütet. Nach dem Schlupf und der Dottersackphase wurden die Herkünfte separat angefüttert. Fünf dieser Seesaiblingspopulationen wurden anschließend zu einem Herkunftsvergleich herangezogen. Überprüft wurden die Leistungseigenschaften der Bestände unter Aquakulturbedingungen (Überlebensrate, Wachstum, Kondition und Fischgesundheit). Die genetischen Analysen umfassten vergleichende Untersuchungen sowohl zwischen den rezenten Populationen, als auch mit den historischen Populationen in den Seen. Zum Abschluss des Projektes wurden die erhobenen Daten statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse wurden in einem Bericht zusammengefasst und der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung übergeben.

Tab. 1: Zeitliche Abfolge der durchgeführten Projektschritte

Zeitraum	Tätigkeit	Institution
10/2008 – 06/2010	Genetische Untersuchungen an historischen und rezenten Populationen	Unterauftragnehmer
10/2008 – 12/2008	Beschaffung von Probematerial aus 7 Populationen (voralpine Seen)	IFI
11/2008 – 12/2008	Gewinnung von Eiern/Brut von 7 Populationen	IFI
07/2009 – 08/2009	Beschaffung von Probematerial aus 3 Populationen (hochalpine Bergseen)	IFI
01/2009 – 04/2010	Anfütterung, Untersuchung der Leistungseigenschaften von 5 ausgewählten Populationen (Herkunftsvergleich)	IFI
04/2010 – 07/2010	Statistische Auswertung, Berichtsabfassung, Veröffentlichung der Ergebnisse (wiss. Publikationen, Fachveranstaltungen)	IFI, ZSM

3.1.3 Auswahl der Gewässer

Für die Untersuchungen wurden Gewässer ausgewählt, die über einen reproduzierenden Bestand an Seesaiblingen verfügen und eine nachvollziehbare Besatzhistorie aufweisen. Darüber hinaus war die Verfügbarkeit an historischen Gewebeproben von Seesaiblingen aus den jeweiligen Seen ein entscheidendes Auswahlkriterium. Für den Vergleich unter Aquakulturbedingungen wurden sechs Herkünfte ausgesucht: Starnberger See, Ammersee,

Bodensee, Walchensee, Tegernsee, Königssee und Schliersee. Letzterer konnte allerdings im Rahmen dieser Untersuchungen nicht beprobt werden, da der See zur Laichzeit der Seesaiblinge im Jahr 2008 bereits zugefroren war. Anstelle des Schliersees wurde daher der Hintersee mit in das Projekt aufgenommen. Für die Beprobung der hochalpinen Bergseen wurde der Grünsee (Nationalpark Berchtesgaden), der Soiernsee (Wettersteingebirge) und der Seealpsee (Allgäuer Alpen) ausgewählt. Nach eingehender Recherche und nach Rücksprache mit Fischereiberechtigten und Wissenschaftlern wurde die Erkenntnis gewonnen, dass aufgrund der speziellen Anforderungen eines jeden Gewässers an den Fang von Laichfischen das Projekt nur unter Einbeziehung der orts- bzw. seekundigen Fischer, Fischereigenossenschaften oder Angelvereine erfolgreich durchgeführt werden kann. Diese sind aufgrund ihrer langjährigen Tätigkeit am Gewässer in der Lage, Laichplätze und Fangzeiten zu benennen. Aus diesem Grund wurden Vor-Ort Gespräche mit den Fischereiberechtigten durchgeführt und ein gemeinsames Vorgehen beschlossen.

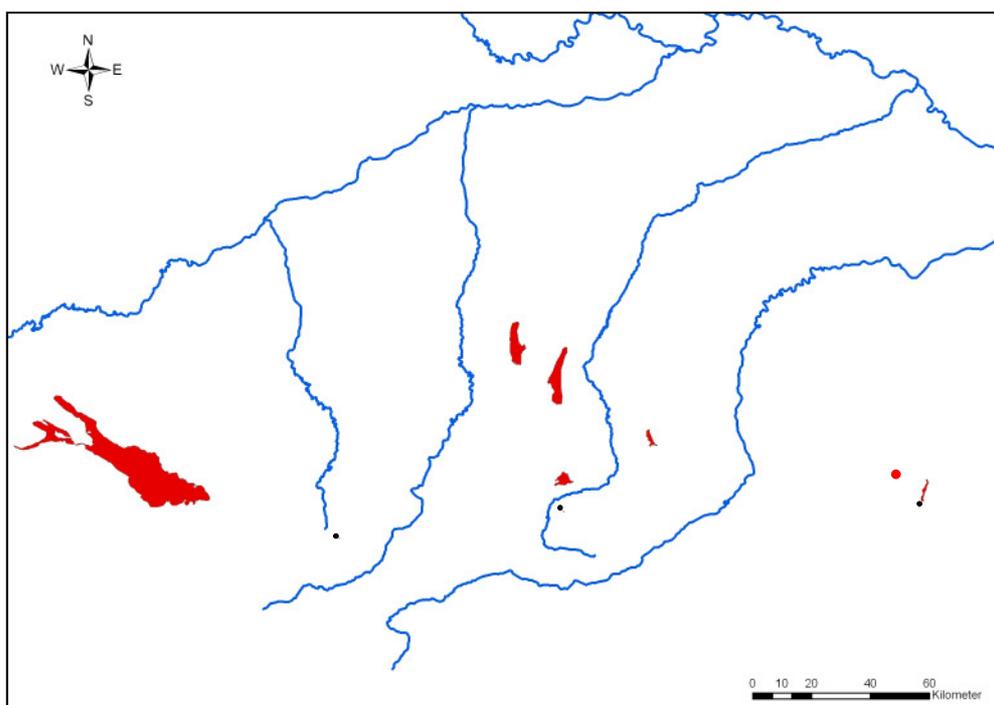


Abb. 3: Ausgewählte Gewässer (voralpine Seen = rot; alpine Bergseen = schwarz).

Tab. 2: Vor-Ort Termine mit den Fischereiberechtigten.

Gewässer	Vor-Ort Termin
Königssee	16.10.2008
Starnberger See	28.10.2008
Ammersee	21.10.2008
Hintersee	28.10.2008
Walchensee	17.10.2008
Tegernsee	23.10.2008
Bodensee	27.10.2008

3.1.4 Befischungstermine

Die Befischungen fanden in der Laichsaison der Seesaiblinge, in den Monaten Oktober, November und Dezember statt. Die Netze wurden am Abend vor den Befischungen an den Laichplätzen der Seesaiblinge ausgelegt. Dabei konnte in den meisten Fällen auf Ausrüstung (Netze, Boote) der Fischereiberechtigten zurückgegriffen werden. Am nächsten Morgen wurden die Netze gehoben. Die laichreifen Seesaiblinge wurden an Land gebracht und dort abgestreift. Da die Anzahl der laichreifen Seesaiblinge und auch die Eimenge stark variierte, waren zumeist mehrere Befischungstermine erforderlich. Die Befischungen der hochalpinen Seen (Soiernsee, Seealpsee, Grünsee) wurden in den Sommermonaten 2009 durchgeführt. Letztgenannte Seen wurden jeweils nur einmal befischt.

Tab. 3: Befischungstermine.

Gewässer	Befischungstermine
Königssee	29.10.2008; 31.10.2008
Starnberger See	10.11.2008; 14.11. 2008
Ammersee	04.11.2008; 26.11.2008
Hintersee	30.12.2008
Walchensee	06.11.2008; 11.11.2008; 28.11.2008
Tegernsee	12.11.2008; 27.11.2008
Bodensee	10.12.2008
Soiernsee	21./22.07.2009
Grünsee	10./11.08.2009
Seealpsee	31.08.2009

3.1.5 Befischung und Eigewinnung

Die Befischungen erfolgten im Fall der voralpinen Seen mit Unterstützung der Fischereiberechtigten. Die Netze wurden am Abend zuvor an den Laichplätzen der Seesaiblinge in einer Wassertiefe von 3 bis 80 m ausgelegt. Die Netze wurden am nächsten Morgen gehoben. Nicht von allen adulten Tieren konnten die Geschlechtsprodukte gewonnen werden, da einzelne Tiere die Laichreife noch nicht erreicht hatten. Die Rogener wurden über einem Sieb abgestreift und die Eier gesammelt. Anschließend wurde das Sperma der Milchner hinzugegeben (Trockene Methode). Nach zwei Minuten wurde Seewasser hinzugefügt und die Quellung der Eier abgewartet. Nach einem anschließenden Spülvorgang und einer 15-minütigen Desinfektion (Actomar K 30) wurden die befruchteten Eier im Brutschrank aufgelegt.

3.1.6 Erbrütung

Die Erbrütung der Eier erfolgte bis zum Augenpunktstadium im Brutschrank. Dabei wurde das Wasser im Kreislauf geführt (15 % Wasserwechsel/d). Um die erforderliche konstante Wassertemperatur von 5 °C zu sichern, wurde ein Kühlaggregat in den Kreislauf integriert. Nach Erreichen des Augenpunktstadiums wurde die Eier bis zum Schlupf in Unterstromkästen aufgelegt. Die Wasserführung der Erbrütungsrinne erfolgte im Kreislauf über ein angeschlossenes Kühlaggregat, sodass weiterhin eine konstante Wassertempera-

tur von 5 °C gewährleistet war. Bis zum Schlupf der ersten Gruppen betrug die Rezirkulationsrate 90 %, danach wurde sie wegen der ansteigenden Wasserbelastung auf 80 % reduziert. Die täglichen Routinearbeiten bestanden aus dem Entfernen abgestorbener Eier und der Bestimmung der Wasserqualität. Die Rinnen wurden 3 Mal pro Woche gereinigt.

3.1.7 Anfütterung

Die Anfütterung erfolgte in Unterstromkästen mit dem Aufschwimmen der Brut und nach Verlust von 75 % des Dottersackvolumens. Als Ersnahrung kam ein Trockenmischfuttermittel der Firma Skretting A.S. (Perla Larva 6.0) zum Einsatz. Daneben wurden die Larven mit einer tiefgefrorenen Naturnahrung (Bosmiden, Cyclops) der Firma FiMö Aquaristik GmbH, Bünde zugefüttert. Alle Chargen wurden 4 bis 6 Mal täglich von Hand *ad libitum* gefüttert und die Verluste erfasst. Nach zehn Tagen wurde die Wassertemperatur langsam auf 10 °C eingestellt. Dafür wurde alle drei Tage die Temperatur um ein Grad Celsius erhöht. Anschließend wurden die Rinnen bei 10 °C mit Quellwasser im Durchfluss betrieben. Die tägliche Beleuchtungsdauer betrug 12 Stunden (08:00 bis 18:00 Uhr). Die Rinnen wurden täglich zweimal gereinigt. Der gesamte Zeitraum der Anfütterung erstreckte sich über acht Wochen.

3.1.8 Aufzucht

Nach der Anfütterung wurden die verschiedenen Herkünfte separat in Langstromrinnen aufgezogen. Die tägliche Beleuchtungsdauer betrug 13 Stunden (07:00 bis 18:00 Uhr). Die Seesaiblinge erhielten als Anschlussnahrung Trockenmischfuttermittel der Firma Skretting A.S. (Perla Larva 5.0 und Perla Larva 4.0). Die Fütterung erfolgte anfänglich dreimal täglich von Hand auf Sättigung, später rationiert mittels Bandfutterautomaten. Um für den Herkunftsvergleich einheitliche Chargen zu erhalten und somit die geringen Altersunterschiede auszugleichen, wurden die Herkünfte sortiert und anschließend über die Anpassung der Futtermenge langsam auf eine einheitliche Größe von 4 bis 5 g Stückmasse gebracht. Verluste wurden täglich kontrolliert und erfasst. Die Rinnen wurden bei einer Wassertemperatur von 10 °C mit Quellwasser im Durchfluss betrieben. Die Reinigung der Rinnen erfolgte vor Beginn und nach Ende der Fütterungsperioden (täglich 12 Stunden).

3.1.9 Herkunftsvergleich

3.1.9.1 Versuchsanordnung

Der Herkunftsvergleich begann am 21.09.2009 und wurde am 24.04.2010 beendet. Für den Vergleich wurden von den insgesamt sieben untersuchten Populationen aus voralpinen Seen fünf geeignete Bestände ausgewählt. Wie in der nachfolgenden Übersicht dargestellt (Abb. 4) wurden die Herkünfte Tegernsee, Walchensee, Hintersee, Bodensee und Starnberger See ausgewählt. Alle Gruppen wurden unter gleichen Haltungsbedingungen in Dreifachwiederholungen aufgezogen. Die Haltung erfolgte unter praxisüblichen Bedingungen in Rundbecken. Die Fische erhielten gleiche Futterrationen, die der täglichen Wachstumsleistung der Fische angepasst wurden. Durch regelmäßige Kontrollwägungen wurden das Wachstum und die Futtermittelverwertung der einzelnen Fütterungsgruppen erfasst. Die wichtigsten physikalischen und chemischen Wasserparameter wurden regelmäßig gemessen. Bei Versuchsende wurden alle Tiere einzeln gewogen und vermessen, zusätzlich wurde von einer repräsentativen Menge der Gesundheitszustand und die Kondition ermittelt. Der Zustand der inneren Organe wurde überprüft und einzeln beurteilt.

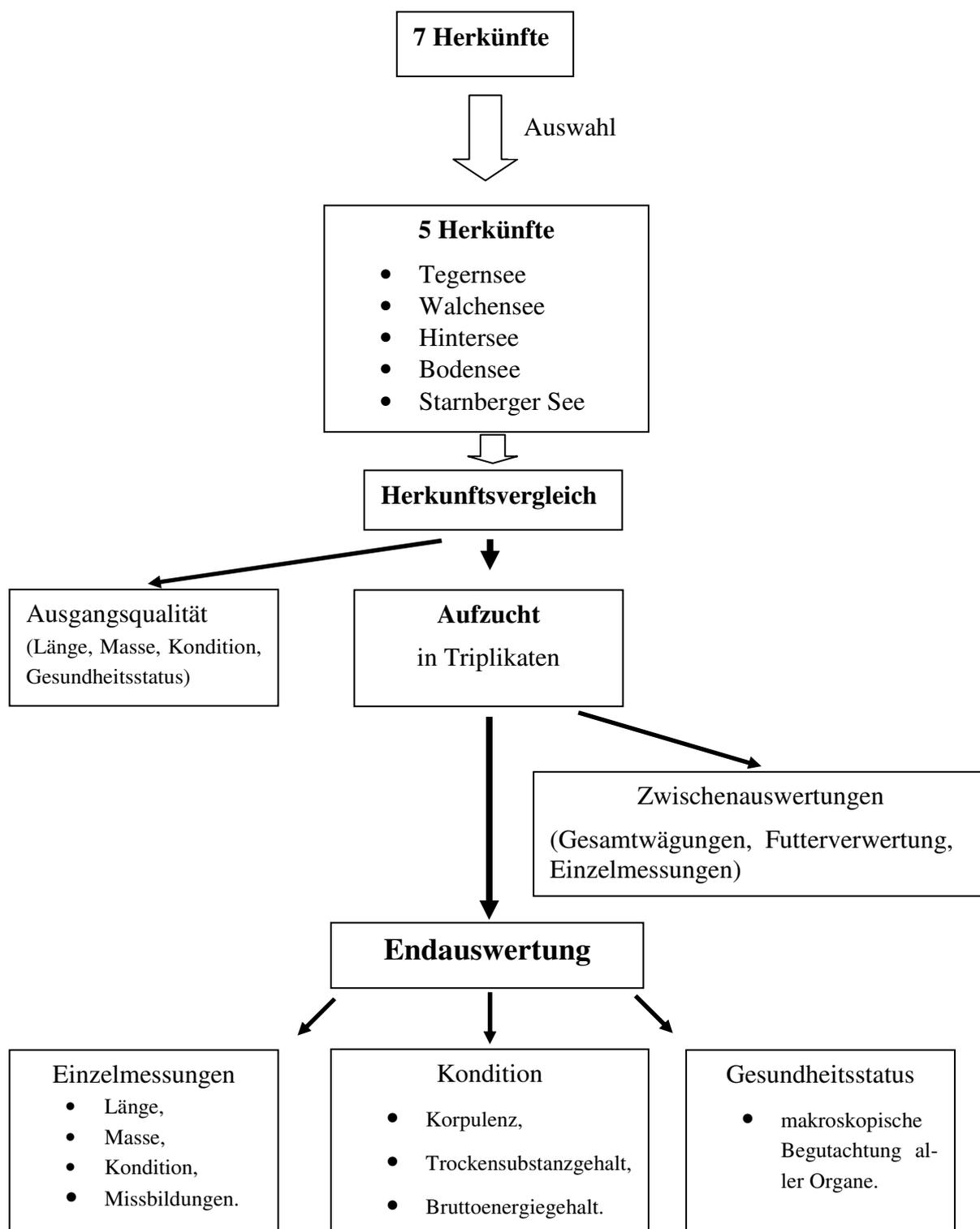


Abb. 4: Herkunftsvergleich –Versuchsschema.

3.1.9.2 Versuchsanlage

Der Herkunftsvergleich wurde in der Beckenanlage des Instituts für Fischerei durchgeführt. Zum Einsatz kamen Rundbecken mit einem maximalen Volumen von 0,5 m³. Lichtintensität, Beleuchtungsrhythmus, Wasseraustauschrate und Strömung war in allen Becken identisch. Insgesamt waren 15 Rundbecken in den Versuch eingebunden, die im Durchlauf betrieben wurden. Der Zulauf bestand aus Quellwasser, welches zuvor konditioniert wurde (Sauerstoffanreicherung, CO₂ und N₂ -Austrag). Die tägliche Beleuchtungsdauer betrug 12 Stunden (07:00 -19:00 Uhr).

3.1.9.3 Haltungsumwelt

Der pH – Wert, die Leitfähigkeit und der Sauerstoffgehalt (mg / l) wurden alle drei Tage bestimmt (WTW pH Meter 325, WTW Leitfähigkeitsmessgerät LF 196 und WTW Sauerstoffmessgerät 196 Oxi 315 i). Die Konzentrationen der Stickstoffverbindungen Nitrat, Nitrit und Ammonium wurden regelmäßig mit kolorimetrischen Tests der Firma Merck KG aA (Darmstadt) überprüft. Die Messung der Fließgeschwindigkeit in den Rundbecken erfolgte wöchentlich einem Flügelrad Strömungssensor der Firma Höntzsch GmbH (Waiblingen). Die Besatzdichte betrug zu Versuchsbeginn im Mittel 6,5 kg/m³.

3.1.9.4 Fütterung

Die Partikelgrößen der Futtermittel wurden den Wachstum der Fische angepasst. Zu Beginn des Herkunftsvergleiches wurde ein Trockenmischfuttermittel mit einem Diameter von 0,8 mm gefüttert. Nach 37 Versuchstagen wurde eine Partikelgröße von 1,1 mm erreicht. Ab dem 128 Tag wurde ein Futtermittel mit 1,5 mm gefüttert. In den letzten 40 Versuchstagen kam ein 2 mm Pellet zum Einsatz. Während die Futtermittel anfänglich über einen hohen Rohproteingehalt verfügten, konnte mit dem Voranschreiten der Aufzuchtphase ein Futtermittel gewählt werden, das über geringere Rohproteingehalte, aber höhere Rohfettgehalte verfügte.

Tab. 4: Verabreichte Futtermittel im Versuchsverlauf und deren Zusammensetzung.

Zeitraum (Tage)	Bezeichnung	Partikelgröße (mm)	Rohprotein (%)	Rohfett (%)	Asche (%)	NfE (%)
1 bis 37	Inicio Plus	0,8	56	18	11,5	14,5
37 bis 128	Inicio Plus	1,1	56	18	11,5	14,5
128 bis 175	Ecostart 17	1,5	47	20	9,5	23,5
175 bis 215	Aquastart 2	2	42	22	6,5	29,5

3.1.9.5 Leistungsparameter

3.1.9.5.1 Wachstum

Die Überprüfung der Wachstumsleistung erfolgte innerhalb des Herkunftsvergleichs in turnusmäßigen Abständen (Tab. 5). Die Fische wurden beckenweise gewogen. Darüber hinaus wurde zu Beginn der Untersuchung und an einem Termin während des Vergleichs

das Individualwachstum einer repräsentativen Stichprobe ermittelt. Zu Versuchsende wurden alle Fische vermessen und gewogen.

Tab. 5: Zeitpunkte der Gesamtwägungen.

Zeitpunkt	Versuchstag	Wägungen
21.09.2009	0	Einwaage
26.10.2009	36	1. Zwischenwägung
11.12.2009	82	2. Zwischenwägung
27.01.2010	129	3. Zwischenwägung
17.03.2010	178	4. Zwischenwägung
23.04.2010	215	Endauswertung

Die Berechnung der spezifischen Wachstumsrate (specific growth rate, SGR) erfolgte nach LIEDER (1978):

$$\text{SGR (\%)} = (\ln W_t - \ln W_0) / t * 100$$

SGR: Spezifische Wachstumsrate (%)

W_t : Lebendgewicht zum Zeitpunkt t (g)

W_0 : Lebendgewicht zum Zeitpunkt 0 (g)

t: Zeitraum (d)

Die Berechnung des Futterquotienten (FQ) erfolgte nach STEFFENS (1985):

$$\text{FQ} = \text{Futter (g)} / \text{Zuwachs (g)}$$

3.1.9.5.2 Kondition

Zur Beurteilung der Kondition wurde der Korpulenzfaktor aller Fische bestimmt:

$$k = p * 100 / L^3$$

k Korpulenzfaktor

p Körpermasse (in g)

L Totallänge (in cm)

Der Hepatosomatische Index (HSI) wurde aus den ermittelten Einzelgewichten von Leber und Körpermasse von jeweils 45 Tieren jeder Herkunft berechnet. Vor der Ermittlung der Lebermasse wurde die Gallenflüssigkeit entfernt.

$$\text{HSI} = 100 * H_p / p$$

HSI Hepatosomatischer Index

Hp Lebermasse (in g)

P Körpermasse (in g)

Der Trockensubstanzgehalt der Fische wurde nach WEDEKIND (2002) mit Einzelhomogenaten von jeweils 45 Fischen je Gruppe bestimmt. Die Ganzkörperhomogenate wurden in Analyseschalen eingewogen und 24 Stunden im Trockenschrank bei 104°C getrocknet. Nach dem Auskühlen der Proben im Excikator wurde der Trockensubstanzanteil zurückgewogen. Der Wassergehalt wurde bestimmt und der prozentuale Anteil der Trockensubstanz errechnet.

Der Bruttoenergiegehalt der Fische wurde nach SCHRECKENBACH et al. (2001) berechnet:

$$BE \text{ (MJ)} = 0,0253 * TS \text{ (\%)}^{1,6783}$$

BE: Bruttoenergie (MJ)

TS: Trockensubstanz (%)

3.1.9.5.3 Fischgesundheit

Zu Beginn des Versuches wurden zehn Seesaiblinge je Herkunft auf ihren Gesundheitszustand und eventuell bereits bestehende alimentäre Veränderungen der inneren Organe untersucht. Die Fische verfügten über einen guten Gesundheitsstatus und zeigten keine Anzeichen von Organveränderungen. Zur Beendigung Herkunftsvergleichs wurden je Herkunft 45 Fische mit einem gezielten Schlag auf den Kopf betäubt und mit einem Genickschnitt getötet. Länge und Masse, Korpulenz, Schlachtkörpergewicht und Innereienanteil sowie Gonadenanteil wurden ermittelt. Die Bauchhöhlen wurden geöffnet und die einzelnen Organe begutachtet. Sämtliche Organe wurden der Leibeshöhle entnommen und gesondert makroskopisch begutachtet. Der Grad der alimentären Veränderungen wurde wie folgt beurteilt:

Beurteilung der Leber:

- 0 ohne Befund
- 1 leichte Verfettung (Hellfärbung)
- 2 mittlere Verfettung
- 3 starke Leberverfettung (Marmorierung)

Beurteilung des Herz:

- 0 ohne Befund
- 1 leichte Herzmuskelnekrose
- 2 mittlere Herzmuskelnekrosen
- 3 starke Herzmuskelnekrosen

Beurteilung der Milz:

- 0 ohne Befund

- 1 leichte Schwellung
- 2 mittelstarke Schwellungen
- 3 Nekrosen, Hyperplasie

Beurteilung der Niere:

- 0 ohne Befund
- 1 vereinzelte Einschlüsse
- 2 leichte Gewebeveränderungen
- 3 schwere Gewebeveränderungen, Nekrosen

Beurteilung des Darms:

- 0 ohne Befund
- 1 leichte Entzündung des Enddarms
- 2 mittlere Entzündung
- 3 Entzündungen im gesamten Darmbereich

Beurteilung der Kiemen:

- 0 ohne Befund
- 1 leichte Kiemenschwellung
- 2 Kiemenschwellung
- 3 Kiemenschwellung und nekrotisches Gewebe

3.1.9.6 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit der Software SPSS 9.0 der Firma Microsoft. Mit nicht-parametrischen Tests wie dem Kruskal Wallis Test wurde überprüft, ob die unabhängigen Stichproben aus einer Grundgesamtheit stammen. Die Mittelwertvergleiche wurden mit einfaktorierter Varianzanalyse (ANOVA) mit den daran angeschlossenen post-hoc Mehrfachvergleichen mittels Tukey-Test beziehungsweise bei Annahme von keiner Varianzgleichheit mit Dunnett - T3 durchgeführt. Die Herkünfte wurden unter Annahme der Gleichheit der Bedingungen in allen Becken zusammengefasst, und die verschiedenen Herkünfte wurden untereinander mit dem Chi-Quadrat-Test auf Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung hin untersucht.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Laichfischfang

Mit einer Ausnahme konnten aus allen Seen die erforderlichen Mengen an Seesaiblingen für die Reproduktion und die genetische Analyse bei den Netzbefischungen gefangen werden. Allein bei der Befischung des Seealpsees konnte die erforderliche Anzahl nicht erbracht werden. Tabelle 6 gibt eine geschlechtsspezifische Übersicht über die Anzahl der gefangenen Tiere aus den einzelnen Gewässern. Die Anzahl der Elterntiere der Herkunft Hintersee ist unbekannt. Für die genetischen Untersuchungen musste daher auf juvenile Fische zurückgegriffen werden.

Tab. 6: Anzahl gefangener Laichfische nach Geschlecht (gesamt).

Gewässer	Milchner (n)	Rogener (n)
Königssee	70	70
Starnberger See	20	17
Ammersee	50	37
Hintersee	?	?
Walchensee	20	14
Tegernsee	10	13
Bodensee	40	28
Soiernsee	37	28
Grünsee	24	32
Seealpsee	1	0

3.2.2 Eimengen und Größen

Die Eizahlen der Rogener variierten sowohl innerhalb als auch zwischen den Beständen. Besonders auffällig waren die unterschiedlichen Eizahlen zwischen einzelnen Beständen. Die besonders kleinwüchsigen Seesaiblinge des Königssees verfügten nur über eine geringe Anzahl Eier, etwa 30 bis maximal 100 Stück. Daher war bei dieser Herkunft eine große Anzahl an Rogenern erforderlich, um die benötigte Eimenge zu erlangen. Tabelle 7 gibt eine Übersicht der Anzahl gewonnener Eier.

Tab. 7: Anzahl abgestreifter Eier (gesamt).

Gewässer	Eizahl (n)
Königssee	6.000
Starnberger See	10.000
Ammersee	12.180
Hintersee	12.679
Walchensee	5.195
Tegernsee	4.497
Bodensee	12.048

Die Vermessung der Eier ergab ähnliche Eidurchmesser der verschiedenen Herkünfte. Allein die Eier der Ammersee-Seesaiblinge unterschieden sich sowohl in der Färbung als auch in der Größe (Tab.8). Gegenüber den anderen Herkünften verfügte diese Herkunft mit einem mittleren Durchmesser von $4,12 \pm 0,32$ mm über signifikant kleinere Eidurchmesser. Tendenziell verfügten dagegen die kleinwüchsigen Seesaiblinge des Königssees mit einem durchschnittlichen Diameter von $5,82 \pm 0,14$ mm über die größten Eier. Innerhalb der Chargen variierten die Eidurchmesser nur gering.

Tab. 8: Eidurchmesser der Herkünfte (n= 20, $p \leq 0,05$).

Gewässer	Eidurchmesser (mm)
Königssee	$5,80 \pm 0,12^a$
Starnberger See	$5,28 \pm 0,06^b$
Ammersee	$4,12 \pm 0,32^c$
Hintersee	$5,20 \pm 0,12^b$
Walchensee	$5,18 \pm 0,19^b$
Tegernsee	$5,72 \pm 0,16^a$
Bodensee	$5,42 \pm 0,18^d$

3.2.3 Erbrütung

Tab. 9: Termine während der Erbrütung der unterschiedlichen Herkünfte und Chargen.

Herkunft /Charge	Befruchtung	Augenpunktstadium	Schlupfbeginn	Schlupfende
Königssee 1	29.10.2008	05.12.2008	02.01.2009	26.01.2009
Königssee 2	31.10.2008	05.12.2008	10.01.2009	26.01.2009
Ammersee 1	04.11.2008	10.12.2008	12.01.2009	05.02.2009
Walchensee 1	06.11.2008	12.12.2008	14.01.2009	01.02.2009
Starnberger See	10.11.2008	16.12.2008	20.01.2009	05.02.2009
Walchensee 2	11.11.2008	18.12.2008	23.01.2009	15.02.2009
Tegernsee 1	12.11.2008	21.12.2008	23.01.2009	15.02.2009
Ammersee 2	26.11.2008	08.01.2009	15.02.2009	17.02.2009
Tegernsee 2	27.11.2008	08.01.2009	10.02.2009	16.02.2009
Hintersee	10.12.2008	30.12.2008	20.01.2009	05.02.2009
Bodensee	20.12.2008	02.01.2009	17.02.2009	17.02.2009

Den natürlichen Gegebenheiten der jeweiligen Herkunftsgewässer angepasst, variierten die Laichtermine der Seesaiblinge. Der gesamte Zeitraum der Laichgewinnung erstreckte sich im Jahre 2008 über zwei Monate von Oktober bis Dezember (Tab. 9.). Bei einer mittleren Wassertemperatur von 5 °C erreichten die Chargen nach 33 bis 43 Tagen beziehungsweise 227,5 bis 279,5 Tagesgraden das Augenpunktstadium (Tab. 10). Je nach Charge begann nach weiteren 33 bis 46 Tagen der Schlupf der Larven. Insgesamt ergab sich damit eine Erbrütungsperiode von 69 bis 82 Tagen, beziehungsweise 415,5 bis 487 Tagesgraden. Der Schlupfdauer einer Charge variierte zwischen und innerhalb der Herkünfte stark. In vielen Fällen betrug der Zeitraum zwei bis drei Wochen, in einzelnen Fällen schlüpfte die ganze Charge innerhalb von 24 und 48 Stunden.

Tab. 10: Dauer und Tagesgrade der Erbrütung der unterschiedlichen Herkünfte und Chargen.

Herkunft /Charge	Augenpunktstadium (d)	Augenpunktstadium (TG °C)	Schlupfbeginn (d)	Schlupfbeginn (TG °C)	Gesamtdauer (d)	Tagesgrade bis Schlupfbeginn (°C)
Königssee 1	37	240,5	37	203,5	74	444
Königssee 2	35	227,5	45	247,5	80	475
Ammersee 1	36	234	33	181,5	69	415,5
Walchensee 1	36	234	33	181,5	69	415,5
Starnberger See	33	234	35	192,5	71	426,5
Walchensee 2	37	240,5	36	198	73	438,5
Tegernsee 1	38	247	33	181,5	71	428,5
Ammersee 2	43	279,5	38	209	81	488,5
Tegernsee 2	42	273	33	181,5	75	454,5
Hintersee	37	240,5	30	165	67	405,5
Bodensee	36	234	46	253	82	487

Während es bei der Erbrütung der Herkunft Bodensee und Hintersee nur zu sehr geringen Verlusten kam (3 und 6 %), konnten gravierende Verlustgeschehen bei den Herkünften Königssee (64 %), Starnberger See (49 %), Ammersee (42 %), Walchensee (32 %) und Tegernsee (57 %) beobachtet werden (Tab. 11). Die Verluste bei letztgenannten Chargen waren die Folge eines einmaligen Havariegeschehens vor dem Augenpunktstadium: Durch den Ausfall des Kühlaggregats erwärmte sich das Wasser über Nacht auf 12 °C.

Tab. 11: Anzahl der Eiverluste bis zum Beginn des Schlupfes (gesamt).

Gewässer	Eiverluste (n)	Eiverluste (%)
Königssee	3.847	64
Starnberger See	4.870	49
Ammersee	5.110	42
Hintersee	816	6
Walchensee	1.642	32
Tegernsee	2.565	57
Bodensee	400	3

Die in Tabelle 12 dargestellten Larvenverluste vor der Anfütterung spiegeln hauptsächlich den Anteil missgebildeter und daher nicht lebensfähiger Larven wider. Insbesondere bei der Herkunft Ammersee und Königssee wurde ein hoher Anteil an Larven mit einer Rückgratverkrümmung festgestellt. Dagegen waren Verluste während des Schlupfes bei allen Chargen nur in Einzelfällen zu beobachten.

Tab. 12: Anzahl der Larvenverluste vom Schlupfende bis zur Anfütterung (gesamt) und prozentualer Anteil an der verbliebenden Gesamtzahl.

Gewässer	Larvenverluste (n)	Larvenverluste (%)
Königssee	590	27
Starnberger See	441	9
Ammersee	530	7
Hintersee	413	3
Walchensee	223	6
Tegernsee	161	8
Bodensee	21	0

3.2.4 Anfütterung

Während der Anfütterung kam es zu einem weiteren schweren Verlustgeschehen, dass bei allen Herkünften beobachtet werden konnte. Die Fische reagierten zu Beginn der Anfütterung nicht auf die angebotenen Futtermittel. Auch die Einbeziehung von feinsten Staubfuttermitteln konnte die Futterakzeptanz nicht verbessert werden. Erst mit der Zufütterung von gefrorenem Plankton gelang es, die Verluste zu reduzieren. Die Zufütterung musste über 30 Tage erfolgen, erst dann akzeptierten weite Teile der Herkünfte die angebotenen Trockenmischfuttermittel.

Tab. 13: Anzahl der Larvenverluste während der Anfütterung (gesamt) und prozentualer Anteil an der verbliebenden Gesamtzahl.

Gewässer	Larvenverluste (n)	Larvenverluste (%)
Königssee	359	23
Starnberger See	1.371	29
Ammersee	2.623	40
Hintersee	3.248	28
Walchensee	1.956	59
Tegernsee	924	52
Bodensee	2.637	23

Die hohe Verlustrate der Herkunft Königssee und die geringe Wachstumsleistung der Herkunft Ammersee schlossen die weitere Verwendung im Herkunftsvergleich aus. Für den Herkunftsvergleich unter identischen Haltungsbedingungen wurden daher die Herkünfte Tegernsee, Walchensee, Hintersee, Bodensee und Starnberger See herangezogen.

3.2.5 Herkunftsvergleich

3.2.5.1 Ausgangsqualität

Tab. 14: Mittlere Ausgangsparameter der Herkünfte ($x \pm SD$; alle Gruppen $n=20$, $p \leq 0,05$).

	Tegernsee	Walchensee	Hintersee	Bodensee	Starnberger See
Masse (g)	5,58 \pm 1,39 ^a	5,28 \pm 1,14 ^a	4,55 \pm 0,72 ^a	4,99 \pm 1,06 ^a	5,32 \pm 1,33 ^a
Länge (cm)	9,05 \pm 0,64 ^a	8,94 \pm 0,63 ^a	8,45 \pm 0,43 ^a	8,60 \pm 0,57 ^a	8,87 \pm 0,69 ^a
k-Faktor	0,74 \pm 0,04 ^a	0,73 \pm 0,04 ^a	0,75 \pm 0,08 ^a	0,77 \pm 0,04 ^a	0,75 \pm 0,07 ^a
TS (%)	24,46 \pm 1,75 ^a	23,09 \pm 1,78 ^a	23,40 \pm 0,94 ^a	25,42 \pm 1,78 ^a	24,10 \pm 1,02 ^a
BE (MJ/kg)	5,43 \pm 0,64 ^a	4,92 \pm 0,61 ^a	5,03 \pm 0,34 ^a	5,78 \pm 0,57 ^a	5,28 \pm 0,38 ^a

Die zu Beginn der Untersuchung durchgeführte Ermittlung der Ausgangsqualität der fünf Herkünfte ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tab. 14). Dies galt sowohl für die Masse und Länge aller Fische, als auch die Korpulenz und die Kondition. Tendenziell verfügte die Herkunft Bodensee über die höchsten Energiegehalte (5,78 \pm 0,57 MJ/kg), die geringsten wurden bei der Herkunft Walchensee ermittelt (4,92 \pm 0,61 MJ/kg).

3.2.5.2 Wasserparameter

Die in den Becken ermittelten Wasserwerte variierten nur leicht. Sie bewegten sich während des gesamten Versuchszeitraums in einem fischphysiologisch optimalen Bereich

(pH-Wert 7,47-7,5; O₂ 9,07-9,44 mg/l; Strömung 0,1-0,13 m/s; Zulauf 0,19-0,26 l/s). Die Messungen der Stickstoffverbindungen gaben keinen Hinweis auf eine organische Belastung des Zulaufwassers oder eine Anreicherung in den Becken.

3.2.5.3 Leistungseigenschaften

3.2.5.3.1 Wachstum

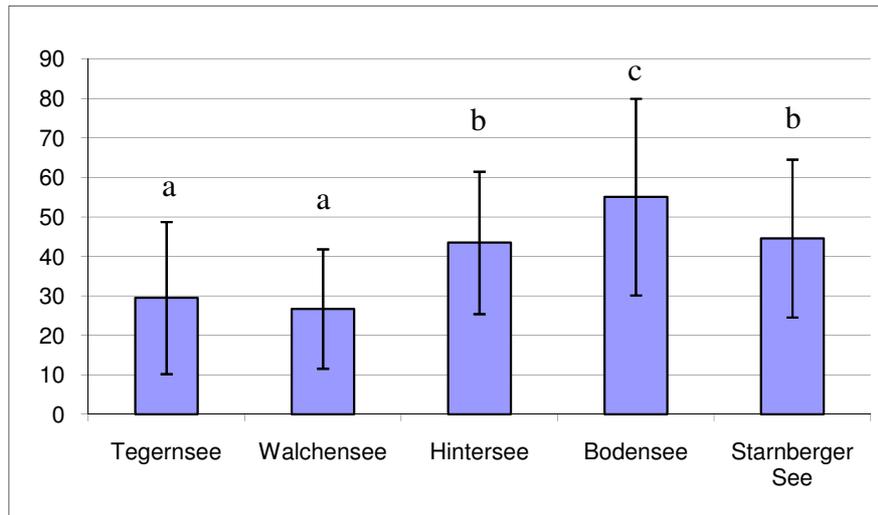


Abb. 5: Mittlere Stückmasse (g) der verschiedenen Herkünfte zum Abschluss des Herkunftsvergleiches ($x \pm SD$; alle Gruppen $n=295$, $p \leq 0,05$).

Nach 215 Versuchstagen zeigten sich signifikante Wachstumsunterschiede zwischen den Gruppen. Während sich die Einzelgewichte der Seesaiblinge des Tegernsees ($29,48 \pm 19,27$ g) und Walchensees ($26,72 \pm 15,10$ g) untereinander nicht signifikant unterschieden, zeigten die Fische des Hintersees ($43,46 \pm 18,05$ g) und des Starnberger Sees ($44,57 \pm 20,00$ g) signifikant höhere Stückmassen, die sich aber untereinander nicht signifikant unterschieden. Die größten Stückmassen wurden für die Herkunft Bodensee ermittelt. Mit mittleren Stückmassen von $55,06 \pm 24,90$ g zeigten sie eine signifikant bessere Wachstumsleistung gegenüber allen anderen Gruppen.

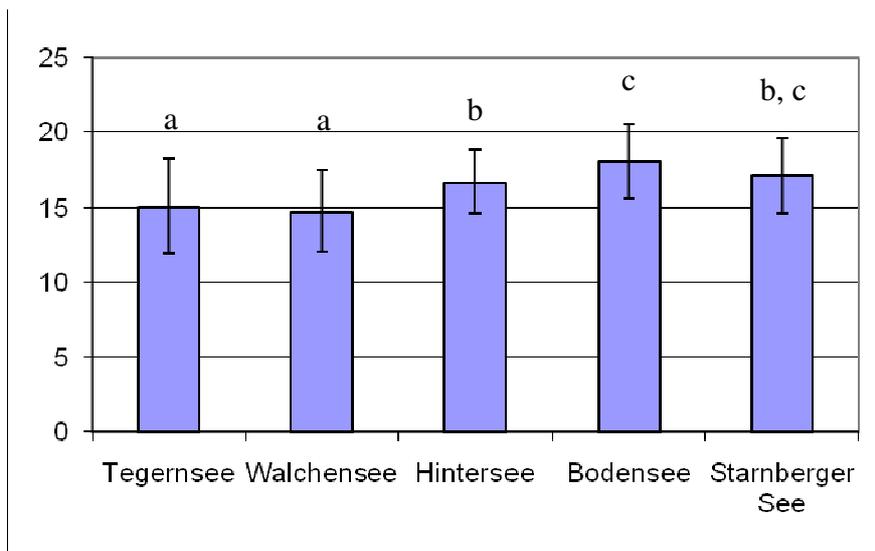


Abb. 6: Mittlere Totallänge der verschiedenen Herkünfte zum Abschluss des Herkunftsvergleiches ($x \pm SD$; alle Gruppen $n=295$, $p \leq 0,05$).

Die Auswertung der Totallänge ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Herkunft Tegernsee mit einer mittleren Länge von $15,1 \pm 3,1$ cm und der Herkunft Walchensee mit $14,7 \pm 2,7$ cm. Damit unterschieden sie sich signifikant von den übrigen Herkünften. Eine signifikant bessere Längenentwicklung konnte für die Herkunft Hintersee mit einer mittleren Länge von $16,7 \pm 2,1$ cm und für den Starnberger See ($17,1 \pm 2,4$ cm) ermittelt werden. Am größten gewachsen waren die Seesaiblinge der Herkunft Bodensee mit $18,1 \pm 2,5$ cm. Diese unterschieden sich signifikant von den Seesaiblingen des Hintersees, jedoch nur tendenziell von der Herkunft Starnberger See.

Die Berechnung der mittleren spezifischen Wachstumsraten über den gesamten Versuchszeitraum ergab geringe Wachstumsraten von $0,85 \pm 0,03$ %/Tag für die Herkunft Tegernsee (Tab. 7). Noch geringere Raten wurden für die Herkunft Walchensee berechnet ($0,80 \pm 0,04$ %/Tag). Dagegen konnten für die übrigen Chargen deutlich höhere spezifische Wachstumsraten errechnet werden (Hintersee: $1,06 \pm 0,03$ %/Tag, Starnberger See: $0,97 \pm 0,01$ %/Tag). Die höchsten mittleren spezifischen Wachstumsraten wurden bei der Herkunft Bodensee mit $1,10 \pm 0,03$ %/Tag erreicht.

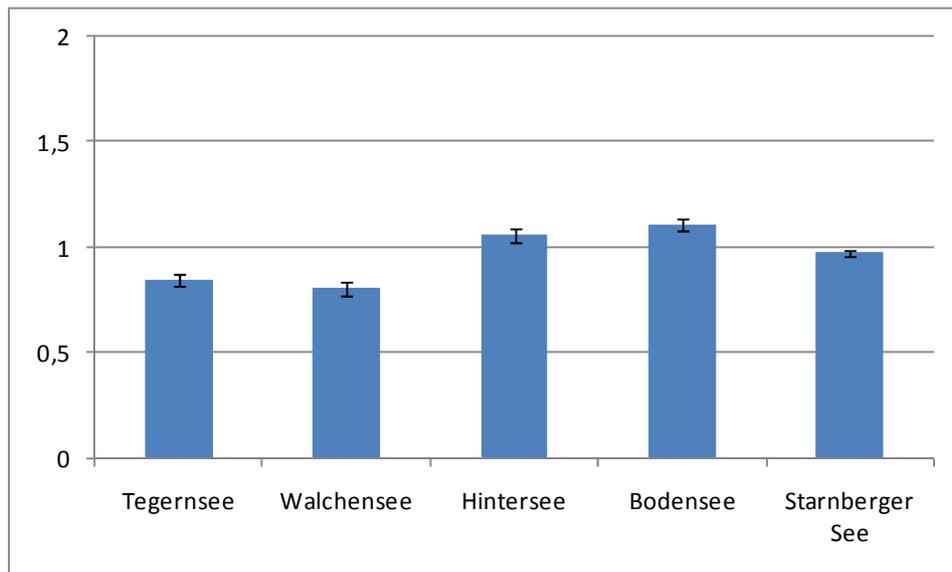


Abb. 7: Mittlere Spezifische Wachstumsrate der Herkünfte zum Abschluss des Herkunftsvergleiches ($x \pm SD$; alle Gruppen $n=3$, $p \leq 0,05$).

Über den gesamten Versuchsverlauf ergaben sich bei allen Herkünften ähnliche Verläufe der spezifischen Wachstumsraten. Mit Ausnahme der Herkunft Walchensee verringerte sich die tägliche Wachstumsleistung aller Gruppen im ersten Versuchszeitraum. Jedoch stieg der tägliche Zuwachs ab Mitte Dezember wieder an. In der zweiten Versuchshälfte verringerte sich die spezifische Wachstumsrate erneut (Abb. 8).

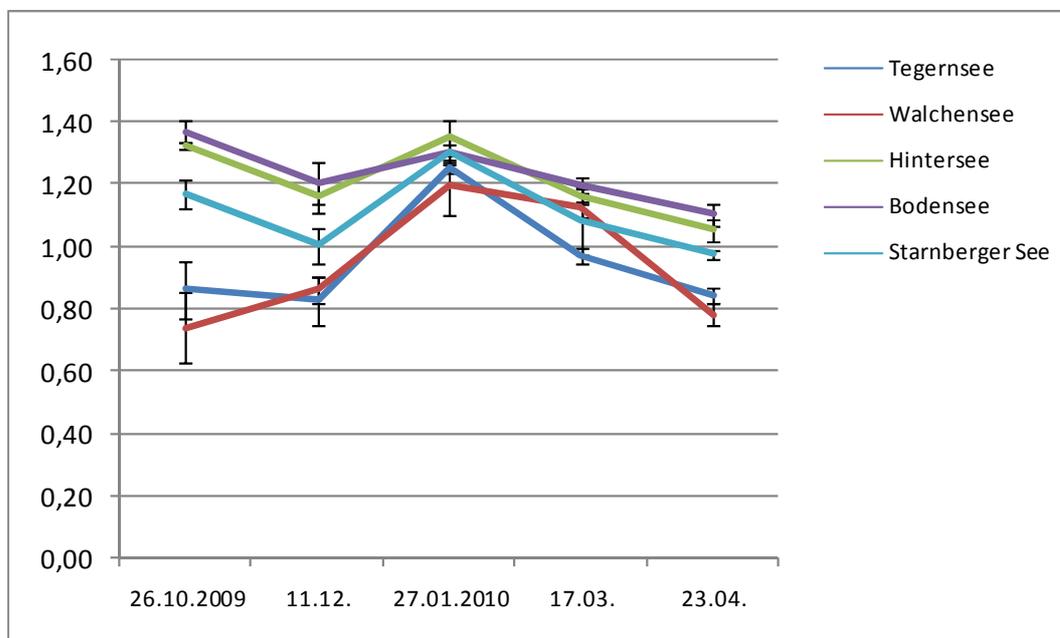


Abb. 8: Darstellung der spezifischen Wachstumsrate (SGR) der Herkünfte über den gesamten Versuchsverlauf ($x \pm SD$; alle Gruppen $n=3$, $p \leq 0,05$).

3.2.5.3.2 Futterverwertung

Die Auswertung zur Versuchsbeendigung ergab einen Futterquotienten von $1,67 \pm 0,07$ für die Herkunft Tegernsee. Eine etwas geringere Futterverwertung wurde für die Seesaiblinge der Herkunft Walchensee ermittelt (Futterquotient $1,77 \pm 0,10$). Die Herkunft Starnberger See verfügte mit einem mittleren Futterquotienten von $1,41 \pm 0,12$ über eine etwas bessere Futterverwertung. Die Herkünfte Hintersee ($1,28 \pm 0,05$) und insbesondere Bodensee mit einem Futterquotienten von $1,24 \pm 0,02$ wiesen die besten Futterverwertungen auf.

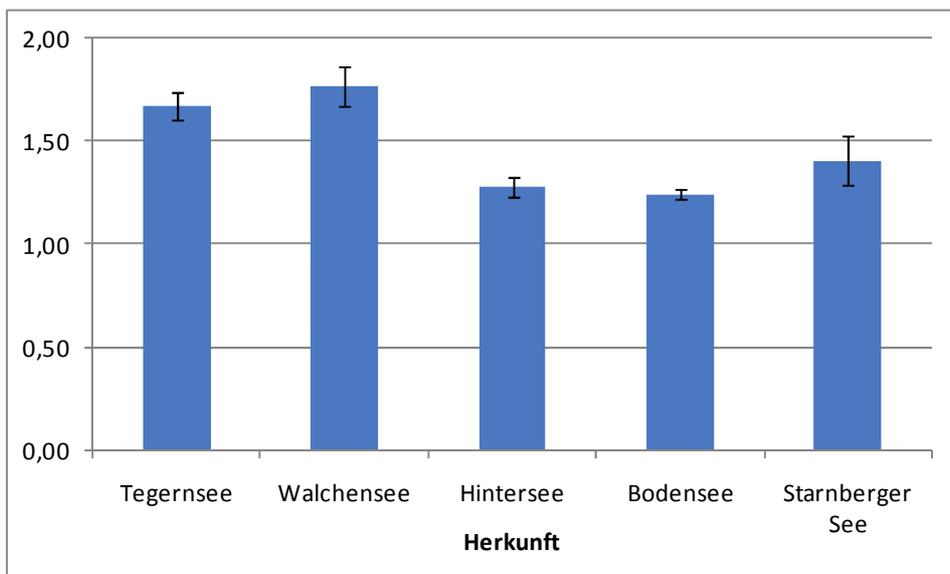


Abb. 9: Mittlere Futterquotienten der Herkünfte zum Abschluss des Herkunftsvergleiches ($x \pm SD$; alle Gruppen $n=3$, $p \leq 0,05$).

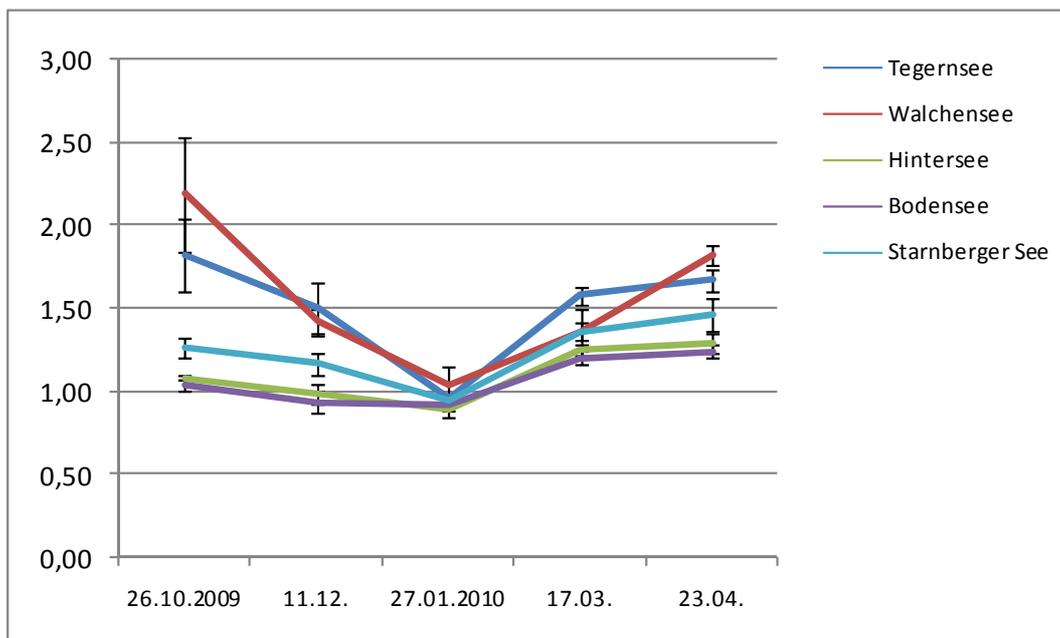


Abb. 10: Entwicklung des Futterquotienten (FQ) der Herkünfte über den gesamten Versuchsverlauf ($x \pm SD$; alle Gruppen $n=3$, $p \leq 0,05$).

Die erste Zwischenwägung ergab stark erhöhte Futterquotienten bei den Herkünften Walchensee und Tegernsee, die aber bis zur Mitte des Versuchszeitraums kontinuierlich absanken. In dieser Zeit wurde eine weitaus bessere Futterverwertung für die drei Herkünfte Starnberger See, Bodensee und Hintersee ermittelt. Jedoch verwerteten zur Halbzeit des Versuches alle Herkünfte die angebotenen Trockenmischfuttermittel mit einem mittleren Futterquotienten nahe 1 ähnlich gut. Im weiteren Versuchsverlauf reduzierte sich die Futterverwertung, und die Futterquotienten stiegen an. Während sich bei den Herkünften Starnberger See, Bodensee und Hintersee die Futterverwertung nur moderat verschlechterte, war bei den Herkünften Walchensee und Tegernsee ein verstärkter Anstieg der Futterquotienten zu verzeichnen.

3.2.5.3.3 Kondition

Die Auswertung am Ende des Herkunftsvergleiches ergab signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Mit Korpulenzfaktoren von $0,80 \pm 0,08$ (Tegernsee) und $0,77 \pm 0,07$ (Walchensee) unterschieden sich diese Herkünfte untereinander signifikant. Auch gegenüber den anderen Chargen waren diese Fische signifikant schlanker gewachsen. Statistisch abgesicherte Unterschiede konnten auch für die Herkunft Starnberger See mit einem mittleren Korpulenzfaktor von $0,86 \pm 0,07$ und die Herkunft Hintersee ($0,89 \pm 0,08$) nachgewiesen werden. Mit einer mittleren Korpulenz von $0,88 \pm 0,10$ unterschied sich die Herkunft Bodensee von den beiden Letztgenannten nicht signifikant.

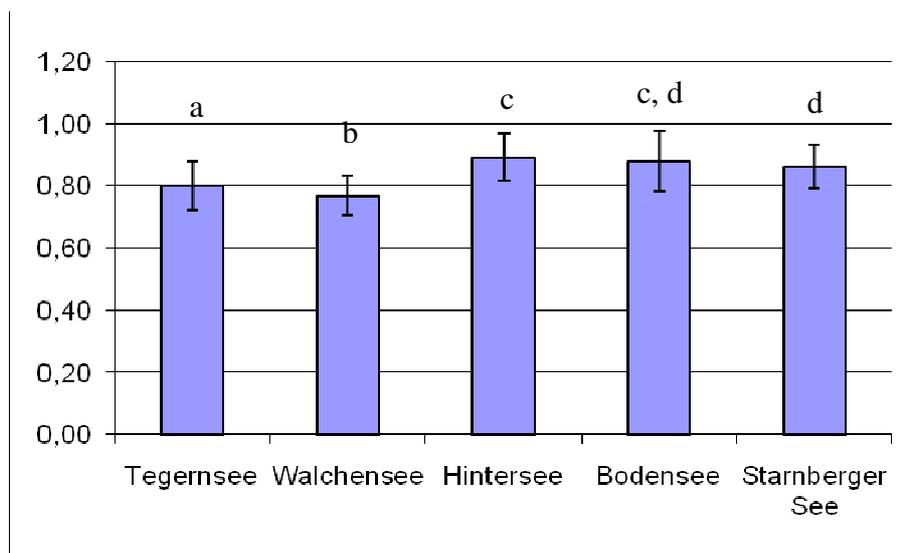


Abb. 11: Mittlere Korpulenzfaktoren der verschiedenen Herkünfte zum Abschluss des Herkunftsvergleiches ($\bar{x} \pm SD$; alle Gruppen $n=295$, $p \leq 0,05$).

Der Schlachtkörperanteil lag bei allen Gruppen um 90 %. Es konnten aber geringfügige, signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Herkünften ermittelt werden (Tab. 15). Besonders die Herkünfte Starnberger See und Hintersee verfügten über einen geringeren Innereienanteil gegenüber den anderen Herkünften. Intraviscerale Fetteinlagerungen waren nicht herkunftsspezifisch und konnten nur bei wenigen Einzeltieren festgestellt werden. Bei den Herkünften Hintersee und Starnberger See korrelierte der höhere

Schlachtkörperanteil mit einem geringeren Gonadosomatischen Index (GSI). Die Gonaden waren bei über 50 % aller Fische bereits makroskopisch sichtbar, und im Falle der Milchener bereits weit entwickelt. Dies wurde insbesondere bei der Herkunft Walchensee mit einem GSI von $1,66 \pm 2,59$ deutlich. Der Anteil des Lebergewichtes am Gesamtkörpergewicht (HSI) variierte innerhalb der Gruppen, in Abhängigkeit vom Reifegrad der Gonaden stark. Unterschiede beim Hepatosomatischen Index zwischen den einzelnen Herkünften konnten allerdings statistisch nicht abgesichert werden.

Tab. 15: Prozentualer Anteil des Schlachtkörpers (amK) und der Innereien am Gesamtgewicht, Hepatosomatischer Index (HSI) und Gonadosomatischer Index (GSI) der verschiedenen Herkünfte zum Abschluss des Herkunftsvergleiches ($x \pm SD$; alle Gruppen $n=45$, $p \leq 0,05$).

	Tegernsee	Walchensee	Hintersee	Bodensee	Starnberger See
amK (%)	$90,65 \pm 1,53^{a,b}$	$90,31 \pm 1,80^a$	$91,53 \pm 1,15^b$	$89,91 \pm 1,31^a$	$91,37 \pm 1,16^b$
Innereien (%)	$9,35 \pm 1,53^a$	$9,69 \pm 1,80^{a,b}$	$8,47 \pm 1,15^c$	$10,09 \pm 1,31^b$	$8,63 \pm 1,16^{a,c}$
HSI	$1,02 \pm 0,24^a$	$1,07 \pm 0,21^{a,b}$	$1,07 \pm 0,22^{a,b}$	$1,17 \pm 0,23^b$	$1,12 \pm 0,27^{a,b}$
GSI	$0,27 \pm 0,58^a$	$1,66 \pm 2,59^b$	$0,70 \pm 1,42^{a,b}$	$0,31 \pm 0,29^{a,b}$	$0,28 \pm 0,25^{a,b}$

Bei den zuzuordnenden Fischen war das Geschlechtsverhältnis war bei allen Herkünften ausgeglichen. Der Vergleich von bestimmaren und unbestimmaren Geschlechtern ergab eine mögliche Differenzierung bei über 50 % der Seesaiblinge aller Herkünfte (Walchensee: 67 %, Hintersee: 58 %, Bodensee: 64 %, Starnberger See: 69 %). Lediglich bei der Herkunft Tegernsee konnte nur von 47 % aller Fische einem Geschlecht zugeordnet werden.



Abb. 12: Anteil von bestimmaren und unbestimmaren Fischen in den verschiedenen Gruppen am Ende des Herkunftsvergleiches ($x \pm SD$; alle Gruppen $n=45$, $p \leq 0,05$).

Die Auswertung der Trockensubstanzen der einzelnen Fische ergab statistisch abgesicherte Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Fische aus dem Hintersee und Bodensee verfügten über einen signifikant höheren Trockensubstanzgehalt gegenüber den Herkunftorten Tegernsee und Walchensee. Bei der Herkunft Starnberger See konnten keine signifikanten Unterschiede zu den übrigen Gruppen ermittelt werden (Tab. 16). Die Bruttoenergiegehalte der einzelnen Fische folgen den Ergebnissen der Trockensubstanzbestimmung. Die Fische der Herkunft Hintersee, Bodensee und Starnberger See verfügten über einen höheren Bruttoenergiegehalt als die Herkunftorten Tegernsee und Walchensee. Die höchsten Bruttoenergiegehalte wurden mit $7,20 \pm 0,86$ MJ/kg bei der Herkunft Bodensee ermittelt.

Tab. 16: Mittlerer prozentualer Anteil der Trockensubstanz (TS) und Bruttoenergiegehalt (BE) der verschiedenen Herkunftorten zum Abschluss des Herkunftsvergleiches ($x \pm SD$; alle Gruppen $n=45$, $p \leq 0,05$).

	Tegernsee	Walchensee	Hintersee	Bodensee	Starnberger See
TS (%)	$26,64 \pm 2,36^a$	$26,28 \pm 1,50^a$	$27,96 \pm 1,54^b$	$29,08 \pm 1,91^c$	$27,61 \pm 1,72^{a,b}$
BE (MJ/kg)	$6,23 \pm 0,95^a$	$6,12 \pm 0,58^a$	$6,79 \pm 0,62^{b,c}$	$7,20 \pm 0,86^c$	$6,65 \pm 0,69^{a,b}$

3.2.5.3.4 Verluste

Während des Herkunftsvergleiches kam es nur vereinzelt zu Verlusten. In einem Becken der Herkunft Starnberg wurden wiederholt einzelne Verluste registriert (Tab. 17). Die Ursache dafür war eine anfängliche Schädigung der Kiemen, die wahrscheinlich durch eine bakterielle Belastung hervorgerufen worden war. Verluste durch Kannibalismus traten in keinem Becken auf.

Tab. 17: Mittlere Überlebensraten der Herkunftorten während des Herkunftsvergleiches in Prozent ($x \pm SD$; alle Gruppen $n=3$, $p \leq 0,05$).

Herkunft	Tegernsee	Walchensee	Hintersee	Bodensee	Starnberger See
Überleben (%)	97 ± 1	99 ± 1	98 ± 2	98 ± 1	94 ± 9

3.2.5.3.5 Fischgesundheit

Die Begutachtung der Fische ergab keine gravierenden Krankheitsbilder. Alle Fische verfügten über einen einwandfreien äußeren Zustand. Flossen und Kiemendeckel waren normal entwickelt, ohne jegliche Anzeichen von haltungsbedingten Defiziten. Läsionen auf der Haut wurden nicht gefunden. Hautabstriche während und zur Beendigung der Untersuchung ergaben zu keinem Zeitpunkt einen parasitären Befall. Die Kiemen waren bis auf wenige Einzelfälle in einem makroskopisch guten Zustand, nekrotisches Gewebe konnte nur in einem Fall gefunden werden. Eine mikroskopische Begutachtung einzelner Fische hinsichtlich des Zustandes der Kiemenlamellen ergab einen leichten bis mittleren Verschleimungsgrad des Kiemengewebes. Ein parasitärer Befall der Kiemen und Haut konnte nicht festgestellt werden. Die inneren Organe wurden makroskopisch untersucht. Alle Fische verfügten über unveränderte Herzen, Schwimmblasen und Nieren. Dagegen wurde bei vielen Tieren eine veränderte Milz festgestellt. Insbesondere galt dies für die Herkunft

Tegernsee. Die Milz dieser Fische war stark geschwollen, dunkel bis schwarz gefärbt und die äußeren Zellen hypertroph. Dagegen gab es bei den Herkünften Bodensee und Starnberger See signifikant weniger Veränderungen des Organgewebes. Entzündungen des Magen-Darm-Traktes kamen nur bei einzelnen Tieren vor, ein herkunftsspezifischer Zusammenhang konnte nicht ermittelt werden. Alimentäre Veränderungen der Leber wurden bei fast allen Fischen festgestellt.

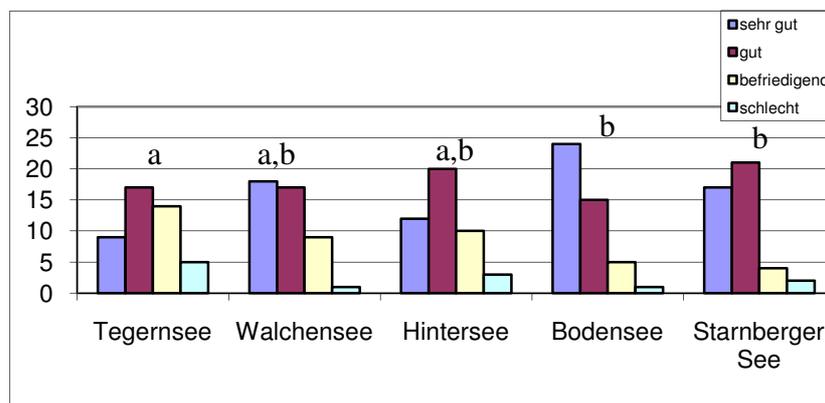


Abb. 13: Zustand der Milz der verschiedenen Herkünfte zum Abschluss des Herkunftsvergleiches ($x \pm SD$; alle Gruppen $n=45$, $p \leq 0,05$).

3.3 Diskussion

3.3.1 Laichfischfang

Die Voraussetzung für einen erfolgreichen Verlauf des Projektes stellte der Fang von laichreifen Seesaiblingen dar. Aufgrund der geografischen Lage, der unterschiedlichen morphologisch bedingten Eigenschaften der Gewässer aber auch der populationsspezifischen Eigenschaften der Seesaiblinge variierten die Laichzeiträume voneinander. Daneben setzten die Auswahl der Fanggründe Ortskenntnis und langjährige Erfahrung beim Seesaiblings-Laichfischfang zwingend voraus. Diese Voraussetzungen waren nur in Zusammenarbeit mit den ansässigen Fischerberechtigten zu erfüllen. Sie brachten das notwendige Wissen über Fanggründe und Laichzeiträume in den von ihnen bewirtschafteten Gewässern in das Projekt ein und stellten darüber hinaus ihre Räumlichkeiten, Material und ihre Arbeitskraft unentgeltlich zu Verfügung. Ihre Unterstützung bildete die Grundlage für die erfolgreiche Durchführung des Projektes.

3.3.2 Erbrütung

Es gelang die Eier aller sieben Herkünfte in die Anlage des Institutes für Fischerei zu überführen. In den ersten Tagen nach der Befruchtung waren erwartungsgemäß höhere Verluste durch nicht befruchtete oder nicht lebensfähige Eier in allen Chargen aufzufinden. Bis zum Erreichen des Augenpunktstadiums wurden im weiteren Verlauf nur geringe Verlustzahlen ermittelt. Ab dem Augenpunktstadium kam es dagegen zu einem Anstieg des Verlustgeschehens. Diese Verluste können aber nicht Aufschluss über die Empfindlichkeit der Eichargen und die Eignung der Herkünfte geben, da die Gewinnung der Geschlechtsprodukte und der Transport nicht immer unter gleichen Bedingungen stattfinden konnten. Daneben war ein einmaliger Ausfall der Stromversorgung des Kühlaggregats für ein kurzzeitiges Verlustgeschehen verantwortlich. Während des Schlupfes traten nur wenige Verluste auf. Der weit auseinander gezogene Schlupfzeitraum wirkte sich nachteilig auf den Aufzuchterfolg der Herkünfte aus: Die sich über einen Zeitraum von maximal drei Wochen erstreckenden Zeiträume führten zu Größenunterschieden innerhalb der Chargen. Dies hatte auch im späteren Projektverlauf die Folge, dass eine für den Herkunftsvergleich notwendige homogene Größenverteilung innerhalb und zwischen den Gruppen nur unter erschwerten Bedingungen erlangt werden konnte. Neben dem langgestreckten Schlupfzeitraum erschwerten auch die unterschiedlichen Eidiameter dieses Ziel. So resultierte der geringe Eidiameter der Herkunft Ammersee in deutlich kleineren Larven. Diese konnten das angebotene Futter nicht ausreichend aufnehmen, was den Einsatz von kleineren Futterpartikeln erforderlich machte. Die Wachstumsleistung dieser Fische war von Beginn an geringer als bei den anderen Herkünften, daher wurden sie nicht in den Herkunftsvergleich einbezogen.

3.3.3 Anfütterung

Während der Anfütterung kam es zu einem andauernden Verlustgeschehen, dass ohne Ausnahme bei allen Chargen auftrat. Trotz geeigneter Partikelgrößen und einer optimalen chemischen Zusammensetzung der Trockenmischfuttermittel akzeptierte der überwiegende Teil der Larven anfangs nicht die angebotene Nahrung. Unterstützt wurde dies durch die geringen Futtergrößen, die erst sehr spät die Oberfläche durchbrachen und zu Boden sanken. Die Mehrzahl der Seesaiblinge verweigerte die Futteraufnahme von der Wasseroberfläche, sondern verweilte während der Anfütterung am Beckengrund. Auch konnte eine Durchmischung des Wassers mit dem Futter die Aufnahme nicht entscheidend ver-

bessern. Die Verweigerung von Trockenmischfuttermitteln ist ein bekanntes Phänomen bei der Anfütterung von Seesaiblingen, das bereits in verschiedenen Studien beschrieben wurde (STEINER, 1984; REITER, 2006). Erst der Einsatz einer tiefgefrorenen Naturnahrung führte zur Futterraufnahme und verringerte die Verluste. Gute Ergebnisse wurden bei der Fütterung mit tiefgefrorenen Cyclops und Bosmiden erzielt, die in Kombination mit Trockenfutter angeboten wurden.

3.3.4 Eignung für die Aquakultur

Die Ergebnisse weisen auf die grundsätzliche Möglichkeit der Aquakulturnutzung der untersuchten Abstammungen hin. Dennoch gibt es zwischen den Gruppen Unterschiede, die eine Aquakulturproduktion beeinflussen können.

Der geringe Eidurchmesser der Herkunft Ammersee führte zu notwendigen Modifikationen der Haltungsumwelt: Die Eier waren deutlich schwieriger in ihrer Handhabung, insbesondere das Entfernen abgestorbener Eier beansprucht mehr Zeit. Die sehr kleinen Larven erforderten eine spezielle Ausstattung der Haltungseinheiten, da die in der Forellenteichwirtschaft verwendeten Maschenweiten von Sieben und Abgitterungen sich als zu groß dimensioniert erwiesen und durch geringere Maschenweiten ersetzt werden mussten. Dadurch aber stieg das Risiko von Havarien an. Desweiteren mussten die Larven mit einer geringeren Partikelgröße angefütert werden, was den Einsatz eines speziellen Trockenmischfuttermittels erforderte. Dagegen ist die Handhabung der größeren Eier und Larven der übrigen untersuchten Herkünfte eher praktikabel.

Die geringen Verlustraten bei den fünf untersuchten Herkünften während der Aufzucht zeigen, dass die Wildfische an die Bedingungen der intensiven Aquakultur adaptiert werden konnten. Die Heterogenität der Wachstumsleistung innerhalb der Gruppen jedoch lässt die Vermutung zu, dass einzelne Haltungparameter nicht den Anforderungen der Fische entsprachen. Ein Einflussfaktor ist die Besatzdichte. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass niedrige Besatzdichten das Auseinanderwachsen begünstigen (JOBILING, 1985; WALLACE, 1988; REITER, 2006). Dabei kann es zu einem Territorialverhalten kommen, das häufig in einer gesteigerten Aggressivität mündet (WEDEKIND 2003). Rangniedere Artgenossen werden dabei von den Futterplätzen verdrängt. Obwohl ein solches Verhalten nicht direkt beobachtet werden konnte, ist ein Zusammenhang zwischen der gewählten Besatzdichte und der heterogenen Größenverteilung innerhalb einer Herkunft wahrscheinlich. Andererseits kann auch die direkte Abstammung von Wildfischen (Wildverhalten) ursächlich sein. Die sich daraus ergebende fehlende züchterische Bearbeitung der Bestände kann einen weiteren Grund für das starke Auseinanderwachsen innerhalb einer Gruppe darstellen. Dafür sprechen auch verschiedene Untersuchungen, bei denen bei Wildfischen ein stärkeres Auseinanderwachsen der Fische und/oder ein aggressiveres Verhalten als bei Zuchtstämmen gefunden wurde (BRÄNNÄS et al., 2005; BERRIL UND MACCARTHY, 2008).

Insgesamt entsprach die Wachstumsleistung aller untersuchten Gruppen nicht den Erfahrungen mit entwickelten Zuchtstämmen. Auch verschiedene Untersuchungen anderer Autoren belegen die Überlegenheit selektierter Zuchtstämme gegenüber Wildpopulationen in Teichwirtschaften. BERRIL UND MACCARTHY (2008) verglichen die Leistung von Seesaiblingen eines wilden Stamms mit einem züchterisch bearbeiteten Stamm. Dabei erwiesen sich die wilden Seesaiblinge zwar anfänglich als überlegen, im weiteren Versuchsverlauf erreichte der selektierte Zuchtstamm aber eine höhere Stückmasse und Kondition. Auch bei SIIKAVUOPIO et al. (2009) war der Zuchtstamm den wilden Seesaiblingen im Hinblick

auf Wachstum und Überlebensrate deutlich überlegen. Diese Erkenntnisse wurden auch für andere Vertreter der Familie der *Salmonidae* beschrieben. So wurden von WOLTERS et al. (2009) und GLOVER et al. (2009) auch beim Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) höhere Wachstumsraten bei selektierten Stämmen im Vergleich mit wilden Stämmen ermittelt.

Die Anpassungsfähigkeit von Fischen an ungünstige oder wechselnde Umweltbedingungen ist stark von ihrer erworbenen Kondition abhängig. Eine gute Kondition lässt Fische ihre lebenswichtigen physiologischen Funktionen auch bei ungünstigen Haltungsbedingungen aufrechterhalten. Die Kondition kann von dem Ernährungszustand der Fische abgeleitet werden. Dieser kann über die Körperzusammensetzung, den Korpulenzfaktor und den Hepatosomatischen Index bestimmt werden. Auch das Schlachtkörpergewicht (amK) gibt Aufschluss über den Ernährungszustand der Seesaiblinge. Innerhalb einer Art und Altersklasse kann eine schlechte Kondition für den niedrigen Schlachtkörperanteil verantwortlich sein (WEDEKIND 1996). Andererseits können verstärkte Einlagerungen von Fett in der Leibeshöhle zu einem erhöhten Innereienanteil geführt haben. Die bei den vorliegenden Untersuchungen ermittelten Schlachtkörperanteile und Bruttoenergiegehalte sind daher nicht Ausdruck einer signifikant geringeren Kondition der Herkünfte Bodensee und Walchensee, sondern beruhen auf einem höheren intravisceralen Fettgehalt bzw. einer weiter fortgeschrittenen Gonadenentwicklung.

Der hohe Bruttoenergiegehalt aller Versuchsfische weist auf eine gute Kondition hin, die Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Erzeugung gesunder Fische. Der Korpulenzfaktor (k-Faktor) wird stark von der genetisch festgelegten Wachstumspotenz beeinflusst und kann beträchtlich variieren. Nach BEAMISH et al. (1996) steigt der Korpulenzfaktor mit zunehmender Länge an und unterscheidet sich nicht zwischen den Jahreszeiten. Die bei der vorliegenden Studie ermittelten signifikant unterschiedlichen Korpulenzfaktoren der Seesaiblinge weisen demnach nicht auf eine schlechtere Kondition hin, sondern sind vielmehr der geringeren Wachstumsleistung einzelner Herkünfte geschuldet. Insofern kann der Korpulenzfaktor hier nicht zur Ermittlung der Kondition herangezogen werden kann. Der Hepatosomatische Index (HSI) gibt Aufschluss über den Anteil des Lebergewichtes am Gesamtgewicht eines Fisches. Die Leber dient bei Fischen als Hauptspeicherorgan für Fette, die bei Bedarf rasch mobilisiert werden können. Der Hepatosomatische Index kann daher für die Beurteilung der Kondition herangezogen werden. Im Mittel verfügten die Fische aller Herkünfte über relativ hohe hepatosomatische Indices über 1, d.h. es lag eine hohe Lebermasse vor. Dies spricht einerseits für eine gute Kondition, andererseits aber auch für die Fähigkeit Energiereserven zu speichern.

Die Unempfindlichkeit gegenüber Parasiten und pathogenen Keimen ist von großer Bedeutung für eine wirtschaftlich sinnvolle Erzeugung. Bei den Untersuchungen zeigten die Fische aller Herkünfte keinerlei äußere Krankheitssymptome. Haut und Flossen waren in einem einwandfreien Zustand, auch im Muskelgewebe konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Die Begutachtung der Organe ergab kaum Anhaltszeichen für eine Erkrankung. Bei allen Gruppen konnten geringfügige alimentäre Veränderungen an den Lebern festgestellt werden. Zu erwähnen sind die geringfügigen farblichen Veränderungen der Lebern der Fische. Es handelt sich hierbei um verstärkte Fetteinlagerungen im Lebergewebe in einem frühen Stadium (HAMERS UND RÖSCH, 2000), die bei allen Gruppen einen nahezu identischen Grad aufwiesen. Bisherige Studien zeigen, dass die Ernährung mit handelsüblichen Futtermitteln bei Fischen häufig zu pathologischen Organveränderungen und der Einlagerung von Fetten in den Organen (Leber) und der Leibeshöhle führt (KAUSHIK et al., 1989; SCHRECKENBACH, 1996). Die Tatsache, dass die Fische aller Herkünfte in der Lage waren, neben dem somatischen Wachstum Energie in der Leber zu

speichern, deutet auf eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen hin und spricht für die Eignung der verwendeten Futtermittel. Damit erscheinen die Fische ausreichend für eventuelle Hungerphasen oder Stressgeschehen konditioniert. Dagegen bleiben die Ursachen für die Veränderungen im Milzgewebe spekulativ. Möglich ist eine unbemerkt gebliebene bakterielle Erkrankung. Aber auch eine gestörte Funktion des lymphatischen Systems ist denkbar. Beides könnte zur Bildung des hypertrophen Zellgewebes geführt haben. Die Auswertung der anderen Organe, insbesondere der Kiemen, gibt keinen Hinweis auf eine Anämie. Die Tatsache, dass solche Veränderungen unabhängig von der Herkunft in allen Becken auftraten, spricht für eine abgeklungene bakterielle Erkrankung.

Hinsichtlich der Geschlechtsentwicklung wurde in der vorliegenden Untersuchung die allgemein bekannte Beobachtung bestätigt, dass männliche Salmoniden früher geschlechtsreif werden als weibliche Tiere. Bei allen Versuchsgruppen wiesen die Milchner einen deutlich höheren Reifegrad auf als die Rogener.

Insgesamt erwiesen sich die Seesaiblinge vom Walchensee im Vergleich zu den anderen untersuchten Herkünften als deutlich frühreifer. Darin kann auch das eingeschränkte somatische Wachstum in dieser Gruppe begründet sein. Für die sinnvolle wirtschaftliche Nutzung eines Seesaiblingsstammes in der Aquakultur sind daher ein langandauerndes somatisches Wachstum und eine später Eintritt in die Geschlechtsreife erforderlich.

3.3.5 Zusammenfassende Leistungsbewertung

Auf Grund der Heterogenität des Probenmaterials (Eichargen von Wildfischen) und z.T. unterschiedlicher, früher Aufzuchthistorie sind anhand der erhaltenen Ergebnisse grundsätzliche Aussagen zur Aquakultureignung der untersuchten Herkünfte nur sehr eingeschränkt möglich. Zudem bleibt die Genotyp-Umwelt-Interaktion unberücksichtigt, d.h. die Resultate lassen sich nicht allgemein auf andere Haltungsbedingungen übertragen.

Dennoch soll im nachfolgenden Text der Versuch gemacht werden, die erhaltenen Ergebnisse zu vergleichen und im Hinblick auf eine mögliche Verwendung der untersuchten Populationen in der Aquakultur zu interpretieren.

I. Ammersee (nicht in Herkunftsvergleich einbezogen)

Die Herkunft Ammersee verfügte über vitale Larven, die unter der gegebenen Haltungs-umwelt aufgezogen werden konnten. Dabei erforderte die Anfütterung der Larven den Einsatz von Futtermitteln mit einer sehr kleinen Partikelgröße. Auch war die Handhabung der Herkunft durch die geringe Larvengröße erschwert, da die in der Forellenteichwirtschaft üblichen Maschenweiten der Siebe und Trenngitter nicht ausreichend waren. Dies hatte zeitintensive Umbauten zur Folge. Während der anschließenden Aufzucht verfügte sie im Vergleich mit den anderen Herkünften über eine unterdurchschnittliche Wachstumsleistung. Positiv hervorzuheben ist die hohe relative Eimenge der Rogener. Die benötigten Eimengen konnten so verhältnismäßig leicht beschafft werden.

II. Königssee (nicht in Herkunftsvergleich einbezogen)

Auffällig waren bei den Seesaiblingen der Herkunft Königssee die geringe Körpergröße der Elterntiere und die geringe Eimenge der Rogener. Daher war der Fang einer großen Anzahl Rogener notwendig, um die erforderlichen Eimengen zu beschaffen. Unter den gegebenen intensiven Haltungsbedingungen konnten die Eier erfolgreich erbrütet und angefütert werden. Negativ wirkte sich der langgestreckte Schlupfzeitraum der Gruppe aus.

Dadurch kam es zu einer heterogenen Größenverteilung bereits kurz nach der Anfütterung. Die großen vitalen Larven akzeptierten die angebotenen Futtermittel schnell und verfügten während der weiteren Aufzucht über eine gute Wachstumsleistung. Die heterogene Wachstumsleistung setzte sich während der weiteren Aufzucht weiter fort und erforderte eine häufige Größensortierung der Fische.

III. Tegernsee

Die Herkunft Tegernsee konnte erfolgreich unter Aquakulturbedingungen erbrütet werden. Während der Anfütterung konnte die anfängliche Futterakzeptanz nur durch den Einsatz von gefrorenem Plankton gesichert werden. Der langgestreckte Schlupftermin war verantwortlich für eine ausgeprägte heterogene Größenverteilung. Dadurch war ein mehrmaliges Sortieren der Seesaiblinge bis zum Beginn des Herkunftsvergleiches erforderlich. Auch im weiteren Untersuchungszeitraum zeigte sich in dieser Gruppe eine sehr große Variabilität bei der individuellen Wachstumsleistung. Insgesamt war die Leistung der Tegernsee-Saiblinge unter den gegebenen Bedingungen unterdurchschnittlich. Die Fische verfügten über eine gute Kondition und - mit Ausnahme häufig festgestellter Milzschwellung - über einen guten Gesundheitszustand.

IV. Walchensee

Die Herkunft Walchensee konnte erfolgreich erbrütet werden. Während der Anfütterung kam es zu einem schweren Verlustgeschehen, da die Brütlinge nicht das Trockenmischfuttermittel annahmen. Auch die angebotene Naturnahrung wurde nur zögerlich akzeptiert. Während des Herkunftsvergleiches wiesen die Fische ein extrem heterogenes Größenwachstum auf und verfügten insgesamt über die geringsten Leistungseigenschaften: Neben der unterdurchschnittlichen Wachstumsleistung und der geringen Futterverwertung spricht der hohe Gonadosomatische Index gegen eine Eignung für die Aquakultur.

V. Hintersee

Die Herkunft Hintersee zeichnete sich durch sehr geringe Verluste während der Erbrütung und Aufzucht aus. Die Anfütterung der Larven erwies sich als relativ unkompliziert, die Trockenfuttermittel wurden gut angenommen. Im Vergleich zu oben genannten Herkünften verfügte die gesamte Charge über ein homogenes Wachstum, welches nur von der Herkunft Bodensee übertroffen wurde. Die Fische waren sehr gut konditioniert und verfügten über einen guten Gesundheitszustand.

VI. Bodensee

Unter den gegebenen Bedingungen zeigte die Herkunft Bodensee die besten Leistungseigenschaften für die Aufzucht in Aquakultur. Während der Erbrütung und dem Schlupf kam es allerdings zu erheblichen Ei- und Larvenverlusten. Bei der anschließenden Anfütterung nahmen die Fische von Anfang an das angebotene Trockenmischfuttermittel auf. Daher kam es ab diesem Zeitpunkt nur zu geringen Verlusten. Während des Herkunftsvergleiches verfügten sie über die beste Wachstumsleistung und tendenziell auch über ein gleichmäßigeres Größenwachstum. Der geringe Gonadosomatische Index (GSI) spricht für eine ausreichend späte Laichreife, die ein lang andauerndes somatisches Wachstum garantiert. Auch waren die Bodensee Seesaiblinge mit hohen Bruttoenergiegehalten am besten konditioniert.

VII. Starnberger See

Die Erbrütungsperiode der Herkunft Starnberger See war bis zum Schlupf von hohen Verlusten geprägt. Obwohl die Larven bei der anschließenden Anfütterung anfänglich die

Aufnahme der Trockenmischfuttermittel verweigerten und mit gefrorenem Plankton zugefüttert werden mussten, gelang es, einen großen Teil der Charge erfolgreich aufzuziehen. Die Ergebnisse der Untersuchungen deuten auf eine gute Eignung dieser Herkunft hin. Die Fische waren gut konditioniert und gesund. Sie verfügten über eine gute Wachstumsleistung, die allerdings von einer heterogenen Größenverteilung geprägt war. Die nur wenig fortgeschrittene Gonadenentwicklung lässt auf eine ausreichende Spätreife schließen.

Die wesentlichen, in der vorliegenden Untersuchung festgestellten Herkunftsunterschiede sind in der nachfolgenden Tabelle 18 zusammengefasst. Dabei ist anzumerken, dass die Bewertung unter der Einschränkung nicht homogener Stichproben (Anzahl Elterntiere, Anpaarungsschema, Eiqualität, Transportdauer, Schlupfzeitraum) erfolgte.

Tabelle 18: Bewertende Darstellung wichtiger Leistungskriterien der untersuchten Saiblingsherkünfte nach der Aufzucht unter standardisierten Aquakulturbedingungen.

Herkunft	Erbrütungs- erfolg	Anfütterung / Futterakzeptanz (TF)	Wachstum	Futtermitt- wertung	Fitness	Mortali- tät
Ammersee	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Königssee	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Tegernsee	-	-	-	-	O	O
Walchensee	O	-	-	-	O	O
Hintersee	+	O	O	+	O	O
Bodensee	+	O	+	+	O	O
Starnberger See	O	O	O	O	O	O

(+ = überdurchschnittliche Leistung, O = mittlere Leistung, - = geringe Leistung, n.u. = nicht untersucht)

Aus dieser zusammenfassenden Betrachtung wird deutlich, dass die Seesaiblinge aus dem Bodensee unter den gegebenen Beprobungs- und Aufzuchtbedingungen die beste Leistungsfähigkeit zeigten.

3.4 Fotodokumentation

Laichfische



Abb. 14: Laichfisch Hintersee



Abb. 15: Laichfisch Ammersee



Abb. 16: Laichfisch Tegernsee



Abb. 17: Laichfisch Walchensee



Abb. 18: Laichfisch Königssee



Abb. 19: Laichfisch Starnberger See



Abb. 20: Seesaibling Soiernsee



Abb. 21: Seesaibling Seealpsee



Abb. 22: Seesaibling Grünsee



Abb. 23: Laichfischfang auf dem Königssee



Abb. 24: Netzbefischung des Grünsee

Erbrütung



Abb. 25: Separate Erbrütung der Herkünfte in Unterstromkästen



Abb. 26: Eier der Herkunft Ammersee im Augenpunktstadium



Abb. 27: Eier der Herkunft Bodensee im Augenpunktstadium

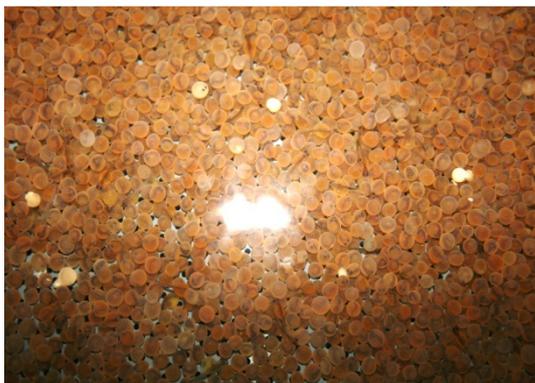


Abb. 28: Eier der Herkunft Hintersee im Augenpunktstadium



Abb. 29: Eier der Herkunft Starnberger See im Augenpunktstadium



Abb. 30: Eier der Herkunft Tegernsee im Augenpunktstadium



Abb. 31: Eier der Herkunft Walchensee im Augenpunktstadium

Anfütterung



Abb. 32: Angefütterte Brut – Herkunft Ammersee



Abb. 33: Angefütterte Brut – Herkunft Hintersee



Abb. 34: Angefütterte Brut – Herkunft Starnberger See



Abb. 35: Angefütterte Brut – Herkunft Tegernsee



Abb. 36: Angefütterte Brut – Herkunft Walchensee



Abb. 37: Angefütterte Brut – Herkunft Bodensee

Aufzucht (ca. 2 g)



Abb. 38: Herkunft Ammersee



Abb. 39: Herkunft Starnberger See



Abb. 40: Herkunft Bodensee



Abb. 41: Herkunft Tegernsee



Abb. 42: Herkunft Hintersee



Abb. 43: Herkunft Walchensee



Abb. 44: Herkunft Königssee

Herkunftsvergleich



Abb. 45: Beckenanlage des Instituts für Fischerei in Starnberg



Abb. 46: Aufzucht in Rundbecken

Beginn des Herkunftsvergleiches (ca. 5 g)



Abb. 47: Juveniler Seesaibling - Herkunft Tegernsee



Abb. 48: Juveniler Seesaibling - Herkunft Walchensee



Abb. 49: Juveniler Seesaibling - Herkunft Hintersee



Abb. 50: Juveniler Seesaibling - Herkunft Bodensee



Abb. 51: Juveniler Seesaibling - Herkunft Starnberger See

Endauswertung

Abb. 52: Tegernsee



Abb. 53: Walchensee



Abb. 54: Hintersee



Abb. 55: Bodensee



Abb. 56: Starnberger See



Abb. 57: Herkunft Tegernsee: Veränderungen an der Milz

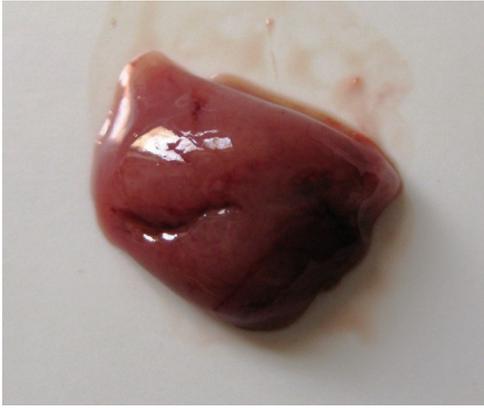


Abb. 58: Leber ohne alimentäre Veränderungen

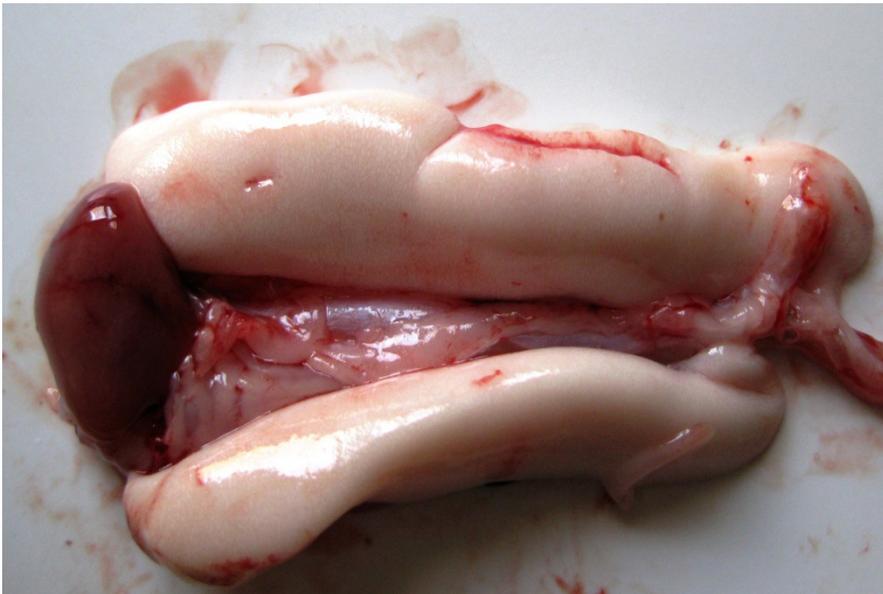


Abb. 59: Gonadenentwicklung eines Milchners der Herkunft Tegernsee zu Versuchsende

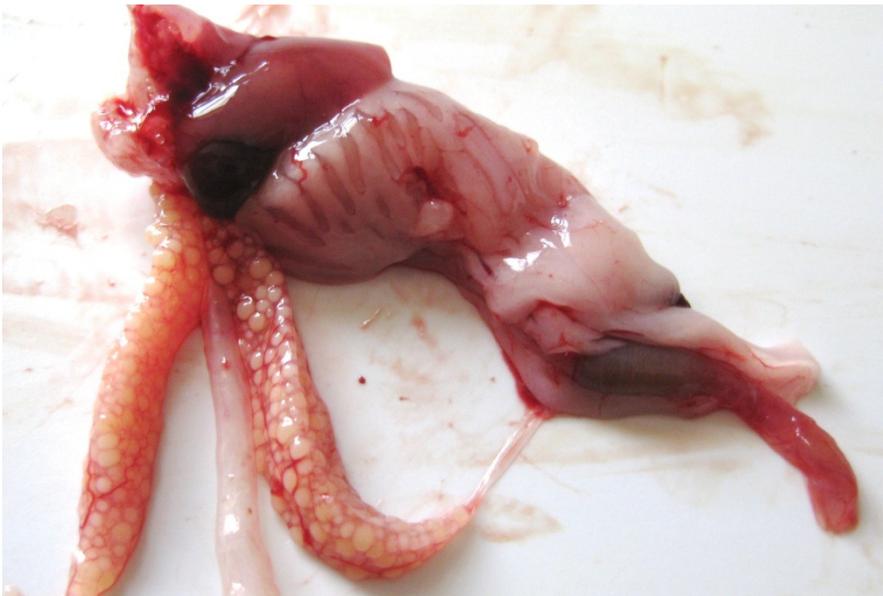


Abb. 60: Gonadenentwicklung eines Rogeners der Herkunft Tegernsee zu Versuchsende

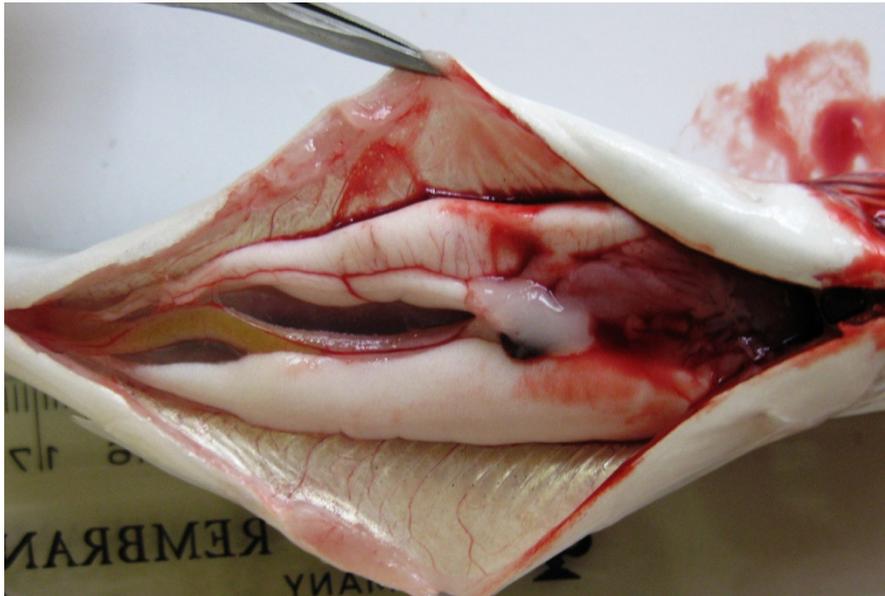


Abb. 61: Gonadenentwicklung eines Milchners der Herkunft Tegernsee



Abb. 62: heterogene Wachstumsleistung der Herkunft Walchensee

4 Berichtsteil II: Untersuchungen zur Genetik

Dr. Ulrich Schliewen, Zoologische Staatssammlung München (ZSM)

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Auswahl der beprobten Populationen

Aus den Befischungen lagen Gewebeproben (Flossenabschnitte) folgender rezenter Wildpopulationen vor: Bodensee, Seealpsee, Ammersee, Starnberger See, Walchensee, Tegernsee, Königssee, Hintersee, Grünsee, Soiernsee. Die Proben aus dem Bodensee und Hintersee stammen nicht aus einer direkten Befischung, sondern wurden aus Brütlingen (Bodensee) und Jährlingen (Hintersee) eines erfolgreichen Laichfischfangs gewonnen. Die Proben des Ammersees, Starnberger Sees, Walchensees, Tegernsees und Königssees stammen direkt von Laichfischfängen, die der Hochgebirgsseen Soiernsee, Grünsee und Seealpsee wurden von adulten Wildfischen außerhalb der Laichzeit gewonnen. Historische Schuppenproben aus der Zoologischen Staatssammlung (ZSM) lagen aus dem Bodensee, Ammersee, Starnberger See, Walchensee, Schliersee, Tegernsee, Königssee und Obersee und Hintersee vor.

4.1.2 Vorbereitung der rezenten Proben

DNA-Extraktion und -Konzentrationsbestimmung. Aus etwa 2 mm² Gewebestücken, der in 96%igem Ethanol p.A. konservierten Flossenschnipsel wurden mit Hilfe des kommerziellen DNeasy Blood & Tissue Kits (Fa. Qiagen) nach Protokollvorgabe DNA extrahiert. Die Konzentration der Extrakte wurde mit Hilfe der NanoDrop[®]-Technologie (Fa. peQLab Biotechnologie GmbH) spektrophotometrisch bestimmt.

DNA-Konzentrationsmessung und -einstellung. Die Konzentration der Extrakte wurde mit Hilfe der NanoDrop[®]-Technologie (ND-1000; Fa. peQLab Biotechnologie GmbH) spektrophotometrisch bestimmt. Da für die AFLP-Technik hochmolekulare DNA verfügbar sein muss, wurden anschließend jeweils 2 µl DNA auf ein 0,8%iges Agarose-Gel (mit Ethidiumbromidanteil) aufgetragen, und unter UV-Beleuchtung darauf hin begutachtet, ob hochmolekulare DNA vorhanden ist. Schließlich wurde die DNA aller hochwertigen Extrakte auf eine einheitliche Konzentration von 25 ng/µl durch Zugabe von H₂O (bidest) eingestellt.

4.1.3 Vorbereitung der historischen Schuppenproben

DNA-Extraktion. Um Kontamination mit moderner Saiblings-DNA zu vermeiden, wurde die Extraktion der historischen Schuppenproben von der Firma Eurofins Medigenomix GmbH (Ebersberg) hauserextern durchgeführt. Diese Firma ist ISO 9001 und ISO 17025 akkreditiert und ein führendes Unternehmen in der DNA-Spurenanalytik für Tiere. Dazu wurden von Seiten der ZSM die 450 Schuppenproben mit anhaftendem Gewebe in den originalen Papiertütchen übergeben und nach einem firmeninternen Protokoll extrahiert.

DNA-Qualitätsbestimmung. Eine direkte Konzentrationsmessung degradierter und gleichzeitig sehr gering konzentrierter DNA-Extrakte ist in der DNA-Spurenanalytik nicht sinnvoll, weil Fremd-DNA, u.a. auch weil durch Bakterien-DNA die organismenspezifische Konzentrationsbestimmung verfälscht werden kann und die DNA-Messgenauigkeit in diesem Bereich mit durchschnittlichen Methoden nicht exakt ist. Die Extrakte wurden deshalb von der Eurofins Medigenomix GmbH auf ihren auswertbaren

DNA-Gehalt mittels RealTime-PCR und SYBR Green[®] und einem bei Seesaiblingen nachweislich funktionierenden Mikrosatelliten-Locus MST85 (ESTOUP et al.,1987) auf ihre Auswertbarkeit mittels PCR-Technologie hin analysiert. Die ermittelten Realtime-PCR-Produktkonzentrationen wurden in einem Excel-Arbeitsblatt dokumentiert. Die 450 Extrakte wurden in zwei Aliquots partitioniert und zusammen mit der Dokumentation an die ZSM zur weiteren Verarbeitung übergeben. Es ergaben sich aber keine deutlichen Korrelationen zwischen der RealTimePCR-Quantität und dem späteren Amplifikationserfolg für 6 Genorte.

4.1.4 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Analyse

Prinzip. Das Verfahren basiert auf der selektiven Vervielfältigung von spezifischen DNA-Fragmenten, die zunächst durch gezieltes Schneiden der genomischen DNA aus den DNA-Extrakten mit so genannten Restriktionsenzymen generiert werden. Das Vorhandensein bzw. Fehlen einzelner Schnittstellen im Genom unterscheidet sich zwischen einzelnen Individuen und Populationen. Im Rahmen dieses ersten Schneideprozesses entsteht allerdings zunächst eine zu große Anzahl von DNA-Einzelfragmenten, die einzeln ansprechbar und damit nicht auswertbar wären. Der Trick bei der AFLP-Technologie besteht darin, dass die anfänglich zu hohe Anzahl der zunächst generierten DNA-Restriktionsfragmente durch eine gezielte Selektion durch zwei selektive Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) Schritte verringert wird, diese wenigen Stücke aber gleichzeitig gezielt vervielfältigt werden, um analysierbare Mengen der ausgewählten Einzelfragmente herzustellen. So entsteht eine immer noch sehr große, aber dennoch unterscheidbare und damit erst auswertbare Anzahl von DNA-Fragmenten, die über das ganze Genom verteilt sind (VOS et al. 1995). Diese Fragmente werden elektrophoretisch auf einem DNA-Sequenzierautomat aufgetrennt und ihre jeweilige Fragmentgröße genau bestimmt. Im Vergleich zu allen anderen Proben wird für jede Probe einzeln festgestellt, welche Fragmente, die im Gesamtdatensatz vorkommen, vorhanden sind oder nicht. So kann für jede Einzelprobe festgestellt werden, welche Fragmente mit anderen untersuchten Individuen und Populationen geteilt werden, bzw. welche Fragmente nur bei einzelnen Individuen und Populationen vorkommen. Aus diesen Gemeinsamkeiten und Unterschieden kann über verschiedene Analysemethoden der Ähnlichkeitsgrad zwischen Individuen und Populationen berechnet werden, der wiederum Rückschlüsse über Verwandtschaftsverhältnisse zulässt.

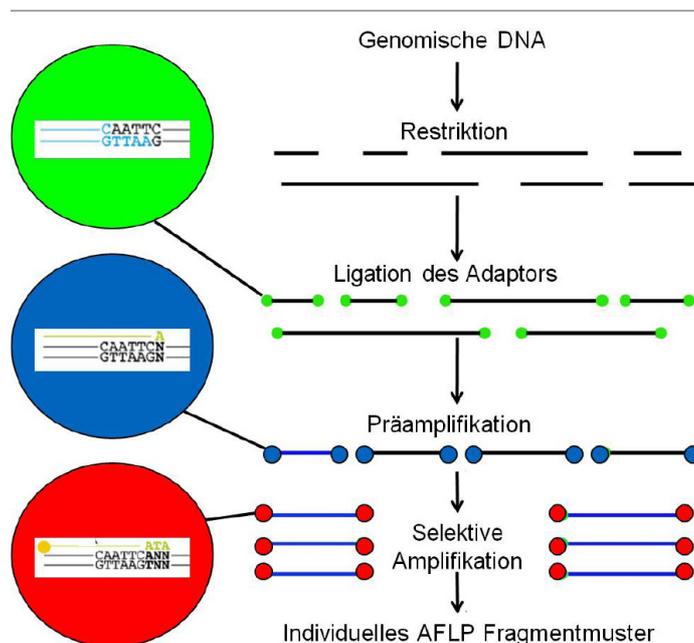


Abb. 63: Schema der AFLP-Reaktionsschritte.

Analyseschritte und Laborprotokolle

Restriktion-Ligation. Das gesamte Genom wird mit den Restriktionsenzymen EcoRI (schneidet selten im Genom) und MseI (schneidet oft) vollständig geschnitten. Jedes Restriktionsenzym hat eine spezifische Erkennungssequenz, die die Schnittstelle im DNA-Strang festlegt und meist aus vier bis acht Basenpaaren besteht. Da die Restriktionsschnittstellen im Genom in der Regel nicht gleichmäßig verteilt sind, erhält man verschiedenen große Fragmente: (1) Lange Fragmente, die an beiden Seiten eine EcoRI-Schnittstelle haben; (2) Sehr kurze Fragmente, die beidseitig von MseI geschnitten wurden; (3) Fragmente, die von beiden Enzymen geschnitten wurden. Nur diese Fragmente werden in der folgenden selektiven PCR vervielfältigt. Die Restriktionsenzyme schneiden die doppelsträngige DNA so, dass Enden entstehen, die wenige Basen lang einzelsträngig sind („sticky ends“). Die Sequenz der Enden ist aufgrund der bekannten Restriktionsschnittstelle immer gleich. Da die Sequenz der „sticky ends“ bekannt ist, kann man synthetische Adaptoren (synthetisch hergestellte, kurze DNA-Stränge, so genannte Oligonukleotide) herstellen, die ebenfalls „sticky ends“ aufweisen und komplementär zu der Schnittstelle sind. Die Adaptoren bestehen also aus der Restriktionsschnittstellen- Erkennungs-Sequenz und zusätzlich noch einem Stück (Core-Sequenz), das für die nun folgende PCR komplementär zu den PCR-Primern ist. Diese Adaptoren lagern sich an die frei liegenden Restriktionsschnittstellen-Enden an (Ligation).

Laborprotokoll: Diese Reaktion wurde in einem Schritt durchgeführt. 2.75 µl DNA und 8.25 µl Mastermix (1.1 µl 10x T4 Ligase Puffer; 0.55 µl NaCl (1 M); 0.55 µl BSA (1mg/ml), 3.97 µl PCR-H₂O; 1 µl Adaptorenpaar MseI (50 pm/µl) mit Sequenz 1: GACGATGAGTCCTGAG und Sequenz 2: TACTCAGGACTCAT); 1 µl Adaptorenpaar EcoRI (5pm/µl) mit Sequenz 1: CTCGTAGACTGCGTACC und Sequenz 2: AATTGGTACGCAGTCTAC; 0.02 µl MseI-Enzym (1U = 0.02 µl); 0.05 µl EcoRI-Enzym (5U = 0.05 µl); 0.015 µl T4Ligase (6 Weiss-Units)) wurden dazu in einem 0.2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach einer kurzen Zentrifugation bei 8000 rpm wurden die Pro-

ben in einem Thermocycler bei 37°C für 2 Stunden und bei 16°C für 8 Stunden inkubiert. Das resultierende Reaktionsprodukt wurde in 39 µl sterilem H₂O verdünnt.

Präselektive Vervielfältigung. Diese erste selektive PCR wird mit Oligonukleotiden (PCR-Primern) durchgeführt, die komplementär zur Core-Sequenz sind, aber zusätzlich ein selektives Nukleotid an einem Ende (3'-Ende) haben. Das selektive Nukleotid reduziert die Fragmentanzahl auf ein Sechszehntel. Unter den nun angewendeten stringenten PCR-Bedingungen werden nur Fragmente, die genau zu den Primern passen, amplifiziert.

Laborprotokoll: 4 µl des verdünnten RL-Produktes und 16 µl Primäramplifikations-Mastermix (je 2 µl DNTP 2mM; 2 µl 10x PCR Puffer; 2 µl MgCl₂ (25mmol); 1 µl präselektive Amplifikationsprimer (EcoRI-A; MseI-C; 0.15 µl Taq-Polymerase (5U/ µl); 8.85 µl PCR-H₂O) wurden in einem 0.2 ml Reaktionsgefäß gemischt und mit 8000 rpm abzentrifugiert, und in einem Thermocycler mit Hilfe der PCR bei folgendem Profil amplifiziert (siehe Abb. 64):

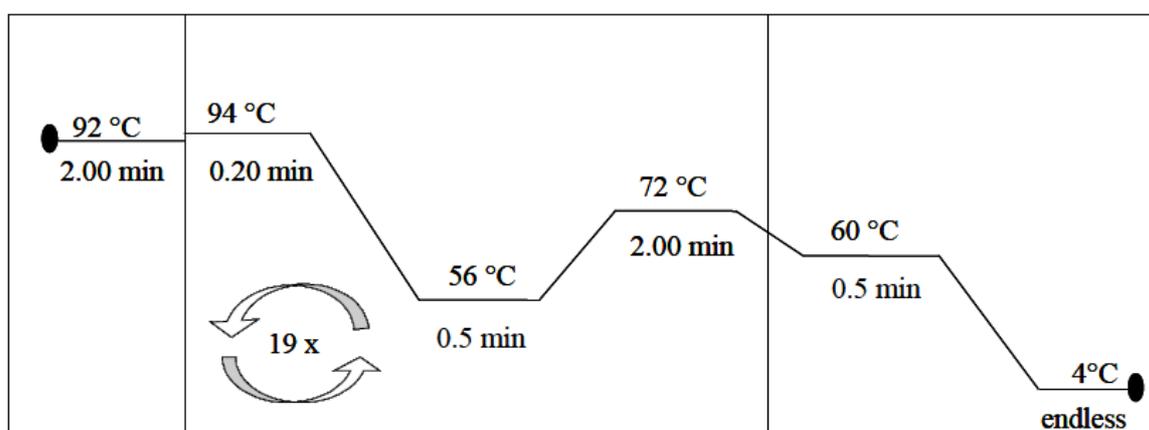


Abb. 64: PCR-Temperaturprofil für die präselektive Amplifikation.

9 µl des resultierenden Präamplifikationsproduktes wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese zur Kontrolle bei 55V und 400mA aufgetrennt (1.5 %, angefärbt mit Ethidiumbromid; Größenstandard 1Kb-Leiter). Erfolgreich prozessierte Proben waren als Schmierbande in einem Größenbereich von 100-1500 bp unter UV-Licht sichtbar. Das übrige Produkt wurde für die folgende selektive Amplifikation in 190 µl H₂O verdünnt.

Selektive Amplifikation. Die zweite selektive PCR-Vervielfältigung reduziert die Anzahl der in der präselektiven Vervielfältigung generierten Fragmente weiter durch die Verwendung von Primern mit zwei zusätzlichen selektiven Nukleotiden. Durch nun insgesamt drei selektive Nukleotide wird schließlich nur noch jedes 256. Fragment aller ursprünglich aus der Restriktion/Ligation stammenden Fragmente vervielfältigt. Der Primer der EcoRI-Schnittstelle wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, um ihn bei der Elektrophorese auf dem Sequenzierautomaten detektierbar zu machen.

Laborprotokoll: 1.76 µl des verdünnten Präamplifikations-Produktes und 8.5 µl Selektiv-amplifikations-Mastermix (je 1 µl DNTP 2mM; 1 µl 10x PCR Puffer; 1 µl MgCl₂ (25mmol); 0.5 µl selektive Amplifikationsprimer (EcoRI-Axx (1 pM), verwendete Primerkombinationen siehe Tab. 1); MseI-Cxx (5 pM, verwendete Primerkombinationen siehe Tab. 1); 0.075 µl Taq-Polymerase (5U/ µl); 4.425 µl PCR-H₂O) wurden in einem 0.2

ml Reaktionsgefäß gemischt. Jeweils einer der beiden selektiven Primer (EcoRI-Primer) wurde mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert, um die Fragmente auf dem automatischen Sequenzierer mit Laser anregen zu können. Insgesamt wurden 14 Primerkombinationen verwendet. Welche Primer mit welchen Farbstoffen markiert wurden ist Tab. 19 zu entnehmen.

Tab. 19: Selektive Primerkombinationen für die AFLP-Genotypisierung. * Primer, die mit einem der beiden Fluoreszenz-Farbstoffe HEX oder FAM markiert wurden. Jeweils aufeinanderfolgende Primerkombinationen wurden gemeinsam in einem Elektrophoreselaufprozessiert, da sie unterschiedlich farblich markiert waren.

Primer-kombination	Primer 1	Primer 2	Farbstoff
1	EcoRI AGG*	MseI CTG	HEX*
2	EcoRI ACA*	MseI CAA	FAM*
3	EcoRI ACT*	MseI CAG	HEX*
4	EcoRI ACC*	MseI CAT	FAM*
5	EcoRI AGG*	MseI CTA	HEX*
6	EcoRI ACA*	MseI CAT	FAM*
7	EcoRI ACT*	MseI CTT	HEX*
8	EcoRI AGC*	MseI CTC	FAM*
9	EcoRI AGG*	MseI CAA	FAM*
10	EcoRI AGC*	MseI CAC	FAM*
11	EcoRI AGG*	MseI CTT	FAM*
12	EcoRI AGC*	MseI CAG	FAM*
13	EcoRI ACT*	MseI CAC	FAM*
14	EcoRI ACC*	MseI CTC	FAM*

Das Reaktionsgemisch wurde mit 8000 rpm abzentrifugiert, und in einem Thermocycler mit Hilfe der PCR bei folgendem Profil amplifiziert (siehe Abb. 65).

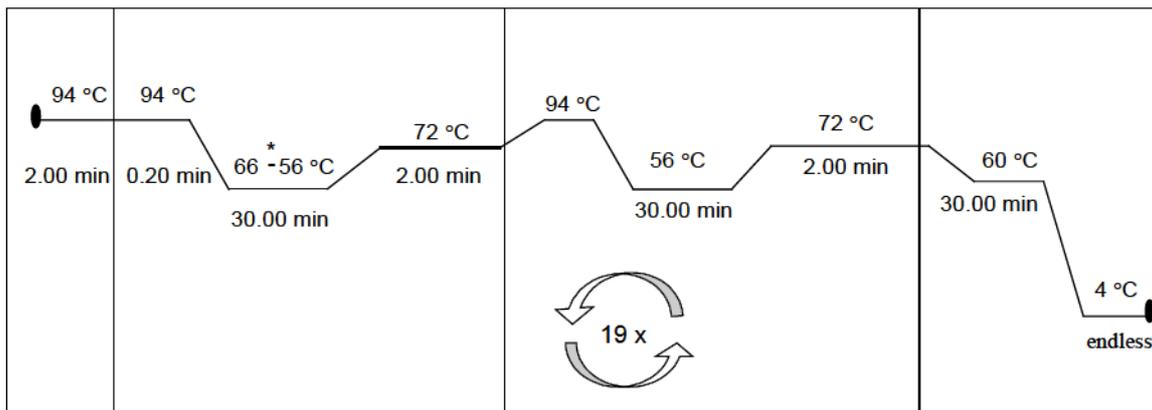


Abb. 65: PCR-Temperaturprofil für die selektive Amplifikation (* Reduktion der Temperatur in 1°C-Schritten von 66°C auf 56°C).

Elektrophorese und Detektion der Fragmente. Die reduzierte Anzahl Fragmente werden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel in einem Kapillar-Sequenzierautomaten elektrophoretisch aufgetrennt. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld durch die Gelmatrix zum Pluspol. Hierbei werden die DNA-Moleküle der Größe nach sortiert, weil sich kleinere Fragmente schneller durch die Poren des Gels bewegen als große Stücke. Die Fluoreszenz-markierten Fragmente werden im automatischen Sequenzierautomaten durch einen Laserstrahl angeregt, ihre Emission detektiert und die Signale in Abhängigkeit vom Zeitpunkt, an dem sie während der Elektrophorese den Laserstrahl passieren mit einer speziellen Software auf ihre Fragmentgröße hin ausgewertet.

Laborprotokoll: Die Größe der selektiven Amplifikationsprodukte wurde auf dem Kapillarsequenzierer AB3130 (Fa. Applied Biosystems) zusammen mit dem Größenstandard ROX 500 XL (Fa. Applied Biosystems) elektrophoretisch unter Nutzung des Sequencer-integrierten Programms Genescan 4.0 (Fa. Applied Biosystems) und Fragmentanalyse-Standardgeräteinstellungen bestimmt. Dazu wurde jeweils 1.75 µl des Produktes jeweils einer Primerkombination mit 6.5 µl Formamid-Lösung (Fa. Amersham) und 0.15 µl des Größenstandards gemischt, bei 95°C für drei Minuten in einem Thermocycler denaturiert und schließlich für 2 min auf Eis abgekühlt.

Qualitätssicherung. Nicht alle Signale, die in Form von so genannten Elektropherogrammen auf dem Sequenzierautomaten abgebildet werden, sind von guter Qualität. Zudem kann es zu Unterschieden zwischen verschiedenen Elektrophorese-Durchgängen kommen, weshalb die Signale verschiedener Durchläufe auf ihre Kompatibilität (Platteneffekt) hin überprüft werden müssen, bevor sie in gemeinsamen populationsgenetischen Analysen verwendet werden. Aus diesen Gründen wird (1) die Elektropherogramm-Qualität durch Beurteilung der Signale im Vergleich zu dem immer vorhandenen Grundrauschen an Signalen hin überprüft. Proben mit z.T. schlechter Datenqualität wurden verworfen. (2) Die beiden getrennten Elektrophorese-Durchläufe (zwei Platten á 96 Proben, auf denen jeweils alle Probestellen gleichmäßig repräsentiert waren) pro selektiver Primerkombination wurden als Replikate behandelt und getrennt analysiert.

Qualitätssicherungs-Protokoll: Elektropherogramme wurden einzeln visuell begutachtet. Solche mit bereits bei der Ansicht subjektiv schlechter Datenqualität (extrem viele unspezifische Banden unter 50 rfu; extrem hohe rfu-Werte bei einzelnen Fragmenten) wurden

sicherheitshalber verworfen. Um die Gefahr zu minimieren, dass benachbarte Fragmentgrößen besonders im Bereich der niedrigen Fragmentgrößen inkonsistent zugeordnet werden, wurden alle Fragmentklassen, die nach dem Binning weniger als 0.25 bp voneinander entfernt lagen, aus dem Excel-Datenblatt entfernt. So wird sichergestellt, dass der Grad an Homoplasie im Datensatz weitgehend reduziert ist. Die Daten aus beiden Replikaten (Platten) wurden getrennt ausgewertet, um den Platteneffekt zu minimieren.

Zuordnung von detektierten Fragmentgrößen zu Allelklassen („Binning“) und Erstellen einer binären Datenmatrix. Bei der Detektion der Fragmentgrößen macht der Sequenzierautomat einen gewissen Fehler, d.h. Fragmenten gleicher Größe können leicht unterschiedliche Fragment-Größenwerte zugeordnet werden. Um diesen Fehler zu minimieren, werden die detektierten Fragmentgrößen aller Proben zusammengefasst und auf ihre Zuordnung zu einer Fragment-Größenklassen hin analysiert („Binning“). Da einzelne Fragmente sich in ihrer Größe minimal durch einen Unterschied von genau einer Basenlänge unterscheiden müssen, werden Fragmente, die nach einem objektiven Kriterium nicht eindeutig von Nachbarfragmenten der nächst höheren oder –niedrigeren Größe zu unterscheiden sind, entfernt, bevor eine binäre Datenmatrix erstellt wird. Die finale Datenmatrix ist eine 0/1 Matrix, die für jedes Individuum das Vorhandensein oder Fehlen eines Fragmentes nach qualitätssichernder Bereinigung der Primärdaten wiedergibt.

Binning-Protokoll: Die Primärdaten wurden im Auswertungsprogramm Genemapper 4.0 (Fa. Applied Biosystems) mit einer minimalen Detektionsschwelle von 50 rfu (relative Fluoreszenzeinheiten) für die Fragmente und 10-50 rfu für den Größenstandard festgelegt. Fragmente wurden automatisiert in diesem Programm als zu einer Größenklasse zugehörig analysiert, wenn sie nicht mehr als 0.65 bp in den absoluten Fragmentlängen auseinander lagen. Die resultierenden Daten wurden schließlich in ein Excel-Datenblatt exportiert.

4.1.5 Mikrosatellitentypisierung

Prinzip. Mikrosatelliten, ursprünglich „simple sequence repeats“ (SSR) genannt, sind hochpolymorphe DNA-Abschnitte, die über das gesamte Kerngenom verteilt sein können. Sie bestehen aus tandemartig wiederholten Einheiten von 2-5 bp langen DNA-Motiven und können im Säugetiergenom an bis zu 10^6 Genorten (Loci) vorliegen (TAUTZ, 1993). Aufgrund des repetitiven Aufbaus der Mikrosatelliten kann es bei der DNA-Replikation natürlicherweise zu einem so genannten Stotterbanden („slippage“) kommen, einer Fehlpaarung der beiden DNA-Stränge, und somit zu einer Veränderung der Länge des Mikrosatelliten (LEVINSON UND 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. Die Mikrosatelliten-Genotypisierung dient dazu, diese Längenpolymorphismen (Allele) zu detektieren, und sie sich so für die populationsgenetische Fragestellungen zu Nutze zu machen. Mittels der PCR werden die Mikrosatelliten amplifiziert und anschließend auf einem Sequenzierautomaten elektrophoretisch aufgetrennt. 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 Motive. Man findet auch zusammengesetzte Mikrosatelliten aus verschiedenen Wiederholungseinheiten und unterbrochene Mikrosatelliten, bei denen das Wiederholungsmotiv von einer nicht-repetitiven Abfolge von DNA-Basen unterbrochen ist. Unterbrochene Loci sind oft stabiler und damit weniger variabel als rein repetitive Mikrosatelliten. Mutationen in den Primerregionen, d.h. den Regionen an denen die PCR angreift, um den jeweiligen Locus zu amplifizieren,

können dazu führen, dass bestimmte Allele nicht amplifiziert werden (Nullallele) und somit fälschlicherweise ein Überschuss an Homozygoten erhalten wird. Auch schlechte DNA-Qualität, wie sie z.B. bei historischen oder forensischen Proben vorliegt, kann zu Nullallelen führen. Dies kann zu falschen Schlussfolgerungen bezüglich der Populationsstruktur führen, weswegen mit populationsgenetischen Methoden auf ein Heterozygotendefizit getestet wird. Um Schlussfolgerungen über die genetische Struktur von Populationen anhand von Mikrosatellitendaten ziehen zu können, ist es auch wichtig, die zugrundeliegenden Mutationsprozesse dieser DNA-Abschnitte zu verstehen.

Analyseschritte und Laborprotokolle

PCR-Amplifikation (7 Primerpaare). Im vorliegenden Projekt wurden sieben Mikrosatelliten-Genorte verwendet, die sich bereits in früheren Studien als für Seesaiblinge hochpolymorph herausgestellt hatten, und für die bereits PCR-Laborprotokolle entwickelt worden waren (BRUNNER et al., 1998; ENGLBRECHT et al., 2002). Einer der beiden Primer wurde zur Detektion mittels Laseranregung auf dem automatischen Sequenzierer mit einem der beiden Farbstoffe FAM oder HEX markiert. Die sieben Genorte wurden nach vorhergegangenen Tests in nur drei zusammengefassten Reaktionen (Multiplex-Reaktionen) mittels PCR amplifiziert und anhand der unterschiedlichen Fragmentlängen und Farbstoffmarkierungen im Sequenzierer elektrophoretisch aufgetrennt.

Tab. 20: Verwendete Mikrosatellitenloci, PCR-Primer und Multiplex-Kombinationen.

Locus	Multiplex	Primer	Quelle
MST-85	1	5' FAM-GGAAGGAAGGGAGAAAGGT 5' GGAAAATCAATACTAACAA	PRESA UND GUYOMARD, 1996
Sa72ZIM	1	5' HEX-AACTTCAAGATATATGATGT 5' ATTCGTTTAGTCTGAGAA	ENGLBRECHT et al., 2002
Sfo-8	2	5' HEX-CAACGAGCACAGAACAGG 5' CTTCCCCTGGAGAGGAAA	ANGERS et al., 1995
Ssa-85	2	5' FAM-AGGTGGGTCCTCCAAGCTAC 5' GTTTCTTACCCGCTCCTCACTTAATC	O'REILLY et al., 1996
Omy21	2	5' HEX-GCATTGGCGTAATGAGAAGG 5' CTGACGGACATATCAGCCC	DANZMANN et al., 2005
CoCl-3	3	5' HEX-AGTGTAATAAATCACCCGAG 5' GTTTCAGGTTTGGTAAGCAAG	BERNATCHEZ, 1996
Sfo-23	3	5' HEX-GTGTTCTTTCTCAGCCC 5' AATGAGCGTTACGAGAGG	ANGERS et al., 1995

Laborprotokoll: Als Grundlage für die Mikrosatelliten-Amplifikation wurde das Multiplex-PCR-Kit (Fa. Qiagen), das speziell für die Multiplex-PCR mehrerer Mikrosatellitenloci entwickelt wurde. Für jede Reaktion wurde in einem Reaktionsvolumen von 10 µl folgende Bestandteile zusammengeführt: 1 µl des DNA-Extraktes, 1 µl Q-Solution aus dem Kit, 5 µl des Multiplex-Mastermixes, sowie jeweils 0,5 µl Primer. PCR-Wasser wurde je nach Multiplex-Primerkombination bis zu dem Gesamtvolumen von 10

µl aufgefüllt. Alle Reaktionen wurden unter den gleichen Temperaturprofilen im Thermocycler prozessiert: anfänglich 15' bei 95°C; darauf 39 Zyklen aus: Denaturierung 30'' 94°C, 90'' Annealing bei 55.6°C, 90'' Elongation bei 72°C; abgeschlossen wird das Profil mit einer finalen Elongation von 10' bei 72°C, bevor das Produkt auf unbestimmte Zeit auf 10°C heruntergekühlt wird.

Elektrophorese und Detektion der Fragmente. Die Mikrosatelliten-Fragmente wurden wie bei der AFLP-Electrophorese beschrieben aufgetrennt und detektiert.

Qualitätssicherung. Nicht alle Elektropherogramme enthielten Signale, die eindeutig als „slippage“-Stotterbanden identifizierbar waren, wie sie typisch für Dinukleotid-Mikrosatelliten sind. In einem subjektiven Qualitätsscreen wurde diese aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Der Locus Omy21INRA erbrachte im Ganzen keine reproduzierbaren Ergebnisse, enthielt offensichtlich Amplifikationsprodukte mehrerer Genorte und wurde deshalb von der weiteren Primärdaten- und Folgeanalyse ausgeschlossen. Für die endgültige Datenanalyse der Amplifikate aus historischen Schuppenproben wurden nur solche Elektropherogramme verwendet, die in zwei unabhängigen PCRs (Duplikat-Versuche) die gleichen eindeutigen Elektropherogramme ergaben. Zur Qualitätssicherung wurden bei der Primärdatenanalyse jeweils beide Replikate begutachtet und das Replikat mit der höheren Fluoreszenzintensität bei der Beurteilung der Fragmentgrößen (s.u.) bevorzugt.

Zuordnung von detektierten Fragmentgrößen zu Allelklassen („Binning“) und Erstellen einer binären Datenmatrix. Auch bei der Mikrosatelliten-Fragmentanalyse macht der automatische Sequenzierer einen gewissen Fehler. Dieser wird analog zur Vorgehensweise bei der AFLP-Analyse bei der Primärdatenanalyse berücksichtigt, bevor Fragmente als homozygot für ein Fragment bestimmter Größe oder als heterozygot Allele klassifiziert werden können.

Binning-Protokoll: Die Elektrophoresedaten wurden zunächst mit einer minimale Detektionsschwelle von xxx rfu (relative Fluoreszenzeinheiten) für die Fragmente und xx-xx rfu für den Größenstandard auf distinkte Peaks hin analysiert, und allen angesprochenen Fluoreszenzpeaks wurde eine Fragmentgröße zugeordnet. Diese Primärdaten wurden daraufhin in das Auswertungsprogramm Genemapper 4.0 (Fa. Applied Biosystems) importiert, um automatisiert ein „Binset“ mit den Analyseparametern XXX zu erstellen, d.h. über alle Fragmente hinweg wurde Allelklassen für das gesamte Datenset festgelegt. Innerhalb des Programms wurden daraufhin manuell jedes einzelne Elektropherogramm manuell überprüft („nachgeklickt“), um so ein oder zwei Fluoreszenzpeaks als Allel 1 und Allel 2 anzusprechen, weil die automatische Detektion wegen unterschiedlicher Fluoreszenz-Peakhöhen besonders bei den historischen Schuppenproben nicht zuverlässig war. Waren die Elektropherogramme der Stotterbanden durch einen einzigen höchsten Peak charakterisiert, die nach beiden Fragmentgrößen hin von kontinuierlich niedriger werdende Stotterpeaks umgeben waren, wurde dieser eine Peak als homozygoten Allelpaar definiert. Gab es einen identisch großen zweiten Nachbarpeak oder zwei hohe Peaks, die jeweils von niedrigeren Nachbarpeaks umgeben waren, so wurden diese als zwei getrennte Allele gewertet (heterozygoten Allelpaar). Die resultierenden Daten wurden schließlich in ein Excel-Datenblatt zur weiteren Analyse exportiert. Dieses Excel-Datenblatt enthält nicht diskrete Allellängen, die mit Hilfe des Programms TANDEM 1.08 (MATSCHNER UND SALZBURGER, 2009) zu diskreten Fragmentgrößen typischer Dinucleotid-Repeats transformiert werden. Dies geschieht so, dass der Rundungsfehler minimiert wird.

4.1.6 Datenauswertung

Die populationsgenetische Differenzierung mehrerer Populationen einer Art oder auch mehrerer sehr nah verwandter Arten kommt dadurch zustande, dass genetische Merkmale nicht gleich verteilt sind, weil der Genfluss zwischen ihnen reduziert ist. Dies kann durch räumliche, ökologische oder auch ethologische Trennung geschehen. Besonders in kleinen isolierten Populationen sterben durch stochastische Effekte (Gendrift), aber auch durch Selektion und Mutation einzelne genetische Merkmale (Allele) eines Genortes aus, während andere im Vergleich zu anderen Populationen über- oder unterrepräsentiert sind und sich sogar fixieren können. Dies liegt daran, dass in großen einheitlichen Populationen theoretisch freier Austausch zwischen Genen aller Individuen (Panmixie) herrscht und es kurzfristig unwahrscheinlich ist, dass sich Allelfrequenzen verschieben.

Alle populationsgenetischen Methoden zur Beschreibung und Analyse der Populationsstruktur vergleichen die Allelausstattung eines Individuums mit der der gesamten Population und der einzelner Subpopulationen.

4.1.7 Statistische Auswertung

4.1.7.1 Populationsgenetische Analysemethoden

Deskriptive Statistik. Die Beschreibung der genetischen Rohdaten beinhaltet als Grundlage für alle weiteren statistischen Analysen sowohl für die AFLP-Daten (0/1-Zustände) als auch für die Mikrosatelliten (Allel-Fragmentlängen oder Repeateinheiten) die Genotypenmatrix, die Anzahl Fragmente/Allele pro Population und über alle Populationen. Die zugrundeliegenden Genotypenmatrices (Rohdaten) werden diesem Bericht nicht beigelegt, wohl aber Allelfrequenz-Histogramme für jeden Genort und jede Population, sowie über alle Populationen hinweg, die einen ersten Eindruck über die Datenstruktur vermitteln.

F-Statistik. Diese machen sich populationsgenetische Grundannahmen zu eigen, in dem sie die Abweichung von dem in panmiktischen Populationen herrschenden Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überprüfen. Dies geschieht, in dem sie Heterozygotie-Grade der untersuchten Individuen und Subpopulationen in Abhängigkeit der erwarteten Heterozygotie im Gesamtdatensatz vergleichen. WRIGHT (1965) hat diese Zusammenhänge quantifiziert, in dem er die verschiedenen Heterozygotie-Kennwerte zueinander in Beziehung gesetzt hat. Für das Ausmaß an Populationsstruktur ist der Fixierungsindex, kurz F_{ST} -Wert, ausschlaggebend, der sich aus folgender Formel ergibt:

$$\text{Fixierungsindex } F_{ST} = (H_e - H_o) / H_e$$

H_e : Heterozygotie, die man bei einem Individuum einer entsprechenden Gesamtpopulation erwarten würde

H_o : Heterozygotie, die man bei einem Individuum einer Subpopulation erwarten würde.

Ein hohes Maß an Genfluss, bzw. eine gering ausgeprägte Populationsstruktur bedeutet niedrige Werte. F_{ST} -Werte sind dimensionslos und deshalb nur aussagekräftig im direkten Vergleich mit Vergleichswerten aus dem Gesamtdatensatz. Abhängig vom verwendeten Markertyp und auch von der Art der Stichprobe wurden F_{ST} -Analoge und Teststatistiken entwickelt, die z.T. im vorliegende Bericht Verwendung finden, aber außer der namentlichen Erwähnung mit Quelle aus Platzgründen nicht weiter erläutert werden können. H_e und H_o für jeden Mikrosatelliten-Genort und für jede Population (historisch und rezent) wurde mit dem Programm Arlequin 3.5.1.2 berechnet (EXCOFFIER et al., 2005).

Analyse der molekularen Varianz (AMOVA). Unabhängig von populationsgenetischen Annahmen (Genfrequenzen in Abhängigkeit vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht), lässt sich die Variabilität der genetischen Markervielfalt auch über die Partitionierung dieser Variabilität im Vergleich Individuum – Subpopulation – Gesamtpopulation beschreiben. Aus dem Genotyp und Genotypfrequenzen (nicht Allelfrequenzen) jedes einzelnen Individuums über alle Genorte und dem Unterschied zwischen dem allelischen Anteil einzelner Genotypen wird in diesem Verfahren eine euklidische quadrierte Distanzmatrix erstellt. Umfang und Signifikanz der Kovarianz zwischen den Genotypendistanzen und dem untersuchten Level an genetischer Struktur (Individuum, Subpopulation, Gesamtpopulation) wird mit Hilfe von nicht-parametrischen Permutationstests statistisch ermittelt (EXCOFFIER et al., 1992, 2005). Man erhält so Informationen darüber, welcher Anteil der Gesamtvarianz im Datensatz durch interindividuelle oder (sub)populationsspezifische Varianz erklärt wird. Weil diese Art der Betrachtung weitgehend annahmefrei ist, lässt sie sich sowohl für Mikrosatelliten als auch für AFLPs anwenden. Man erhält so Informationen darüber, welcher Anteil der Gesamtvarianz im Datensatz durch interindividuelle oder (sub)populationsspezifische Varianz erklärt wird.

Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse mit dem Neighbour-Joining (NJ)-Verfahren. Ähnlich der bekannten UPGMA-Clusteranalyse ist das NJ-Verfahren eine mathematische Methode, die die Ähnlichkeit von Individuen oder Populationen in einer Baum- oder Netzwerkstruktur zu überführt und so auch visuell erfassbar macht (SAITOU UND NEI, 1998). Der Berechnung der Distanzen erfolgt schrittweise nach dem „Minimum-Evolution“-Prinzip, d.h. der Baum oder das Netzwerk wird nicht direkt aus den Distanzen errechnet, sondern so, dass zunächst zwei ähnliche Genotypen gruppiert werden, und aus der Distanz dieses Paares zu weiteren Genotypen der nächst ähnliche dazu gruppiert wird, usw. Der Nachteil einer rein zweigabeligen Baumdarstellung ist aber, dass alternative Verzweigungsmuster, nicht gleichzeitig dargestellt werden, und so möglicherweise wichtige Ähnlichkeitsinformationen und Konflikte im Datenset unberücksichtigt bleiben. Dieser Nachteil kann in einer Netzwerkdarstellung aufgehoben werden, die mehrere Verbindungen von einem zu nächsten Genotypen abbildet. Ähnliche Genotypen bleiben beieinander gruppiert, aber anhand der Länge gemeinsamer Äste (korreliert mit der Anzahl Gemeinsamkeiten einer Gruppe) bzw. der durch multiplen Verzweigungen visualisierten Alternativähnlichkeiten können Art und Signifikanz hypothetischer Verwandtschaftsverhältnisse abgeschätzt werden. Die Netzwerkdarstellung macht nur bei einer großen Anzahl von Markern Sinn, weshalb diese Analyse nur für die AFLP-Daten angewendet wurde. Hierzu wurden die 0/1-Matrix in das Program SplitsTree vers. 4.11.3 (HUSON UND BRYANT, 2006) importiert und mit den default-Einstellungen in einem NJ-Netzwerk visualisiert:

Multivariate Verfahren zur Projektion komplexer Daten auf reduzierte Faktoren. Die Varianz komplexer Datensätze kann mathematisch auf wenige jeweils voneinander unabhängige Hauptfaktoren zurückgeführt werden, ohne dass dazu populationsgenetische Annahmen nötig wären. Dazu bedient man sich sogenannter planarer Projektionsmethoden, die den größeren Teil der Gesamtvarianz z.B. in 2- oder 3-dimensionale Plots wiedergeben. Die errechneten Varianzfaktoren für Individuen oder Populationen werden unabhängig von einem evolutionären Modell so dargestellt, dass Individuen mit ähnlichem Anteil an der Gesamtvarianz im Datenset in räumlicher Nähe („im Hyperraum“) positioniert sind. Solche Verfahren bieten sich wegen der komplexen Datenstruktur für die Analyse individueller Genotypen, die aus hunderten bis tausenden Allelen (AFLPs) oder aus relativ wenigen Allelen aber mit vielen allelischen Zuständen (Mikrosatelliten) bestehen, an. Für die Analyse der Mikrosatellitendaten wurde zur analytischen Reduktion der Datenvarianz

die eine besondere Form der Hauptkomponenten-Analyse verwendet (PCoA und MDS). Diese ist zur optimierten Darstellung von Distanzen besonders geeignet, weil sie im Gegensatz zur Hauptkomponentenanalyse auch kategoriale Daten verwerten kann, wie für Mikrosatellitenallele typisch. Aus den AFLP-Genotypdaten wurden dazu zunächst im Programm FAMD vers.1.5.2.5 (SCHLÜTER UND HARRIS, 2006) populationspezifische Cavalli-Sforza-Distanzen (CAVALLI-SFORZA UND EDWARDS, 1967) berechnet, um diese dann in mittels der PCoA in FAMD abzubilden. Für die Mikrosatelliten-Daten wurde die Genotypen-Datenmatrix in das Programm 4.05 Genetix (BELKHIR et al., 1996-2004) importiert, um diese in eine 0/1/2-Matrix (0: nicht vorhanden, 1: heterozygot, 2: homozygot) zu transformieren. Aus den individuellen Genotypendaten wurden im gleichen Programm populationspezifische Mediane berechnet und die deren Distanzen zueinander mittels PCoA visualisiert.

Statistische Tests für die Zuordnung von individuellen Genotypen zu Populationen.

Genotypen von Individuen aus verschiedenen Populationen sind nicht notwendigerweise populationspezifisch, sondern können aufgrund der Datenqualität, durch Vermischung mit anderen Populationen nur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit einer bestimmten Anzahl von Populationen zugeordnet werden. Im Gegensatz zur F-Statistik und zur AMOVA kann auch ohne vorherige Klassifizierung rein anhand der Datenstruktur im Gesamtdatensatz evaluiert werden, ob und wie viele Populationseinheiten bei gegebenen Daten nach populationsgenetische Kriterien unterscheidbar sind. Gängigerweise werden die Daten daraufhin kritisch überprüft, ob (1) bei gegebenen Daten eine Populationsstruktur in einer Anzahl von Einheiten (K) überhaupt wahrscheinlich ist; und wenn ja, (2) wie wahrscheinlich individuellen Genotypen der evaluierten Anzahl von Populationseinheiten (K) zugeordnet werden können. Für derartige Zuordnungstests sowohl für Mikrosatelliten- als auch für AFLP-Daten wird das bewährte Programm *structure* vers. 2.3.2 (PRITCHARD et al., 2000) verwendet, das die Populationsstruktur auf der Basis von populationsgenetischen Annahmen (Genorte im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht innerhalb der K Populationen, unverbundene Loci) berechnet. Dabei kommt das statistische Grundprinzip ist das von einer Bayesianische Clustermethode. Die Auflösungskraft der Methode ergibt sich aus der Anzahl der untersuchten Genorte, der allelischen Diversität zwischen den Populationen, der Anzahl der Individuen. Deshalb ist a priori zu erwarten, dass mit einer hohen Anzahl von AFLP-Loci mehr Populationsstruktur als mit Mikrosatelliten erkannt wird, und die Zuordnungswahrscheinlichkeiten im AFLP-Datensatz höher liegen (PRITCHARD et al., 2000).

- (1) Abschätzung von K : Hier folgen wir der Methode von (EVANNO et al., 2005), die als Grundlage für die Entscheidung, welches K für die folgenden Zuordnungstest herangezogen werden sollte, folgendes Prinzip verwendet: Es wird für verschiedene K jeweils 30 Analysedurchläufe durchgeführt, und daraus berechnet, welche Wahrscheinlichkeit (posterior probability) das K bei gegebenen Datensatz im Mittelwert (aus 30) annimmt. Analoge Läufe werden mit höheren und niedrigeren K -Werte durchgeführt, und die Mittelwerte nach einem definierten Algorithmus miteinander vergleichen (ΔK). Das wahrscheinlichste K ist durch den höchsten Modalwert von ΔK definiert (Details siehe EVANNO et al. (2005)).
- (2) Für die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten, mit der ein Individuum zu einem der vorher bestimmten K Populationen zugeordnet wird, wurden folgende Einstellungen gewählt: burnin AFLPs 40.000; Mikrosatelliten 30.000; MCMC repeats (Generations) bei AFLPs 200.000, bei Mikrosatelliten 100.000; jeweils 30 paralleler Läufe bei beiden Analysen, ohne vorgegebene Populationsstruktur.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Untersuchte Hypothesen

Aus der Einleitung und den vorangegangenen Arbeiten zur Genetik deutscher Seesaiblings-Populationen ergeben sich zwei übergeordnete Hypothesen, die im Rahmen der Dokumentation und Analyse natürlicher aquatischer Ressourcen im Kontext kritisch überprüft werden sollten. Die Überprüfung der genetischen Hypothesen zur Aquakulturrelevanz natürlicher aquatischer Ressourcen wurde möglich, weil die natürlich evolvierte Situation mit der aktuellen Situation der Seesaiblings-Bestände untersucht wurde. Die rein genetischen Hypothesen, die teilweise nicht unabhängig voneinander betrachtet werden können, sind folgende:

Hypothese 1: *Rezente Populationen mit nachweisbarem Populationseinbruch und/oder historisch nicht nachweisbarem anschließendem Wiederaufbau unterscheiden sich genomisch kaum voneinander, aber signifikant und stark von ihren historischen Gegenstücken: Starnberger See, Ammersee, Tegernsee. Die wieder aufgebauten Populationen weisen u.a. Ähnlichkeiten mit den Populationen Hintersee und Bodensee auf, da diese als natürliches Reservoir für Wiederaufbaumaßnahmen zur Verfügung stehen. Die Verwandtschaft von Populationen, die nicht von Populationszusammenbrüchen betroffen waren (Bodensee, Ammersee, Walchensee, Königssee, Hintersee) zeigen auch rezent ein Verwandtschaftsmuster / Ähnlichkeit zueinander, das dem Flusssystem bzw. der räumlichen Nähe zueinander entspricht.*

Begründung: Die Populationen des Starnberger Sees, Tegernsees und Ammersees erlitten in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts einen massiven Zusammenbruch durch Eutrophierung. Diese Populationen wurden mit Besatzmaterial wahrscheinlich ähnlicher Herkunft wieder aufgebaut. Die persistierenden, ursprünglichen Populationen der Voralpenseen wurden nacheiszeitlich über deren Vorfluter besiedelt, d.h. Seen aus dem gleichen Vorflutersystem sollten auch mit ähnlichen Seesaiblingsstämmen besiedelt worden sein.

Hypothese 2: *Künstlich besiedelte Seen weisen ein Verwandtschaftsmuster mit anderen untersuchten Seen auf, das eine Ähnlichkeit zu wiederaufgebauten Populationen widerspiegelt.*

Begründung: Die Hochalpengseen Grünsee und Soiernsee, sowie der Walchensee sind nach verschiedenen Angaben erst in historischer Zeit mit Seesaiblings unterschiedlicher Herkunft besetzt worden. Der Walchensee ist nach historischen Angaben erst Anfang des 16. Jahrhunderts mit Saiblings besetzt worden. Der Grünsee ist bereits in historischer Zeit aus dem Königssee-System heraus besetzt worden. Besatz und Bewirtschaftung des Soiernsees wird und wurde vom Institut für Fischerei in Starnberg aus dort vorhandenen Stämmen durchgeführt.

4.2.2 Analyseergebnisse

4.2.2.1 Auswertbare Proben

Für die Analyse der rezenten Proben wurden insgesamt 263 für die Typisierung mit 6 Mikrosatelliten und 192 (inkl. Replikate) für die AFLP-Typisierung ausgewählt. Nicht berücksichtigt wurde die einzelne rezente Probe aus dem Seealpsee, weil mit dieser niedrigen Stichprobenzahl keine populationsgenetischen Berechnungen möglich sind. Für die Typisierung mit der AFLP-Methode wurden insgesamt 192 Proben (davon 8 Replikate) verwendet, von denen nach Überprüfung der Datenqualität insgesamt 171 Proben (ohne

Replikate) in die finale Analyse Eingang fanden (detaillierter Probenumfang siehe Tab. 21). Aus den 450 historischen Schuppenproben wurden für die finale Analyse die 182 Proben ausgewählt, die für alle sechs untersuchten Mikrosatelliten-Genorte auswertbare Elektropherogramme erbrachten und in den repräsentativ untersuchten Replikaten reproduzierbare Ergebnisse lieferten. Da die DNA-Qualität der historischen Proben sehr heterogen war, konnten nicht alle Seen in den historisch-rezenten Vergleich einbezogen werden, sondern nur der Ammersee, Starnberger See, Tegernsee und Walchensee, sowie zu phylogeographischen Vergleichszwecken der Schliersee und nur eine Probe aus dem Hintersee. Historische Proben des Bodensees waren vorhanden, wurden aber nicht berücksichtigt, weil nach BRUNNER et al. (1998) die Seesaiblingspopulationen des Bodensees sehr heterogen sind und deshalb ein historisch-rezenter Vergleich ohne genaue Herkunftsdaten der historischen Proben keinen Sinn macht.

Tab. 21: Finaler Probenumfang für die Mikrosatelliten und AFLP-Genotypisierung.

See	Gewässersystem	Proben AFLPs (ex 192)	Proben Mikrosatelliten rezent/historisch
Bodensee	Rhein	15	24/-
Ammersee	Amper/Isar/Donau	16	29/13
Starnbergersee	Isar-Amper//Donau	17	30/60
Walchensee	Isar/Donau	21	30/25
Tegernsee	Mangfall/Inn/Donau	18	33/8
Schliersee	Mangfall/Inn/Donau	-	-/7
Königsee	Salzach/Inn/Donau	20	31/36
Obersee	Königsee/Salzach/Inn/Donau	-	-/32
Hintersee	Salzach/Inn/Donau	24	29/1
Soiernsee	Hochgebirgssee	21	27/-
Grünsee	Hochgebirgssee	19	30/-
Probenumfang gesamt		171	263/182 (=445)

4.2.2.2 AFLP –Daten

4.2.2.2.1 Deskriptive Statistik

AFLP-Daten für 192 Individuen wurden in zwei Replikaten mit jeweils einer restriktiven Primerkombination generiert und auf ihre Datenqualität überprüft. Die Alledaten aller amplifizierter Individuen für alle 14 Primerkombinationen sind vor und nach dem Qualitätscheck und Korrektur in Tabelle 22 zusammengefasst. Insgesamt gingen 171 Individuen in die Analyse ein, es konnten 2034 und 1798 Loci analysiert werden. Die mittels AFLPs gewonnenen Daten stellen somit eine wesentlich repräsentativere Auswahl im Vergleich zu den 6 Mikrosatelliten-Loci dar.

Tab. 22: Anzahl Allele vor und nach der Korrektur (siehe „Binning Protokoll“ unter 3.10.4), Anzahl prozessierte Individuen (N Ind. auf Replikate) und Anzahl analysierter Individuen nach Qualitätscheck (N Ind. in Analyse).

Replikate 1		
	N Allele generiert	2286
	N Allele nach Korrektur	2034
	N Ind. auf Replikate I	96
	N Ind. in Analyse	88
Replikate 2		
	N Allele generiert	2204
	N Allele nach Korrektur	1798
	N Ind. auf Platte II	96
	N Ind. in Analyse	83

Analysis of Molecular Variance

Die AMOVA bestätigt die höhere Auflösungskraft für Populationsunterschiede der AFLP-Daten. Etwa der doppelte Anteil der Varianz bei beiden Replikaten (18.53%, 19.14%) wird im Vergleich zur Mikrosatellitenanalyse durch Unterschiede zwischen rezenten Populationen erklärt. Der weitaus größte Teil Anteil von 81.95% bzw. 80.86% wird aber über populationsinterne Unterschiede (inkl. individuelle Varianz) erklärt (Tab. 23), wobei für AFLP-Daten im Programm Arlequin keine individuellen Varianzanteile berechnet werden kann. Die AMOVA-Ergebnisse sind wegen der unterschiedlichen Probengrößen pro Populationen nicht direkt mit den Mikrosatellitendaten vergleichbar, zeigen aber an, dass auch bei den AFLPs ein substantieller Anteil der allelischen Diversität durch Populationsunterschiede erklärt werden kann.

Tab. 23: Prozentanteil erklärter Varianz im AFLP-Datensatz (Replikate 1 und 2) inkl. Angabe der Freiheitsgrade (df).

Replikate	Varianz	df	% Varianz
1	zwischen Populationen	8	18.53
	innerhalb von Populationen	79	81.47
	zwischen Individuen	k.a.	k.a.
	gesamt	87	
2	zwischen Populationen	8	19.14
	innerhalb von Populationen	87	80.86
	zwischen Individuen	k.a.	k.a.
	gesamt	95	

4.2.2.2.2 F-Statistik

Die F-Statistik, die mit ihrem F_{ST} -Kennwert nach populationsgenetischen Kriterien den Grad an Populationstruktur anzeigt, ergibt, dass für mehrere paarweise Vergleiche zwischen Populationen kein signifikanter F_{ST} -Wert kalkulierbar ist. Unter den nicht zu differenzierenden, rezenten Populationen sind die vor allem Vergleiche mit dem Hintersee oft nicht signifikant, interessanterweise auch ein Vergleich mit dem Bodensee. Es ist bei diesen Vergleichen allerdings zu berücksichtigen, dass das N/Replikat für jeden See vergleichsweise niedrig liegt, weswegen vor allen Dingen fehlende Signifikanzwerte oder F_{ST} -Unterschiede im Vergleich zu den Mikrosatellitendaten und zwischen den Replikaten nicht überinterpretiert werden dürfen.

Die Population, die sich durch einen besonders hohen paarweise F_{ST} -Wert von allen anderen unterscheidet, ist die des Bodensees, gefolgt von Ammersee und Grünsee (letzterer allerdings nicht im einem Vergleich zum Königssee). Sofern relevant erfolgt eine Erwähnung weiterer, paarweiser Vergleiche in der Zusammenfassung der genetischen Ergebnisse, in der jeder See kurz in der Zusammenschau dargestellt wird.

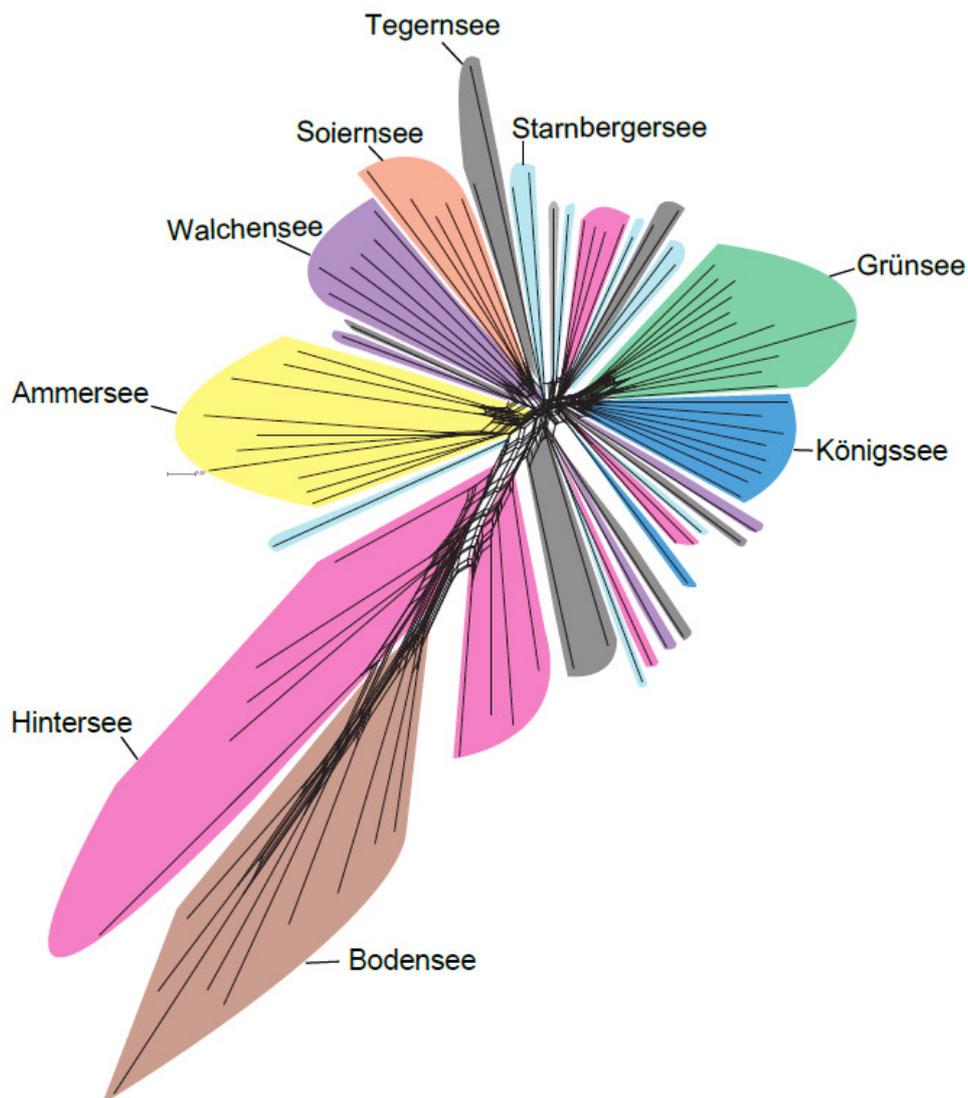
Tab. 24: Paarweise F_{ST} -Werte. Grau unterlegte Werte zeigen zumindest in einem der beiden Replikate nicht signifikant differenzierte Populationen ($P \geq 0.05$ Bonferroni-korrigiert für jeweils 36 paarweise Vergleiche). Die Werte der unteren Matrixhälfte geben die Ergebnisse für Replikat 1 wieder, die obere Replikat 2.

	Boden see	Grün see	Soiern see	Hinter see	Tegern see	Starnberger see	Walchen see	Ammer see	Königs see
Bodensee	-	0.456	0.414	0.055	0.256	0.194	0.356	0.308	0.293
Grünsee	0.460	-	0.288	0.336	0.178	0.193	0.259	0.325	0.153
Soiernsee	0.407	0.197	-	0.293	0.087	0.129	0.107	0.250	0.173
Hintersee	0.284	0.135	0.135	-	0.17	0.144	0.255	0.239	0.204
Tegernsee	0.369	0.108	0.052	0.071	-	0.030	0.0510	0.115	0.078
Starnberg.	0.379	0.113	0.098	0.051	0.017	-	0.0535	0.129	0.077
Walchensee	0.387	0.158	0.042	0.095	0.020	0.055	-	0.191	0.127
Ammersee	0.348	0.195	0.136	0.122	0.099	0.111	0.106	-	0.193
Königssee	0.440	0.071	0.143	0.109	0.063	0.082	0.107	0.163	-

4.2.2.2.3 Ähnlichkeitsanalyse mit dem Neighbour-Joining (NJ)-Verfahren.

Die Netzwerkdarstellung beider Replikate von AFLP-Gentypen dient als analytischer Schritt, um zu evaluieren, wie einheitlich Populationen über ein Ähnlichkeitsnetzwerk verteilt sind, und ob es bei der Anordnung Unsicherheiten gibt. Die beiden Replikate zeigen große Gemeinsamkeiten, aber auch interessante Unterschiede. Eindeutig und durch eine langen Ast (=große genetische Unterschiede) gruppieren in beiden Analysen alle Fische des Bodensees gemeinsam. Weitere eigene Gruppen bilden die Seen Königssee (bis auf ein Tier in einem Replikat) und Grünsee, die sich ihrerseits am ähnlichsten sind, sowie der Ammersee und die besetzte Soiernsee-Population (bis auf 1 Tier in einem Replikat). Uneinheitlich gruppieren die neu aufgebauten Populationen aus dem Walchensee, Tegernsee, Starnberger See. Proben aus dem Hintersee gruppieren teilweise auffällig an der Basis des Bodensees oder innerhalb der undifferenzierten Gruppe. Da die Proben aus dem Hintersee teilweise nicht direkt aus dem See entnommen worden sind, sondern teilweise Jährlinge aus der Brutanstalt gewesen sind, kann die heterogene Differenzierung mögli-

cherweise ein Artefakt darstellen, das nicht der natürlichen Situation im See entspricht. Der vergleichsweise lange Ast der besetzten Grünsee-Population im Vergleich zu den kurzen terminalen (individuellen) Ästen deutet darauf hin, dass die Gründerpopulation sehr klein gewesen ist.

66.a

66.b

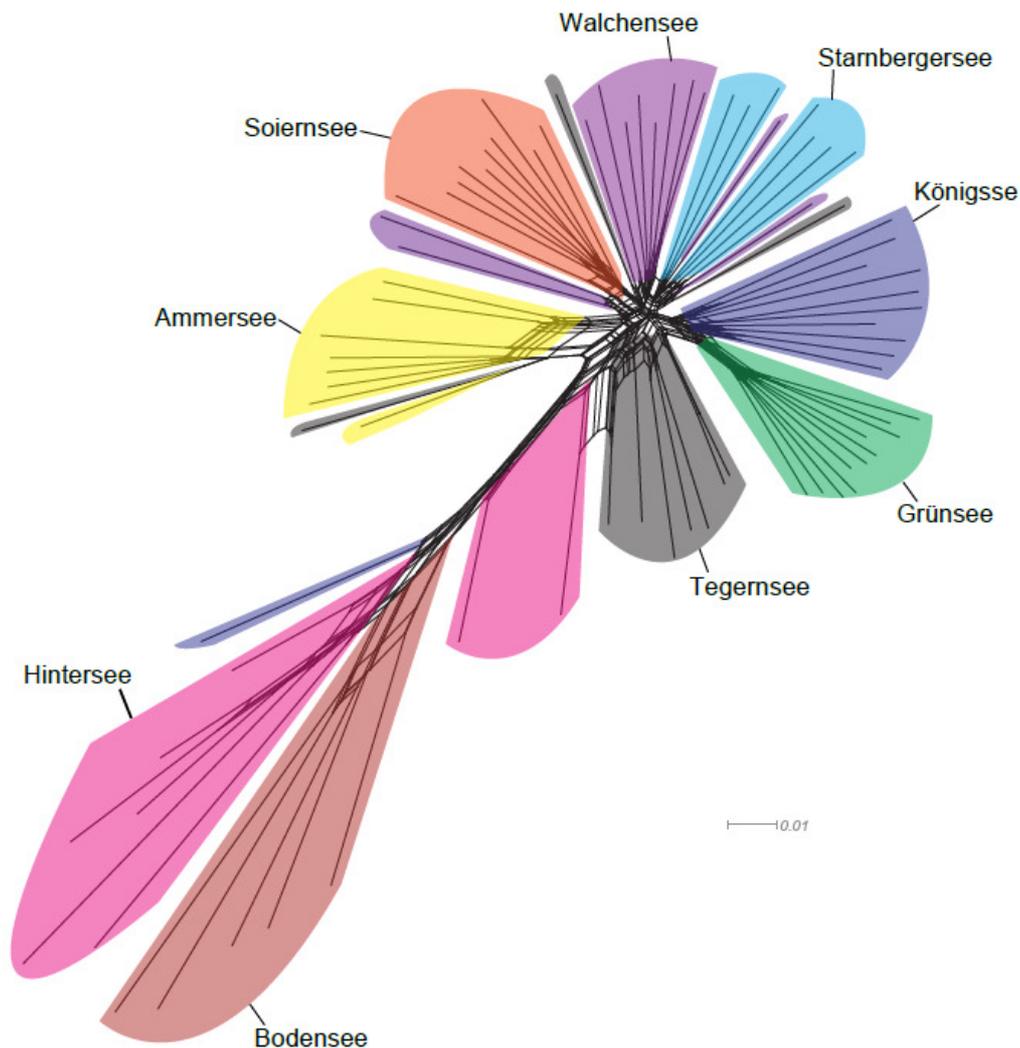


Abb. 66: NeighbourNet-Darstellung der Ähnlichkeit zwischen individuellen AFLP-Genotypen aus zwei Replikaten (a und b). Individuen sind farblich nach ihrem Fundort (See) markiert.

4.2.2.2.4 Multivariate Verfahren zur Projektion von Daten auf reduzierte Faktoren.

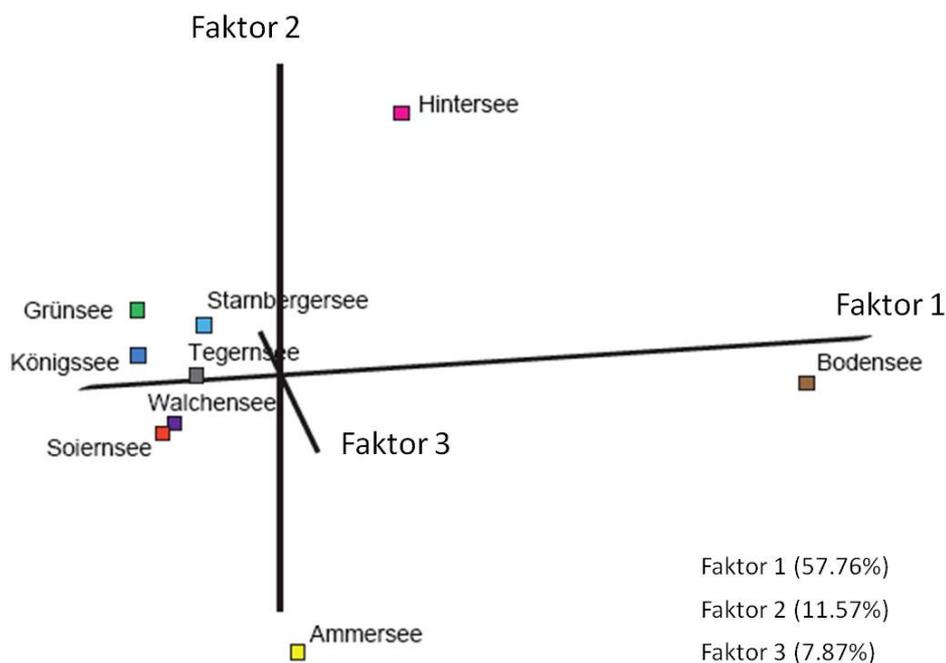
Die räumliche Anordnung der mittleren Populationswerte (Mediane) auf der Basis der AFLP-Daten visualisiert Ähnlichkeiten und Unähnlichkeiten zwischen Populationen.

In der Abb. 67 ist augenfällig, dass sich die Populationen Bodensee; Grünsee und Hintersee (teilweise) sehr deutlich abgrenzen. Die geographische Entfernung des Bodensees erklärt dessen Separation. Die nach der Neighbour-Joining-Analyse offensichtlich heterogene Zusammensetzung des Hintersees einerseits aus Proben, die eine große Ähnlichkeit mit Bodensee-Genotypen aufweisen, und andererseits aus Proben, die in Replikat 1 heterogen innerhalb des nahe verwandten Mischclusters mit Schwerpunkt Starnberger See auftauchen, erklärt, warum in der Median-basierten PCoA-Analyse dieser See sehr separat liegt. Der Ammersee ist - wie auch in anderen Analysen - zumindest in Replikat 1 ebenfalls deutlich separiert. Im Gegensatz zum Mikrosatellitendatensatz gruppiert der Grünsee in der AFLP-PCoA (wie auch in der NJ-Analyse) nicht gesondert, sondern liegt in beiden

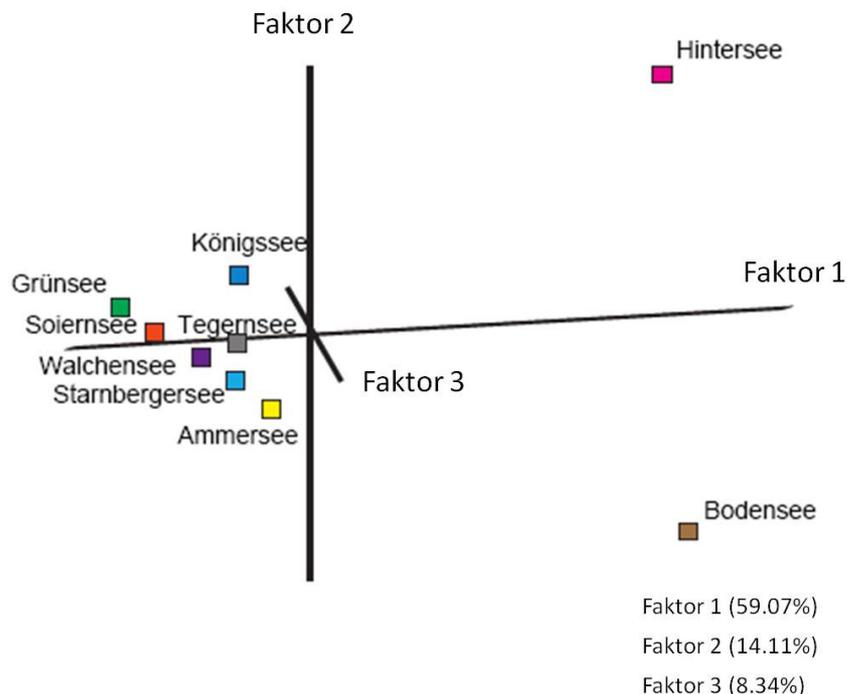
Replikaten nahe der vermutlichen Gründerpopulation aus dem Königssee-System. Die vier wiederaufgebauten Populationen liegen zentral im nahe verwandten Cluster, so wie es von Mischpopulationen zu erwarten ist.

Abb. 67: Ergebnisse der PCoA-Analyse der AFLP-Daten. Die Nähe der Populationspunkte zueinander spiegelt die zusammengefasste, genotypische Ähnlichkeit der untersuchten Populationen wider. Der Anteil erklärter Varianz der drei dargestellten, ersten Faktoren ist den Abbildungen zu entnehmen.

Replikat 1



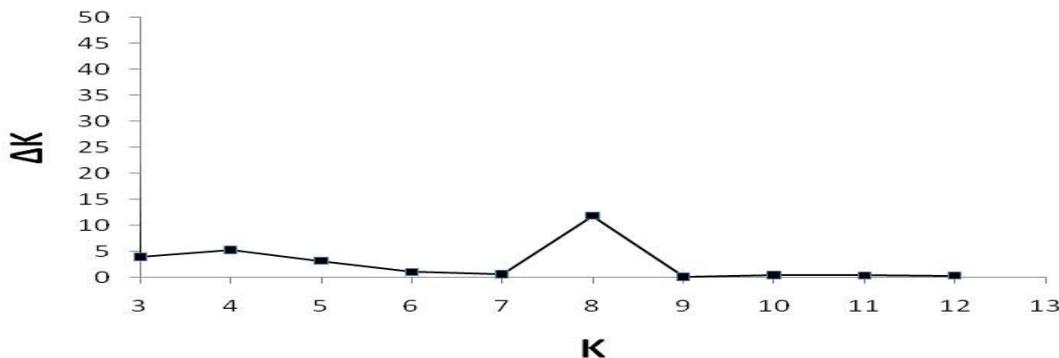
Replikat 2



4.2.2.2.5 Tests für die Zuordnung von individuellen Genotypen zu Populationen.

Zunächst wurde die Anzahl der Populationen K mit Hilfe der EVANNO-Methode abgeschätzt, die angibt, wie viele Populationen bei gegebenem Datensatz als differenzierbar gelten. Das Ergebnis ist in Abb. 68 dargestellt, wobei zwei verschiedene Analysedurchläufe für die beiden Replikate durchgeführt wurden. Als unterscheidbare Anzahl von Gentyphenclustern wurde mit höchster Wahrscheinlichkeit $K=8$ für das erste Replikat und $K=7$ für das zweite Replikat bestimmt. Auffällig ist, dass die Analyse von K in beiden Replikaten neben dem Hauptpeak einen nicht deutlich abgegrenzten, aber erkennbaren Peak bei $K=4$ angibt. Um abgesicherte Analysen in den Zuordnungstests bieten zu können, wurden die Analysen mit $K=7$ für das erste Replikat und bzw. $K=8$ für das zweite Replikat in *structure* gerechnet, aber auch für $K=4$ (beide).

a



b

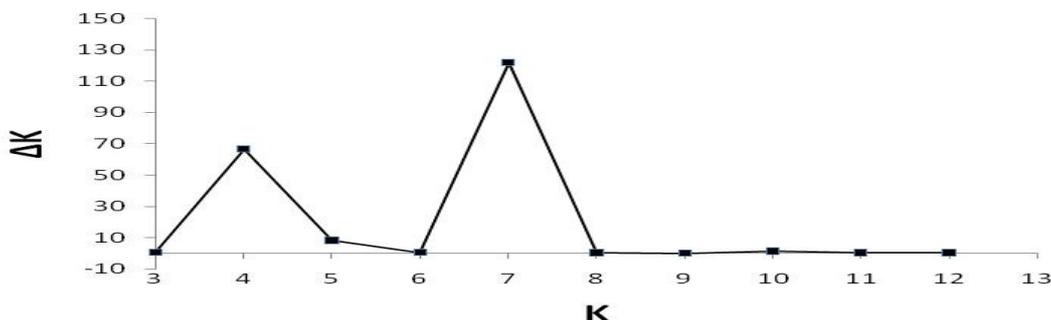


Abb. 68: Ergebnisse für die Evaluation der Anzahl mit dem Datensatz unterscheidbarer Populationen nach der EVANNO-Methode für die rezente AFLP-Genotypen ($K=7$); (a) Replik 1 und (b) Replik 2.

Die eigentlichen Zuordnungstests ergeben für beide Platten und für beide K -Werte eigene genetische Identitäten für den Bodensee und für den Hintersee. Interessanterweise weist bei $K=4$ der Hintersee deutliche Zuordnungsanteile auf, die auch für den Bodensee charakteristisch sind. Die beiden Replikate unterscheiden sich in Bezug auf den Ammersee, der nur für das Replik 2 bei $K=4$ einen eigenen kleinen Anteil aufweist, dafür aber einem Teil der Hintersee-Individuen im Vergleich zum Bodensee keine eigene Identität zuweist. Das Königssee-System (Königssee, Grünsee) weist im Vergleich zu den anderen verbleibenden Seen hohe Gemeinsamkeiten auf, wobei in Replik 2 (wie auch in der NJ-Analyse) Grünsee-Individuen in sich wesentlich distinkter anderen Grünsee-Tieren zugeordnet werden, als in Replik 1. Kaum unterscheidbar gemäß ihrer Zuordnungswahrscheinlichkeiten in beiden Replikaten bleiben die Populationen Walchensee, Starnberger See, Tegernsee und Soiernsee.

Der vergleichende Blick auf die Analysen bei den nach EVANNO deutlich wahrscheinlicheren und deshalb tendenziell auch eher die feinere Populationsstruktur abbildenden Zuordnungen bei $K=8$ (Replik 1) bzw. $K=7$ (Replik 2) bestätigt für beide Replikate eine eigene Identität für die Populationen Bodensee, Hintersee, Ammersee und Grünsee. Der Königssee wiederum teilt sich einen substantiellen Anteil seiner Zuordnungswahrscheinlichkeiten mit dem Grünsee. Die vier verbleibenden Populationen Walchensee, Starnberger See, Tegernsee und Soiernsee bleiben in beiden Replikaten weitgehend undifferenziert. Ein Bodensee-Individuum in Replik 2 wird deutlich wahrscheinlicher dem Königssee-System zugeordnet, ein Effekt, der in der NJ-Analyse nicht sichtbar wird.

Replik 1 (oben K=4, unten K=8)

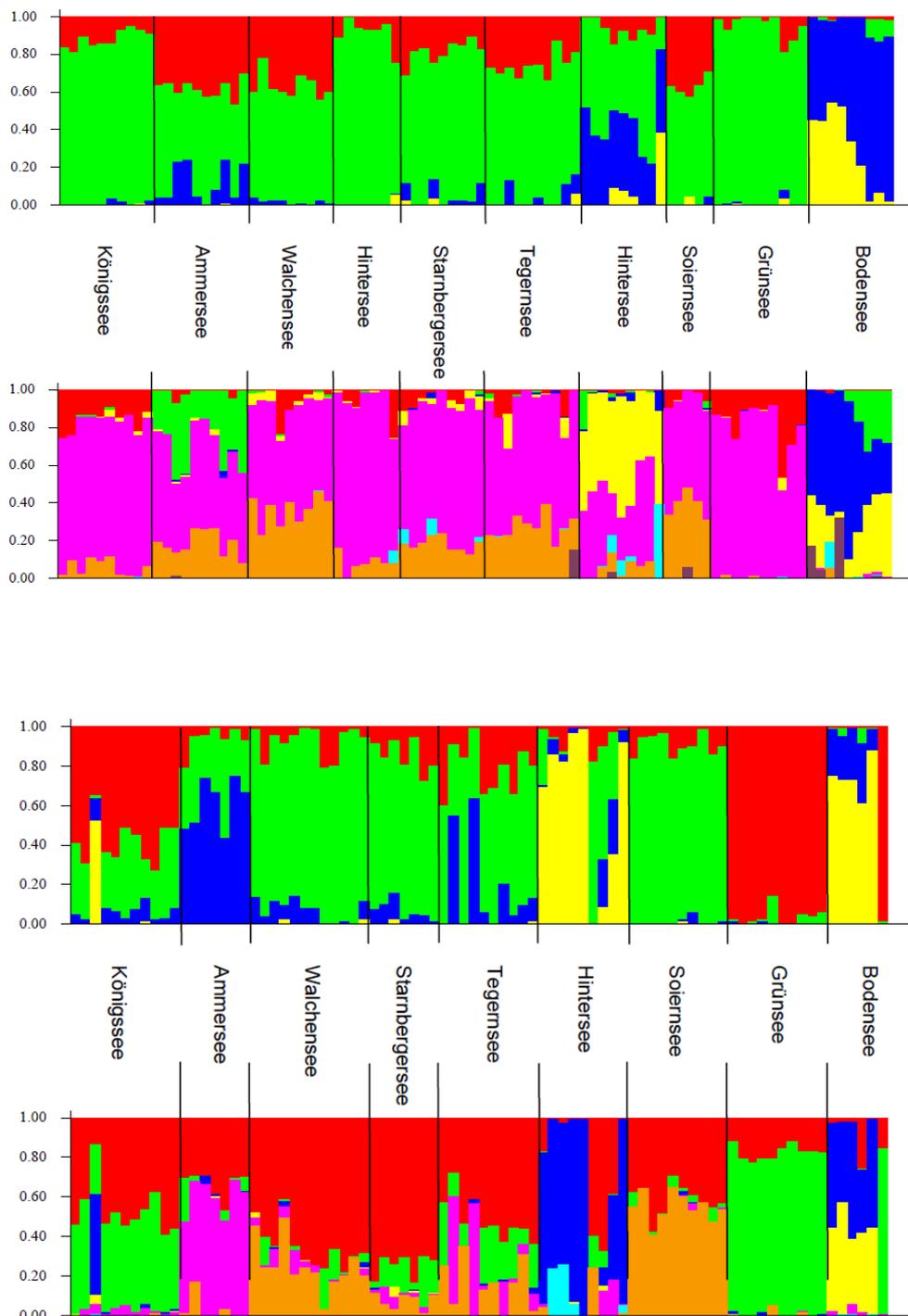


Abb. 69: Ergebnisse der Zuordnungsanalysen mit *structure* (ohne Gruppeninformation) für AFLP- Genotypen beider Replikate für $K=4$ und $K=7/8$. Der Seenursprung der Proben wird zwischen den Barplots angegeben. Die verschiedenen Farben geben die Zuordnung des jeweiligen Genotyps zu $K=4$ bzw. $K=7$ oder $K=8$ „Populationen“ an. Jeder Balken repräsentiert ein Individuum (x-Achse), die y-Achse ist die prozentuale Wahrscheinlichkeit, mit der das jeweilige Individuum einer von K „Populationen“ zugeordnet wird. (Bitte die in zwei Cluster aufgeteilten Individuen des Hintersees in Replik 1 beachten).

4.2.2.3 Mikrosatelliten-Daten

4.2.2.3.1 Deskriptive Statistik

Insgesamt konnten 445 Seesaiblingsproben von 8 historischen und 9 modernen Populationen aus insgesamt 11 Seen erfolgreich genotypisiert werden. Von den 8 historischen Populationen konnte allerdings nur eine einzige Probe aus dem Hintersee einbezogen werden. Dieser Umstand lässt keine statistischen Vergleiche zu, außer dass diese Probe bei den *structure* Zuordnungstests in die Gesamtanalyse mit einbezogen werden konnte. In Auch ohne statistische Analysen fällt auf, dass sich die Anzahl Allele für einzelne Loci sowohl zwischen den Seen als auch zwischen rezenten und historischen Proben deutlich unterscheiden kann. Historische Populationen verfügen im Schnitt über eine geringere genetische Diversität als rezente Populationen. Auch die Frequenzen einzelner Allele voneinander unterscheiden sich zum Teil deutlich.

Analysis of Molecular Variance (AMOVA)

Die AMOVA bestätigt die erste Einschätzung der deskriptiven Daten, denn immerhin 9.23 % der genetischen Varianz im Gesamtdatensatz wird durch Varianz zwischen Populationen (Seen aufgeteilt nach historisch und rezent) erklärt. Der weitaus größte Anteil von 60.95 % wird aber über individuelle Unterschiede erklärt (Tab.xx.a), wobei sich die individuellen Werte zwischen rezenten und historischen Populationen sehr deutlich unterscheiden. Vergleicht man die AMOVA-Resultate aus der Analyse der Kombination zweier reduzierter Datensätze im Direktvergleich, in den nur die historischen oder nur die zueinander direkt in Beziehung stehenden rezenten Populationen (Ammersee, Starnberger See, Walchensee, Königssee und Tegernsee) einbezogen werden, verdeutlicht sich der Unterschied zwischen historischen und rezenten Populationen (Tab. 7.b). Im historischen Datensatz wird ein höherer Anteil von 6.69% statt 5.65% der genomischen Varianz über Unterschiede zwischen Seen erklärt, während die komplementären rezenten Populationen eine deutlich geringe Differenzierung von 5.65% erklärter Varianz nach Seen, aber eine wesentlich stärkere nach Individuen (71.68% statt 50.85%) zeigt.

4.2.2.3.2 F-Statistik

Die F-Statistik, die mit ihrem F_{ST} -Kennwert nach populationsgenetischen Kriterien den Grad an Populationsstruktur anzeigt, ergibt ein scheinbar stärker populationsdifferenzierendes Resultat als bei der AMOVA. Für die meisten paarweise Vergleiche sind signifikante F_{ST} -Werte kalkulierbar, allerdings sind die Absolutwerte oft niedrig. Dies deutet auf eine große Ähnlichkeit bei gleichzeitiger Eigenständigkeit hin. Unter den nicht zu differenzierenden, rezenten Populationen sind die gleichen zu finden, die auch schon in der AMOVA einen geringen Grad an Populationsdifferenzierung erkennen ließen. Die Populationen, die sich durch besonders hohe paarweise F_{ST} -Werte von allen anderen unterscheiden lassen, sind der Bodensee, gefolgt von Ammersee, Grünsee und Hintersee. Auch alle paarweisen F_{ST} -Werte zwischen historischen und rezenten Populationen unterscheiden sich signifikant voneinander, wobei der extrem hohe Wert des Hintersees mit $N=1$ für die historische Probe nicht aussagekräftig ist. Es gibt aber auch wenige Seenpopulationen, die sich nicht signifikant differenzieren lassen. Sofern relevant erfolgt eine Erwähnung einzelner, paarweiser Vergleiche in der Zusammenfassung der genetischen Ergebnisse, in der jeder See kurz in der Zusammenschau dargestellt wird.

Tab. 25: (a) Prozentanteil erklärter Varianz aus AMOVA (inkl. Angabe der Freiheitsgrade df) im gesamten Mikrosatelliten-Datensatz, und (b) nur im Vergleich der fünf Populationen, für die sowohl rezente als auch historische Proben für den direkten Vergleich vorlagen: Tegernsee, Walchensee, Starnberger See, Ammersee und Königssee.

a (alle Populationen)						
		historisch	rezent		hist.+rez.	
	df	% Varianz	df	% Varianz	df	% Varianz
zwischen Populationen	6	7.13	8	9.46	16	9.23
innerhalb von Populationen	174	41.98	267	20.41	429	29.82
zwischen Individuen	181	50.89	276	70.13	446	60.95
gesamt	361		531		891	
b (Direktvergleich 5 hist+rez)						
		historisch	rezent		hist.+rez.	
	df	% Varianz	df	% Varianz	df	% Varianz
zwischen Populationen	5	6.69	5	5.65	11	6.86
innerhalb von Populationen	137	42.46	177	22.66	314	31.73
zwischen Individuen	143	50.85	183	71.68	326	61.41
gesamt	285		365		651	

Tab. XX. Probenanzahl N und Anzahl Allele pro Genort über alle Genorte.

		SFO8	Ssa85	Sa72Zim	Mst85	SFO23	CocI3	Mittelwert der Pop.	σ
Gesamt									
	<u>NAllele</u>	34	25	10	41	34	23		
Ammersee									
historisch	N	12	13	12	13	13	13		
	<u>NAllele</u>	13	12	5	5	6	8	8.17	3.54
rezent	N	29	29	29	28	29	29		
	<u>NAllele</u>	14	13	7	9	15	7	10.83	3.60
Königssee									
historisch	N	36	36	36	36	36	36		
	<u>NAllele</u>	14	13	6	8	11	12	10.67	3.08
rezent	N	31	29	31	31	31	31		
	<u>NAllele</u>	15	12	6	12	13	8	11.00	3.35
Obersee									
historisch	N	32	32	32	32	32	32		
	<u>NAllele</u>	15	11	6	6	7	10	9.17	3.54
Hintersee									
rezent	N	30	32	32	32	31	31		
	<u>NAllele</u>	14	9	3	14	11	10	10.17	3.72
Starnbergersee									
historisch	N	60	60	60	60	60	60		
	<u>NAllele</u>	15	15	5	28	13	11	14.50	7.58
rezent	N	30	30	30	30	30	30		
	<u>NAllele</u>	15	13	4	18	13	11	12.33	4.72
Tegernsee									
historisch	N	4	8	8	8	8	8		
	<u>NAllele</u>	6	6	2	5	3	6	4.67	1.75
rezent	N	33	33	33	33	33	33		
	<u>NAllele</u>	16	10	5	17	10	12	11.67	4.41
Walchensee									
historisch	N	25	25	25	25	25	25		
	<u>NAllele</u>	16	9	6	11	10	7	9.83	3.54
rezent	N	30	30	30	30	30	30		
	<u>NAllele</u>	17	9	4	23	16	13	13.67	6.62
Schliersee									
historisch	N	7	7	7	7	7	7		
	<u>NAllele</u>	6	4	3	7	6	4	5.00	1.55
Soiernsee									
rezent	N	27	27	27	27	27	26		
	<u>NAllele</u>	11	4	3	12	11	5	7.67	4.08
Grünsee									
rezent	N	32	32	31	31	32	31		
	<u>NAllele</u>	5	6	4	7	6	5	5.50	1.05
Bodensee									
rezent	N	24	24	23	24	24	24		
	<u>NAllele</u>	10	9	6	12	14	11	10.33	2.73

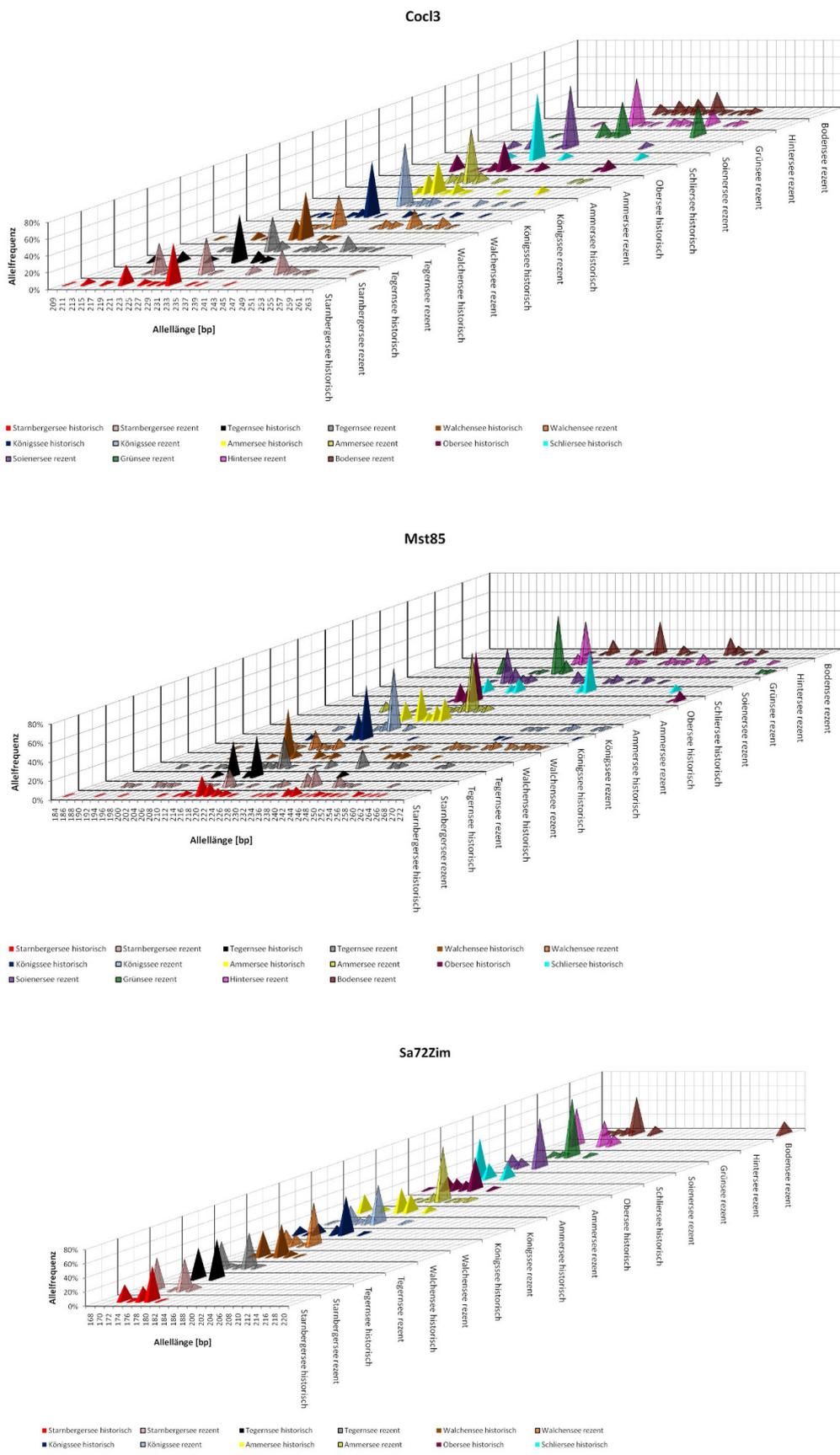


Abb. 70: Mikrosatelliten-Allelfrequenzen für sechs Genorte über alle Seen.

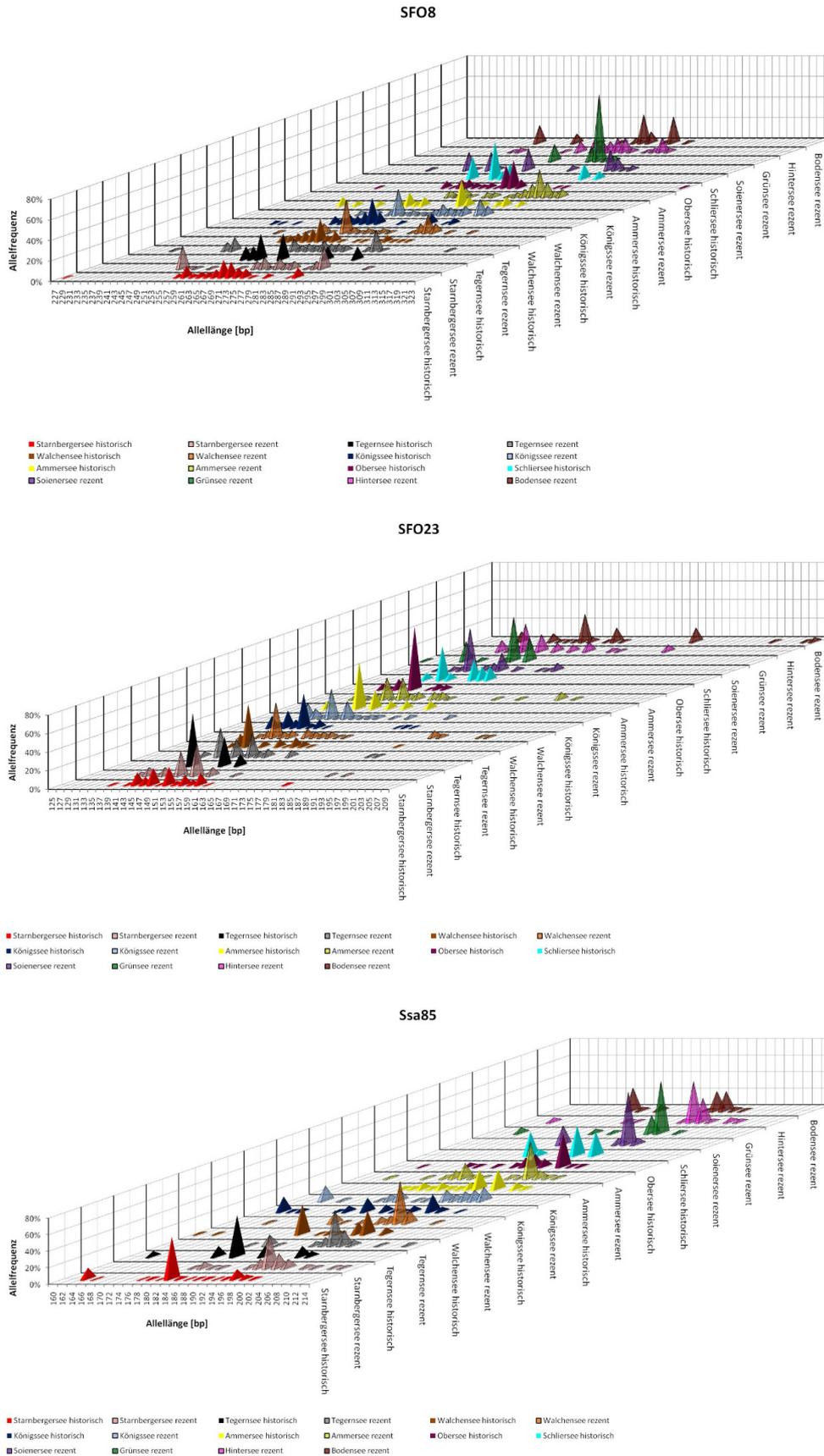


Abb. 70 (Fortsetzung): Mikrosatelliten-Allelfrequenzen für sechs Genorte über alle Seen.

Tab. 27: Paarweise F_{ST} -Werte für historische und rezente Populationen. Grau unterlegte Werte zeigen nicht signifikant differenzierte Populationen ($P \geq 0.05$; Bonferroni-korrigiert für 136 paarweise Vergleiche).

	Kön rez	Kön hist	Amm rez	Amm hist	Walch rez	Walch hist	Hint rez	Hint hist	Starn rez	Starn hist	Teg rez	Teg hist	Ober hist	Schlier hist	Soin rez	Grün rez	Boden rez
Königs rez	-																
Königs hist	0.023	-															
Ammer rez	0.112	0.114	-														
Ammer hist	0.065	0.063	0.092	-													
Walchen rez	0.071	0.070	0.075	0.074	-												
Walchen his	0.111	0.100	0.108	0.093	0.052	-											
Hinter rez	0.045	0.066	0.120	0.082	0.050	0.125	-										
Hinter hist	0.293	0.267	0.302	0.228	0.256	0.284	0.283	-									
Starnb. rez	0.082	0.103	0.107	0.092	0.049	0.119	0.032	0.259	-								
Starnb. hist	0.068	0.069	0.091	0.080	0.073	0.075	0.082	0.244	0.070	-							
Teger rez	0.049	0.063	0.089	0.062	0.022	0.089	0.015	0.255	0.009	0.058	-						
Teger hist	0.055	0.050	0.110	0.088	0.051	0.003	0.097	0.374	0.101	0.040	0.055	-					
Ober hist	0.068	0.058	0.139	0.042	0.072	0.108	0.068	0.289	0.112	0.104	0.060	0.061	-				
Schlier hist	0.115	0.116	0.154	0.097	0.086	0.092	0.094	0.309	0.076	0.080	0.078	0.096	0.123	-			
Soiern rez	0.105	0.093	0.091	0.124	0.030	0.054	0.089	0.361	0.082	0.099	0.053	0.054	0.108	0.104	-		
Grün rez	0.174	0.191	0.199	0.197	0.168	0.238	0.177	0.441	0.166	0.185	0.145	0.229	0.190	0.309	0.212	-	
Boden rez	0.135	0.141	0.140	0.101	0.096	0.137	0.122	0.221	0.098	0.112	0.081	0.120	0.125	0.164	0.152	0.175	-

4.2.2.3.3 Multivariate Verfahren zur Projektion von Daten auf reduzierte Faktoren

Die räumliche Anordnung der mittleren Populationswerte (Mediane) auf der Basis der Mikrosatellitendaten visualisiert Ähnlichkeiten und Unähnlichkeiten zwischen Populationen. Stellt man alle historischen und rezenten gemeinsam Daten dar (Abb. 71 a) ist augenfällig, das sich die Populationen Bodensee (rezent); Grünsee (rezent) und Hintersee (historisch) sehr stark abgrenzen. Die geographische Entfernung des Bodensees erklärt dessen Separation, das extrem geringe Probengröße für den Hintersee (historisch) erklärt die eigenartige Position, weil mit $N=1$ keine populationspezifischen Mediane berechnet werden können. Lediglich die Position des Grünsees ist nicht *ad hoc* zu erklären und wird in der Zusammenschau mit den anderen Daten diskutiert. Betrachtet man alleine die rezenten Populationen (Abb. 71.b), die für den Aquakulturrelevanz-Vergleich wichtig sind, verdeutlicht sich das Bild.

Um die Positionen der in Abb. 71.a nahe beieinander liegenden Populationen aufgelöster in ihrer Position zueinander darzustellen, wurden diese drei Populationen von einer zweiten PCoA ausgeschlossen, das Ergebnis ist in Abb. 71.b dargestellt. Hier trennen sich der Ammersee (historisch und rezent) sowie die Populationen des Königssee-Systems (Königssee historisch und rezent, Obersee historisch) von den verbleibenden Populationen ab und sind jeweils nahe zueinander gruppiert. Dennoch fällt auf, das Ammersee (historisch) von Ammersee (rezent) relativ weit entfernt liegt. Die vier historischen Populationen Walchensee, Tegernsee, Starnberger See und Schliersee, die auch geographisch relativ nahe beieinander liegen, bilden eine weitere Gruppe. Diese trennt sich relativ deutlich von ihren rezenten Gegenstücken ab, die ihrerseits relativ nahe zueinander liegen (Walchensee, Hintersee, Tegernsee und Starnberger See) und zusammen mit dem Soiernsee gruppieren.

Abb.71.a

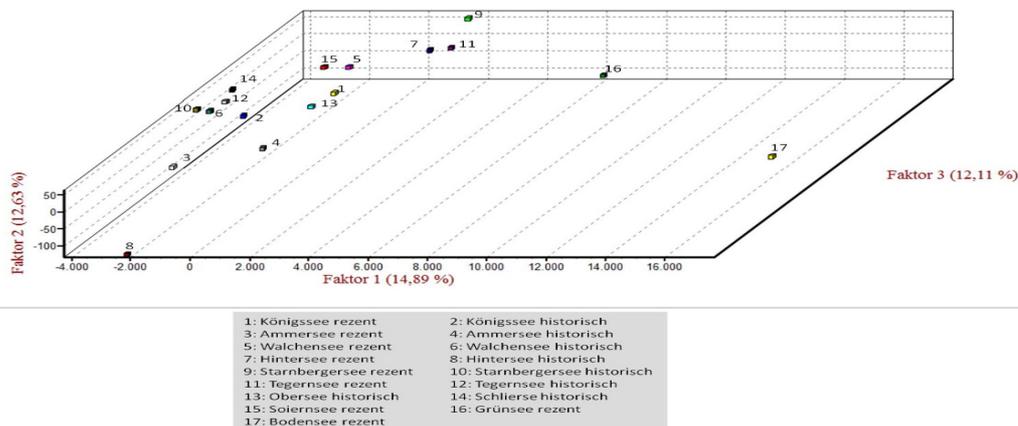
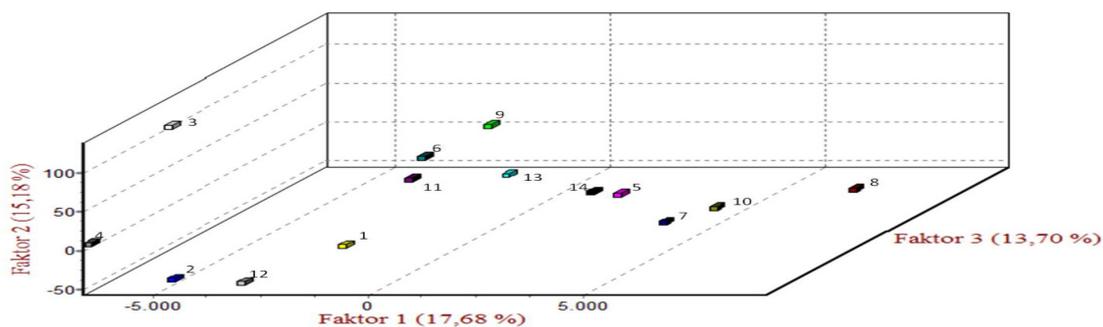
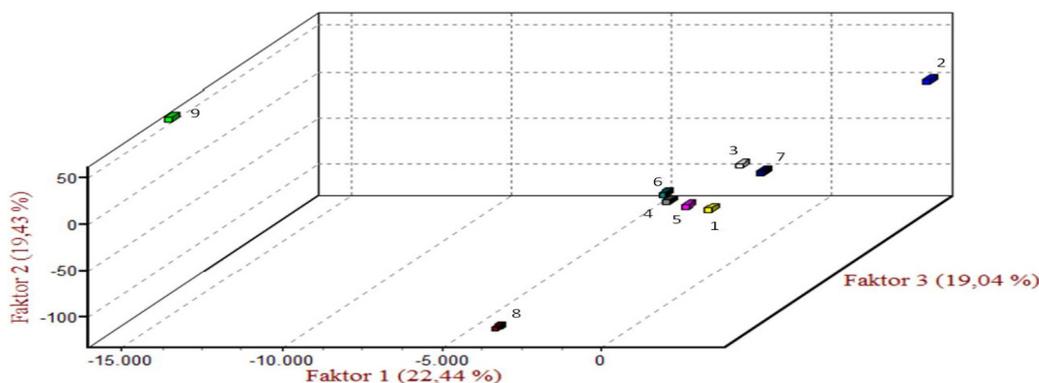


Abb.71.b



- | | |
|------------------------------|--------------------------|
| 1: Königssee rezent | 2: Königssee historisch |
| 3: Ammersee rezent | 4: Ammersee historisch |
| 5: Walchensee rezent | 6: Walchensee historisch |
| 7: Hintersee rezent | 8: Starnbergersee rezent |
| 9: Starnbergersee historisch | 10: Tegernsee rezent |
| 11: Tegernsee historisch | 12: Obersee historisch |
| 13: Schliersee historisch | 14: Soiernsee rezent |

Abb.71.c



- | | |
|--------------------------|---------------------|
| 1: Königssee rezent | 2: Ammersee rezent |
| 3: Walchensee rezent | 4: Hintersee rezent |
| 5: Starnbergersee rezent | 6: Tegernsee rezent |
| 7: Soiernsee rezent | 8: Grünsee rezent |
| 9: Bodensee rezent | |

Abb. 71: Ergebnisse der PCoA-Analyse. Die Nähe der Populationspunkte zueinander spiegelt die zusammengefasste genotypische Ähnlichkeit der untersuchten Populationen wider. Die Achsenbeschriftung weist den Anteil erklärter und in der Abbildung visualisierter Varianz für die drei PCoA-Faktoren aus. (a) alle historischen und rezenten Populationen; (b) nur rezente Populationen; (c) historische und rezente Populationen ohne Bodensee und einen Anteil Hintersee-Individuen.

4.2.2.3.4 Statistische Tests für die Zuordnung von Genotypen zu Populationen

Zunächst wurde die Anzahl der Populationen K mit Hilfe der EVANNO-Methode abgeschätzt, die angibt, wie viele Populationen bei gegebenem Datensatz als differenzierbar gelten können. Das Ergebnis ist in Abb. 72 dargestellt, wobei der gesamte Datensatz (historisch und rezent) in einem Durchgang analysiert wurde. Die höchste Wahrscheinlichkeit für die unterscheidbare Anzahl von Gentyphenclustern wurden bei $K=5$ festgestellt. Auffällig ist aber, dass es einen weiteren abgrenzbaren Peak bei $K=10$ gibt. Um abgesicherte Analysen in den Zuordnungstests bieten zu können, wurden beide K -Werte als Grundlage für die Zuordnungstests verwendet.

Die Zuordnungstests ergaben ein nach fünf bzw. zehn Populationseinheiten differenziertes Bild, das aber bei dem gegebenen, im Vergleich zu den AFLP-Daten niedrigeren Informationsgehalt der sechs Mikrosatellitenloci durch sehr heterogene Zuordnungswahrscheinlichkeiten zunächst schwer interpretierbar erscheint.

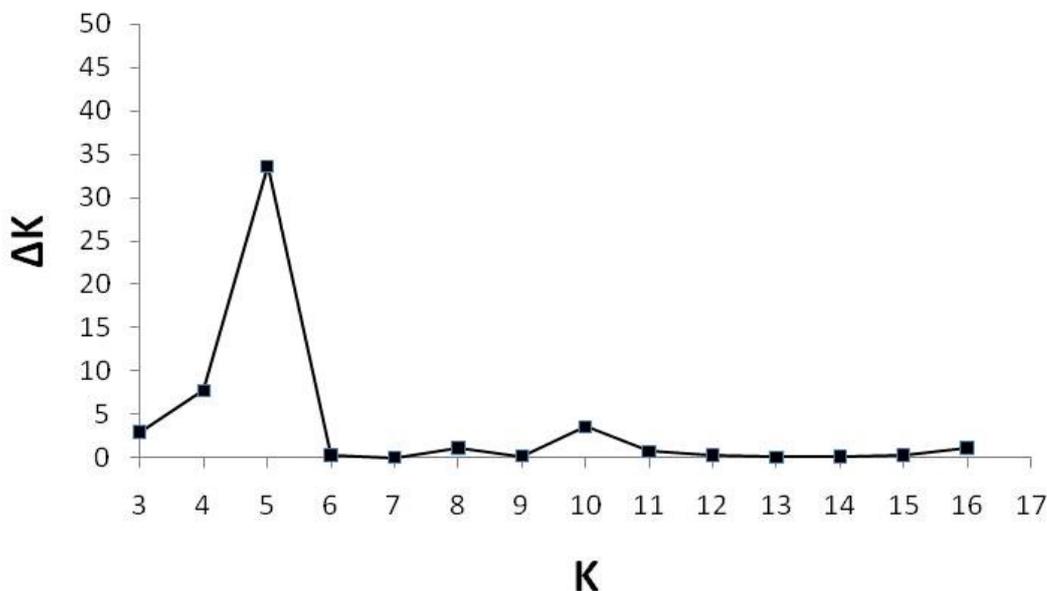
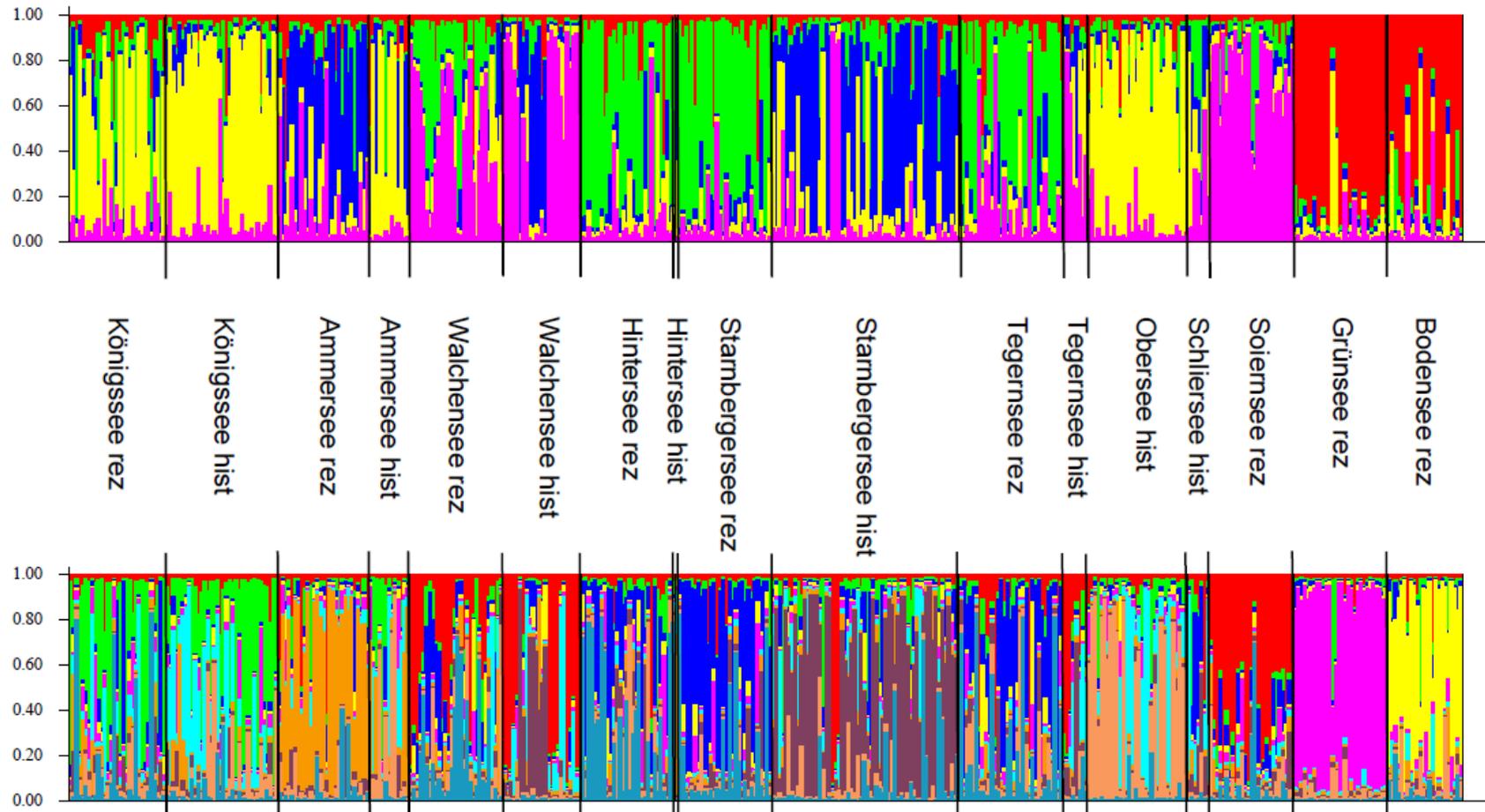


Abb. 72: Ergebnisse für die Evaluation der Anzahl mit dem Datensatz unterscheidbarer Populationen nach der EVANNO-Methode für die Kombination rezenter und historischer Genotypen. Evaluiert wurden potentielle Populationscluster von $K=3$ bis $K=17$.

Bei der nach EVANNO wahrscheinlicheren $K=5$ Populationsdifferenzierung sind anhand der hauptsächlichen Zuordnungswahrscheinlichkeiten auffällige Unterschiede und Gemeinsamkeiten der rezenter im Vergleich zu historischen Populationen differenzierbar. Sehr einheitliche Zuordnungen zu einer gemeinsamen Population ergeben sich für die drei Seen des natürlichen Königssee-Systems (Königssee historisch und rezent, Obersee historisch). Die historischen und rezenter Proben vom Starnberger See, Ammersee, Tegernsee und Walchensee unterscheiden sich teilweise sehr deutlich. Der rezente Walchensee teilt zu einem geringen Teil Zuordnungswahrscheinlichkeiten zum gleichen Cluster wie der rezente Hintersee, Starnberger See und Tegernsee (und Hintersee $N=1$). Die historische Walchensee-Probe dagegen weist teilweise Zuordnungen auf, die sie mit dem rezenter Ammersee, und Starnberger See (beide Isar-Einzugsgebiet) teilt, hat aber auch substantielle Anteile, die eine eigene Identität für den Walchensee (historisch und rezent), den historischen Tegernsee, den Schliersee und den Soiernsee anzeigen. Bodensee und Grünsee bilden einen gemeinsamen, relativ einheitlichen Cluster.

Die Interpretation der Zuordnungswahrscheinlichkeiten bei der nach EVANNO deutlichen weniger wahrscheinlichen Clustereinteilung von $K=10$ hat Gemeinsamkeiten mit $K=5$, allerdings werden Bodensee, Grünsee und zu einem Anteil auch der Obersee als separate Populationseinheiten detektiert. Sowohl Ammersee als Königssee im Vergleich historisch – rezent unterscheiden sich auf dieser Ebene etwas stärker differenziert, z.B. ist der teilt der historische Königssee mehr Anteile mit dem historischen Obersee, als der rezente. Soiernsee und Walchensee (historisch und rezent) werden häufiger gemeinsam gruppiert.

Abb. 73: Ergebnisse der Zuordnungsanalysen mit *structure* (ohne Gruppeninformation) für Mikrosatelliten- Genotypen (Gesamtdatensatz) für $K=5$ und $K=10$ (K nach EVANNO-Methode evaluiert) . Der Seenursprung wird zwischen den Barplots angegeben. Die verschiedenen Farben geben die Zuordnung des jeweiligen Genotyps zu $K=5$ bzw. $K=10$ „Populationen“ an. Jeder Balken repräsentiert eines von 445 Individuen (x-Achse), die y-Achse zeigt die prozentuale Wahrscheinlichkeit, mit der das jeweilige Individuum einer von K „Populationen“ zugeordnet wird.



4.2.3 Zusammenfassung der Genetik-Ergebnisse

4.2.3.1 Überprüfung der Hypothesen/Teilhypothesen

Hypothese 1 / Teilhypothese: *Rezente Populationen mit nachweisbarem Populationseinbruch und/oder historisch nicht nachweisbaren Populationen mit anschließendem Wiederaufbau unterscheiden sich genomisch kaum voneinander, aber signifikant und stark von ihren historischen Gegenstücken: Starnbergersee, Walchensee, Tegernsee.*

Solche rezenten Populationen unterscheiden sich genomisch in unterschiedlicher Weise durchaus voneinander. Es werden zwar oft rezente Individuen der Populationen Starnberger See, Walchensee und Tegernsee identischen Grundgesamtheiten zugeordnet bzw. sind sich zueinander am ähnlichsten. Diese Tendenz ist aber nicht konsistent. Genfluss-Korrelate wie signifikante paarweise F_{ST} -Werte weisen diese als jeweils eigenständig aus. Trotz der Ähnlichkeiten hat eine offensichtlich unterschiedliche Aufbaugeschichte und/oder ein unterschiedlichem Anteil an den Zusammenbruch überdauernden eigenen Elementen dazu geführt, dass sie sich signifikant unterscheiden. Es sind jeweils eigene Populationen, allerdings ohne evolutionär-autochthonen Charakter.

Im Vergleich mit den historischen Populationen erweisen sich die wieder aufgebauten Populationen als stark verändert. Dies gilt besonders ausgeprägt für die zusammengebrochenen Populationen aus dem Starnberger See und Tegernsee, aber auch für die Walchensee-Population. Trotz fehlenden Zusammenbruchs ähnelt letztere auf beiden Markerebenen teilweise den beiden vorgenannten rezenten Seenpopulationen Starnberger See und Tegernsee. Sie unterscheidet sich aber teilweise deutlich auf Mikrosatellitenebene von der historischen Walchensee-Population. Der mittelalterliche Erstbesatz des Walchensees mit Tegernsee-Material bleibt aber im Vergleich von historischem Walchensee-Material mit historischem Tegernsee-Material im Genom nachvollziehbar.

Hypothese1 / Teilhypothese: *Die wieder aufgebauten Populationen weisen u. a. Ähnlichkeiten mit den Populationen Hintersee und Bodensee auf, da diese als natürliches Reservoir für Wiederaufbaumaßnahmen zur Verfügung stehen.*

Diese Teilhypothese konnte auf Mikrosatelliten-Ebene sicher gestützt werden. Die rezenten Populationen Tegernsee und Walchensee weisen hier große Ähnlichkeiten mit der des Hintersees, nicht aber mit der des Bodensees auf. Auf AFLP-Ebene ist ein Hintersee-Einfluss auf die rezent wieder aufgebauten Populationen nicht nachweisbar.

Hypothese1 / Teilhypothese: *Die Verwandtschaft von Populationen, die nicht von Populationszusammenbrüchen betroffen waren (Bodensee, Ammersee, Walchensee, Königssee, Hintersee), zeigen auch rezent ein Verwandtschaftsmuster / Ähnlichkeit zueinander, das dem Flusssystem bzw. der räumlichen Nähe zueinander entspricht.*

Die ursprüngliche Verwandtschaft historischer Populationen, die geographisch im Gewässersystem besonders beieinander liegen und deshalb aus evolutionären Gründen Ähnlichkeiten aufweisen sollten, kann bestätigt werden: Die geographisch nahe „Isar-Inn-Populationen“ Starnberger See, Walchensee, Schliersee, Tegernsee, Schliersee unterscheiden sich deutlicher von den im Vergleich isolierteren „Inn-Salzachpopulationen“ Königssee, Obersee, Hintersee. Diese historisch nachweisbare Ähnlichkeit zueinander ist bei den im Datensatz repräsentierten modernen Populationen, die von Zusammenbrüchen betroffen waren, nicht mehr nachweisbar. Diese sind sich untereinander ähnlicher als im Vergleich zu den geographisch separierten Verwandtschaftsgruppen.

Die nicht durch Populationszusammenbrüche gekennzeichneten Populationen Königssee und Ammersee zeigen dieses Muster dagegen nicht. Auch die Ammersee- und Königssee-Populationen zeigen zwar im historischen Vergleich geringe Veränderungen in der genomischen Diversität, nicht aber in ihrer evolutionär gewachsenen Identität. So liegen historische und rezente Populationen zwar in Ähnlichkeitsanalysen und Zuordnungstests separat, gruppieren aber dennoch nahe beieinander.

Die natürlichen Populationen des Königssee-Systems sind als solche identifizierbar. Die Position der aberranten Ammersee-Population liegt zwar näher am südostbayerischen Cluster als am südwestbayerischen Bodensee, sie bleibt aber in den meisten Analysen erhalten.

Die nicht zusammengebrochenen Populationen Bodensee und Hintersee weisen stark abweichende Besonderheiten auf. Der Bodensee als einziger Repräsentant der westlichen voralpinen Seesaiblings-Populationen weicht von allen anderen untersuchten Populationen erwartungsgemäß stark ab und ist deshalb nicht direkt mit den anderen vergleichbar. Die moderne Population des Hintersees erscheint hingegen extrem heterogen aus Individuen zusammengesetzt, die einerseits Ähnlichkeit mit dem Bodensee-Material haben, und andererseits aus solchen, die Ähnlichkeit mit den Populationen des Königssee-Systems, aber auch mit der modernen wieder aufgebauten Gruppe aufweisen.

Hypothese 2 *Künstlich besiedelte Seen weisen ein Verwandtschaftsmuster mit anderen untersuchten Seen auf, das eine Ähnlichkeit zu wieder aufgebauten Populationen widerspiegelt.*

Die beiden untersuchten Hochgebirgspopulationen waren in sich sehr homogen. Der Grünsee erscheint durch einen genetischen Flaschenhals gegangen zu sein. Dies wird durch seine stark betonte eigene Identität deutlich, die mit Inzucht begründbar sein kann. Trotz dieser Eigenheiten gruppiert er in Ähnlichkeitsanalysen, die nicht durch populationsgenetische Annahmen begründet sind, nahe bei der vermutlichen Gründerpopulation aus dem Königssee-System und nicht bei anderen künstlich aufgebauten Populationen. Die Population des Soierssees weist im Gegensatz zum Grünsee Gemeinsamkeiten mit dem historischen Walchensee-, Tegernsee-, Starnberger See-Cluster auf, nicht aber mit deren modernen Gegenstücken.

4.2.3.2 Identifizierung ursprünglicher vs. veränderter bayerischer Seesaiblingsbestände

Aus den genetischen Ergebnissen ergeben sich folgende Zuordnungen:

Bodensee: Die untersuchten Brütlinge der Bodensee-Population sind durch eine starke, eigene Identität gekennzeichnet. Inwieweit sie tatsächlich mit einer der drei bereits von BRUNNER et al., (1998) Bodensee-Populationen identisch ist, lässt sich ohne detailliertere Vergleiche mit mehr Bodensee-Material, sowie Schweizer Populationen nicht feststellen.

Ammersee: Die als *Salvelinus evasus* als eigene Art beschriebene Ammersee-Population weist sich sowohl historisch als auch rezent als eigenständig und wenig beeinflusst aus. Unterschiede zwischen historischen und rezenten Proben lassen sich theoretisch mit einer verminderten Populationsgröße in der Phase der Eutrophierung des Ammersees in den 70er Jahren erklären. Die Population, die nie explizit einem Populationsmanagement unterworfen war, sollte hohe Schutzwürdigkeit als eigenständige, natürlich gewachsene autochthone Ressource genießen.

Starnberger See: Die historische Starnberger See Population unterscheidet sich stark von der rezenten Wiederaufbau-Population. Sie war den nahe gelegenen Populationen aus dem

Walchensee, Tegernsee, Schliersee am nächsten verwandt. Die rezente Population ist sehr heterogen zusammengesetzt und hat Ähnlichkeiten mit einem Teil der aktuellen Tegernsee und Hintersee-Population. Möglicherweise stammt ein Teil beider Aufbaupopulationen aus dem Hintersee oder mit diesen wahrscheinlich nahe verwandten Salzkammergut-Populationen, aus den der Starnberger See nachweislich besetzt wurde (Grundlsee, Fuschlsee).

Walchensee: Historisch war der Walchensee wohl frei von Seesaiblingen, wurde aber schon im Mittelalter aus dem Tegernsee besetzt. Die historischen Schuppenproben ergaben in der Tat eine hohe Ähnlichkeit mit historischen Schuppenproben aus dem Tegernsee. Die aktuelle Walchensee-Population hat noch Anteile dieser historischen Walchensee/Tegernsee-Population, hat aber auch andere genetische Anteile, die mit dem rezenten Starnberger See/Tegernsee-Cluster übereinstimmen.

Schliersee: Aus diesem See lagen nur historische Schuppenproben vor, die größere Ähnlichkeiten mit der historischen Tegernsee-Population aufweist (PCoa), mit anderen Analysemethoden hingegen zu den rezenten Tegernsee/Starnberger See-Populationen gruppiert. Die Stichprobengröße ist aber sehr klein, worauf die Unsicherheiten zurückzuführen sind.

Tegernsee: Die historische Tegernsee-Population erscheint genetisch im Tegernsee nach der Eutrophierungsphase erloschen. Sie hat größere Ähnlichkeit mit der des historischen Walchensees (der aus dem Tegernsee ursprünglich besetzt wurde) und des Soiernsees. Die Wiederaufbau-Population ähnelt hingegen der des Starnberger Sees und Teilen des Hintersees.

Soiernsee: Die rezente Population des Soiernsees hat große Ähnlichkeit mit der historischen Walchensee-, Teilen der aktuellen Walchensee-, und der historischen Tegernsee-Population. Eine detailliertere Analyse könnte ergeben, dass sich Anteile des historischen Clusters Walchensee, Tegernsee und Schliersee im Soiernsee erhalten haben.

Königssee/Obersee: Als geographischer Teil des Königssee-Systems (zusammen mit Obersee und Grünsee) hat der Königssee seine ursprüngliche genetische Identität weitgehend erhalten, obwohl in der rezenten Population einige Fremdelemente detektierbar sind. Der historische Königssee unterscheidet sich von der eindeutig nächstverwandten historischen Obersee-Population geringfügig, von der rezenten Königssee-Population etwas deutlicher.

Grünsee: Die genetische Integrität des sicher (auch) aus dem Königssee-System besetzten Grünsees liegt phänetisch in der Nähe des Königssees. Allerdings weist der Grünsee einige Besonderheiten auf, die auch auf eine verringerte allelische Vielfalt zurückzuführen sind. Nicht annahmefreie populationsgenetische Analysemethoden weisen die Grünsee-Population als eigenständig und separat aus, andere als eigenständigen Königssee-Systembestandteil.

Hintersee: Da von der historischen Hintersee-Population leider nur eine historische Schuppenprobe vorliegt, und da die genommene Probe aus Jährlingen in Aquakultur gezogen wurde, sind die Aussagen über die Hintersee-Population nicht voll als Referenz für die freie Seenpopulation belastbar. Demnach ist die aktuelle Hintersee-Population aus zwei Teilen zusammengesetzt, einem stark an die Bodensee-Population erinnernden Anteil und einen möglicherweise autochthonen Anteil.

4.3 Diskussion

Die genetischen Untersuchungen sollten zeigen, (1) wie sich heutige Bestände des alpinen Seesaiblings (*Salvelinus cf. umbla*) von historischen Beständen auf genomischer Ebene unterscheiden, (2) welche Unterschiede zwischen ausgewählten Populationen hinsichtlich aquakultur-relevanter genomischer Merkmalskorrelate bestehen, und (3) welche Ableitungen für die gezielte Rekonstruktion natürlicher Bestände bzw. welche genetischen Grundlagen (bzw. deren Korrelate) für die Selektion natürlich evolvierter aquakulturrelevanter Eigenschaften auf der Basis der gewonnenen Ergebnisse identifiziert werden können.

Die Analysen zeigten, dass sich die heutigen Bestände des Alpen Seesaiblings von den historischen auf genomischer Ebene unterscheiden. Ein substantieller Anteil der genetischen Varianz im Datensatz war auf Unterschiede zwischen den Populationen zurückzuführen, darunter auch auf Unterschiede zwischen rezenten und historischen. Besonders im AFLP- Vergleich der rezenten Populationen wird aber auch ein deutlich größerer Anteil über die individuelle Varianz erklärt. Dies ist besonders im Vergleich nahe verwandter Populationen zu erwarten, denn die kurze Zeit seit der Differenzierung nahe verwandter Populationen und Arten wird auch unter strengen natürlichen Selektionsbedingungen dafür sorgen, dass nur der selektierte Anteil des Genoms differenziert (WU, 1998; LUIKART, et al., 2003). Dies bedeutet, dass auch ein kleinerer Anteil genomischer Divergenz von Populationen, der möglicherweise auch aquakulturrelevante genomische Informationen trägt, klare phänotypische Unterschiede z.B. in Leistungsparametern bewirken kann. Für zwei phänotypisch unterscheidbare Stämme kanadischer Seesaiblinge (*Salvelinus alpinus*) konnte z.B. gezeigt werden, dass einzelne genetische Prädispositionen (SNPs) so genannter Kandidatengene signifikant mit unterschiedlichen Wachstumsleistungen unter kontrollierten Aquakulturbedingungen korrelieren (TAO UND BOULDING, 2003). In der vorliegenden Studie wurde (1) nur mit anonymen Genmarkern gearbeitet, und (2) es wurde keine kontrollierten Kreuzungen durchgeführt, die für Heritabilitätsstudien nötig sind. Deshalb waren keine direkten Korrelationen von einzelnen Markern und Leistungsparametern berechenbar. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass eine an einzelnen Markern orientierte Evaluierung der in diesem Projekt aufgebauten Stämme dazu führen kann, dass die in den Herkunftsvergleichen gefundenen Unterschiede in Leistungsparametern genomisch angesprochen und für die gezielte Weiterzucht genutzt werden könnten. Auf der Basis der noch im vergangenen Jahr kaum erschwinglichen, jetzt aber immer günstiger werdenden „Next Generation Sequencing“-Methoden wäre eine solche Fortführung der Evaluation von Einzelmarkern möglich. Diese ermöglichen das Kompletengenom vergleichend zu sequenzieren, so weitere Kandidatengene ohne zu großen Aufwand zu detektieren. Das Projekt hat erfolgreich populationsgenetische Unterschiede als Voraussetzung dafür herausgearbeitet und Kandidatenstämme für weiter führende Kreuzungs- und Aufzuchtexperimente angelegt.

Die herausgearbeiteten Unterschiede und Ähnlichkeiten der untersuchten Populationen ergänzen die Arbeiten von BRUNNER et al. (1998) und ENGLBRECHT et al. (2002). In deren Analysen waren allerdings nur verhältnismäßig wenig deutsche Populationen eingegangen, und es standen keine historischen Schuppenproben für einen Vergleich zur Verfügung. An durch Besatz weitgehend unbeeinflussten Populationen hatte BRUNNER et al. (1998) innerhalb des Voralpenraumes drei Verwandtschaftsgruppen identifiziert, die mit der Lage der Seen in den drei großen Flusssystemen Rhone, Rhein und Donau korrelieren. Der Fokus der vorliegenden Studie lag auf deutschen Populationen des Donau-Einzugsgebiets, denn der Bodensee ist der einzige deutsche Seesaiblingssee im Rhein-

Einzug. Erwartungsgemäß gruppierten die analysierten Bodensee-Tiere einheitlich weit entfernt von allen anderen Populationen, es waren allerdings unter den Jährlingen aus dem Hintersee Tiere mit einer Rhein-Einzugsidentität vertreten. Weiter gehende statistisch belastbare Populationsdifferenzierungen innerhalb des Donauraumes ließ der Datensatz von BRUNNER et al. (1998) nicht zu. Es war allerdings die Tendenz zu erkennen, dass von den drei untersuchten Populationen die des Ammersees und des Königssees näher beieinander liegen als zu der des Grundlsees (Salzkammergut, Österreich).

ENGLBRECHT et al. (2002) hatte aus dem Rhein-Einzugsgebiet ebenfalls nur den Bodensee repräsentiert, dafür aber eine größere Anzahl österreichischer Populationen aus dem Donau-Einzugsgebiet. Zu den deutschen Populationen Ammersee (Isar), Starnberger See (Isar) und Königssee/Obersee/Grünsee (Inn) kamen noch aus dem Lech-Einzugsgebiet den Plan- und Heiterwanger See, sowie der Grundl- und den Fuschlsee. Hauptergebnis der damaligen Studie war, dass die Population des Starnberger Sees deutliche Ähnlichkeiten mit der des Grundl- und Fuschlsees aufwies, aus dem nach KLEIN (1988) auch zum Wiederaufbau der Population besetzt worden war. Weiterhin konnten sie zeigen, dass Saiblinge des Königssee-Systems näher mit den Tieren aus dem Salzkammergut (ebenfalls Inn) verwandt waren, als mit denen aus Isar-, Lech- oder Bodensee-Gebiet. Die hier vorgelegte Studie bestätigt diese Arbeit nur teilweise, denn es konnten keine österreichischen Populationen mit einbezogen werden. Ammersee und der Bodensee nehmen eine Sonderstellung ein, wobei die Ammersee-Tiere eindeutig weniger nahe mit den Bodensee-Tieren gruppieren als mit den übrigen Donau-Populationen. Im Gegensatz zu ENGLBRECHT et al. (2002) konnte aber erstmals mit Hilfe der historischen Schuppendaten eine feinere Populationsstruktur im ostbayerischen Bereich erarbeitet werden. Demnach existierte ursprünglich eine Verwandtschaftsgruppe bestehend Starnberger See, Walchensee, Tegernsee und Schliersee sowie eine weitere im Königssee-System.

Die Identifikation dieses Clusters ermöglichte die Bedeutung des Soiernsees als historisch angelegtes ex-situ Reservoir für diese Verwandtschaftsgruppe festzustellen. Ein gezielter Wiederaufbau historisch belegter, quasi-autochthoner Bestände wäre mit dieser und möglicherweise weiteren noch zu identifizierenden Hochgebirgspopulationen denkbar. Die Datengrundlage für weitere Vergleiche wäre mit den vorgelegten Mikrosatelliten-Daten gegeben. Ähnliche Ansätze für Seesaiblinge wurden bereits in Frankreich diskutiert, wo historisch transplantierte Populationen aus dem Rhone-Einzug in das zentralfranzösische Massif Central als ex-situ Reservoir bekannt geworden waren (MACHINO & RIVIER, 2002). Hierbei wäre allerdings die eingeschränkte genetische Diversität dieser aus kleinen Gründerpopulationen hervorgegangenen Populationen zu bedenken.

5 Literaturverzeichnis

- ALBERTSON, R. C., MARKERT, J. A. ET AL. (1999): Phylogeny of a rapidly evolving clade: the cichlid fishes of Lake Malawi, East Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 96(9), 5107-5110.
- ALLENDORF, F. W. AND THORGAARD, G. H. (1984): Tetraploidy and evolution of salmonid fishes. In: *Evolutionary Genetics of Fishes* (ed. B. J. Turner). New York: Plenum.
- ANGERS B., BERNATCHEZ, L. ET AL. (1995): Specific microsatellite loci for brook charr reveal strong population subdivision on a microgeographic scale. *Journal of Fish Biology* 47(Supplement A), 177-185.
- BARTLEY, D.M. (comp./ed.) (2006): *Introduced species in fisheries and aquaculture: information for responsible use and control* (CD-ROM). Rome, FAO
- BEAMISH, F.W.H., JEBBINK, J.-A., ROSSITER, A., NOAKES, D.L.G. (1996): Growth strategy of juvenile lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) in a northern river. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53: 481-489.
- BEHNKE, R.J. (1984): Organizing the diversity of the arctic charr complex. In: *Biology of the Arctic charr, Proceedings of the International Symposium on Arctic Charr* (eds. L. Johnson and B. Burns), University of Manitoba Press: Winnipeg. Pp. 3-21.
- BERNATCHEZ, L. (1996): Réseau de suivi environnemental du complexe la grande. Caractérisation génétique des formes naines et normales de grand corégone du réservoir Caniapiscou et du lac Sérigny à l'aide de marqueurs microsatellites. Rapport présenté par l'université Laval à la vice-présidence Environnement et Collectivités d'Hydro-Québec.
- BERRIL, I.K. & MCCARTHY, I.D. (2008). The growth of a Welsh strain of Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.) and investigations into its *Aquaculture* potential. *Journal of Fish Biology* 72, 2700-2706.
- BIESTER, G. (1986): Leistungsvergleich zwischen Bachforellen (*Salmo trutta* f. *fario* L.) und Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri* R.) unter Feld- und Stationsbedingungen. Diss. Universität Göttingen, 141 S.
- BILIO, M. (2002): domestication and enhancement: critical mid- and long-term research and development needs in aquaculture. *Aquaculture Europe*: 8-12.
- BOHL, M. (Hrsg.) (1999): *Zucht und Produktion von Süßwasserfischen*. Verlags Union Agrar, BLV-Verlagsgesellschaft, ISBN 3-7690-0543-0
- BRÄMICK, U. (2009): *Jahresbericht der deutschen Binnenfischerei 2008*.
- BRÄNNÄS, E., LINNÉR, J. (2000): Growth effects in Arctic charr reared in cold water: Feed frequency, access to bottom feeding and stocking density. *Aquaculture International* 8: 381-389.
- BRÄNNÄS, E., CHAIX, T., NILSON, J., ERIKSSON, L.O. (2005). Has a 4-generation selection programme affected the social behaviour and growth pattern of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*)? *Applied Animal Behaviour Science* 94, 165-178.
- BRUNNER, P. C., DOUGLAS, M. R. ET AL. (2001): Holarctic phylogeography of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* 55(3), 573-586.

- BRUNNER, P.C., DOUGLAS, M.R., 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.
- CAMPBELL, D., DUCHESNE, P. ET AL. (2003): AFLP utility for population assignment studies: analytical investigation and empirical comparison with microsatellites. *Molecular Ecology* 12(7), 1979-1991.
- CAVALLI, L. & CHAPPAZ, R. (1996): Diet, growth and reproduction of the Arctic charr in a high alpine lake. *Journal of Fish Biology* 49, 953-964.
- CAVALLI-SFORZA, L.L. & EDWARDS, A.W.F. (1967): Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* 19, 233-257.
- DANZMANN, R.G., CAIRNEY, M. ET AL. (2005): A comparative analysis of the rainbow trout genome with two other species of fish (Arctic charr and Atlantic salmon) within the tetraploid derivative Salmonidae family (subfamily: Salmoninae). *Genome* 48, 1037-1051.
- DUCHESNE, P. & TURGEON, J. (2009): "FLOCK: a method for quick mapping of admixture without source samples", *Molecular Ecology Resources* DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02571.x
- DUNHAM R.A., MAJUMDAR K., HALLERMAN E., BARTLEY D., MAIR G., HULATA G., LIU ZH., PONGTHANA M., BAKOS J., PENMAN D., GUPTA M., ROTH LISBERG P. & G. HOERSTGEN-SCHWARK (2001): Review of the status of aquaculture genetics. In: NACA (Bangkok) / FAO (Rome) *Aquaculture in the Third Millennium, Technical Proceedings of the Conference in Bangkok, Thailand, 20-25 February 2000*, 141-173.
- ENGBRECHT, C. C., SCHLIEWEN, U. K. ET AL. (2002): The impact of stocking on the genetic integrity of Arctic charr (*Salvelinus*) populations from the Alpine region. *Molecular Ecology* 11(6), 1017-1027.
- ESTOUP, A., ROUSSET, F., ET AL. (1997): Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology*, 7, 339-353.
- EVANNO, G., REGNAUT, S. ET AL. (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software *structure* : a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8), 2611-2620.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, PE & QUATTRO, JM (1992): Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G. & SCHNEIDER, S. (2005): Arlequin 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- FEAP (2005): The Federation of European Aquaculture Producers. Production and Price Report 2001-2008. (<http://www.aquamedia.org/FileLibrary/11/Productionreport2005.pdf>).
- FEAP (2008): The Federation of European Aquaculture Producers. Production and Price Report 2001-2008. Letzter Zugriff: 05.2010 (<http://www.aquamedia.org/FileLibrary/11/Productionreport2008.pdf>).
- FELSENSTEIN, J. (1995): PHYLIP – Phylogeny Inference Package, version 3.57c. University of Washington, Seattle.

- FREYHOF, J. & KOTTELAT, M. (2005): *Salvelinus evasus* sp. n., a charr from deep waters of Lake Ammersee, southern Germany (Teleostei: Salmonidae), with comments on two extinct species. *Revue Suisse de Zoologie* 112(1), 253-269.
- GEIGER, M. F., MCCRARY, J. K. ET AL. (2010): Not a simple case – A first comprehensive phylogenetic hypothesis for the Midas cichlid complex in Nicaragua (Teleostei: Cichlidae: *Amphilophus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56(3): 1011-1024.
- GLEBE, B.D. & TURNER, T. (1993): Alternate commercial rearing strategies for Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.). *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* 93, 2-9.
- GLOVER, K.A., OTTERA, H., OLSEN, R.E., SLINDE, E., TARANGER, G.L., SKAALA Ø. (2009). A comparison of farmed, wild and hybrid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared under farming conditions. *Aquaculture* 286, 203-210.
- GUM, B., GROSS, R. ET AL. (2006): Discriminating the impact of recent human mediated stock transfer from historical gene flow on genetic structure of European grayling *Thymallus thymallus* L. *Journal of Fish Biology* 69(Supplement C), 115-135.
- HANSEN, M. M., BEKKEVOLD, D. ET AL. (2006). Genetic restoration of a stocked brown trout *Salmo trutta* population using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Journal of Applied Ecology* 43, 669-679.
- HECHT, W., FÖRSTER, M. ET AL. (1992): Ökologisch-genetische Untersuchungen am Seesaibling (*Salvelinus alpinus*) im Königssee, Obersee und Grünsee im Nationalpark Berchtesgaden. *Fischbiologie des Königssees: Ökologisch-genetische Untersuchungen am Seesaibling und Gesundheitsstatus der Fische*. Berchtesgaden, Nationalparkverwaltung Berchtesgaden Forschungsbericht 24, 9-62.
- HOLCÍK, J. (1991): Fish introductions in Europe with particular reference to its central and eastern part. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48 (Suppl. 1):13-23.
- HUSON, D. & BRYANT, D. (2006): Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution* 23(2) 254-267.
- JANHUNEN M., N. PEUHKURI, ET AL. (2009): Morphological variability among three geographically distinct Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) populations reared in a common hatchery environment. *Ecology of Freshwater Fish* 18(1), 106-116.
- JANHUNEN, M., PEUHKURI, N. ET AL. (2010): A comparison of growth patterns between a stunted and two large predatory Arctic charr populations under identical hatchery conditions. *Environmental Biology of Fishes* 87(2), 113-121.
- JOBLING, M., JØRGENSEN, E.H., ARNESEN, A.M., RINGØ, E. (1993a): Feeding, growth and environmental requirements of Arctic charr: a review of Aquaculture potential. *Aquaculture International* 1, 20-46.
- JOBLING, M., TVEITEN, H., HATLEN, B. (1998): Cultivation of Arctic charr; an update. *Aquaculture International* 6, 181-196.
- JOHNSON, L. (1980): The arctic charr, *Salvelinus alpinus*. In: *Charrs, Salmonid fishes of the Genus Salvelinus*, (ed E.K. Balon) Dr. W. Junk: The Hague. Pp. 15-98.
- JOHNSTON, G. (2002): *Arctic Charr Aquaculture*, 1st edn. Oxford: Blackwell Publishing.
- JONSSON, B. & JONSSON, N. (2001): Review paper: Polymorphism and speciation in Arctic charr. *Journal of Fish Biology* 58, 605-638.

- JØRGENSEN, E.H., CHRISTIANSEN, J.S., JOBLING, M. (1993): Effects of stocking density on food intake, growth performance and oxygen consumption in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture* 110, 191-204.
- JUNGWIRTH, M. & WINKLER, H. (1984): The temperature dependence of embryonic development of grayling (*Thymallus thymallus*), Danube salmon (*Hucho hucho*), Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and brown trout (*Salmo trutta fario*). *Aquaculture* 38, 315-327.
- KAUSHIK, S.J., LUQUET, P., BLANC, D., PABA, A. (1989) : Studies on the nutrition of Siberian Sturgeon, *Acipenser baeri*. I: Utilization of carbohydrates by sturgeon. *Aquaculture* 76: 97-107.
- KLEIN, M. (1988): Fischereibiologische Untersuchungen am Fischbeständen des Königssees, Obersees und Grünsees im Nationalpark Berchtesgaden. Sonderdruck aus 'Bayerisches Landwirtschaftliches Jahrbuch', 65. Jahrgang, 6, 654–720.
- KLEMETSEN, A. (2010): The charr problem revisited: exceptional phenotypic plasticity promotes ecological speciation in postglacial lakes. *Freshwater Reviews* 3, 49-74.
- KLEMETSEN, A., AMUNDSEN, P.-A., DEMPSON, J.B., JONSSON, B., JONSSON, N., O'CONNELL, M.F., 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.
- KLEMETSEN, A., AMUNDSEN, P.-A. ET AL. (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), 1-59.
- KOSKINEN, M. T., SUNDELL, P. ET AL. (2002): Genetic assessment of spatiotemporal evolutionary relationships and stocking effects in grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae). *Ecology Letters* 5(2), 193-205.
- KOTTELAT, M. & FREYHOF, J. (2007): Handbook of European Freshwater Fishes. Gland, Switzerland, Cambridge, UK, International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN)
- KUSSMAUL, R., HOFMANN, R. ET AL. (1991): Bedrohte Fischarten in Bayern. Bayerische Landesanstalt für Wasserforschung 19, 12-176.
- LEVINSON, G & GUTMAN, G.A. (1987): Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4, 203-221.
- LIEDER, U. (1978): Über Wachstumsberechnungen an Fischbeständen unter industriemäßigen Produktionsbedingungen. *Z. Binnenfischerei DDR* 25 (12): 368-372.
- LINNAEUS, V. CARL (1758): ö. 10. Auflage; Lars Salvius: Stockholm 1758:1-828.
- LUIKART, G., ENGLAND, P. R. ET AL. (2003). The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics* 4(12), 981-994.
- MACHINO, Y. & RIVIER, B. (2002): Le Lac d'Allos (Alpes-de-Haute-Provence), sanctuaire et laboratoire de l'évolution pour l'omble chevalier du Léman (*Salvelinus alpinus*: Salmonidae). *Cybium* 26(3): 173-177.
- MAGNUSSON, K. P. & FERGUSON, M. M. (1987): Genetic analysis of four sympatric morphs of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, from Thingvallavatn, Iceland. *Environmental Biology of Fishes* 20(1), 67-73.

- MAITLAND, P. (1995): World status and conservation of the Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.). *Nordic Journal of Freshwater Research* 71, 113-127.
- MATSCHINER, M. & SALZBURGER, W. (2009): TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics*, 25(15), 1982-1983.
- MAYER, L. (2001): Seesaiblinge (*Salvelinus alpinus*) - Vermehrung, Aufzucht und Produktion in der Teichwirtschaft. *Fischer & Teichwirt* 9, 330-331.
- MEUDT, H. M. & CLARKE, A. C. (2007): Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* 12(3), 106-117.
- MORKRAMER, S. (1983): Leistungsvergleich in- und ausländischer Forellenherkünfte hinsichtlich ihrer Brut-, Mast- und Schlachteigenschaften. Diss. Universität Göttingen: 158 S.
- MORKRAMER, S., HÖRSTGEN-SCHWARK, G. UND LANGHOLZ, H.-J. (1985): Comparison of different European rainbow trout populations under intensive production conditions. *Aquaculture*, 44: 303-320.
- NIELSEN, E. E. & HANSEN, M. M. (2008): Waking the dead: the value of population genetic analyses of historical samples. *Fish and Fisheries* 9(4), 450-461.
- O'REILLY, P.T.; HAMILTON, L.C., ET AL. (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.
- PECHLANER, R. (1984): Historical evidence for the introduction of Arctic charr into High-Mountain lakes of the Alps by man. Seiten 549-557 In: L. Johnson und B.L. Burns (Hrsg.) *Biology of the Arctic charr. Proceedings of the International Symposium on Arctic Charr*, Winnipeg, Manitoba, May 1981, University of Manitoba Press, Winnipeg.
- POMPANON, F.; BONIN, A. ET AL. (2005): Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* 6, 847-859.
- PRESA, P. & GUYOMARD, R. (1996): Conservation of microsatellites in three species of salmonids. *Journal of Fish Biology*, 49, 1326-1329.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M. ET AL. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2), 945-959.
- QUINDT, W. (1980): Schutz des Bestandes bedrohter Fischarten. In: 125 Jahre Landesfischereiverband Bayern e.V. München, 123-142.
- REID, D. P., A. SZANTO, ET AL. (2005): QTL for body weight and condition factor in Atlantic salmon (*Salmo salar*): comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Heredity* 94(2), 166-172.
- REITER, R. (2006): Leistungs- und Qualitätseigenschaften jeweils zweier Herkünfte des Seesaiblings und des Bachsaiblings sowie ihrer Kreuzungen. Schriftenreihe der bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft 19. 194 S.
- RUBIN, J.-F. (1993): The exceptional growth of the Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) in Lake Geneva. *Aquatic Sciences* 55, 76-86.
- SAETHER, B.-S., JOHNSEN, H. K., JOBLING, M. (1996): Seasonal changes in food consumption and growth of Arctic charr exposed to either simulated natural or a 12:12 LD photoperiod at constant water temperature. *Journal of Fish Biology* 48, 1113-1122.

- SAITOU N. & NEI M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 (4), 406–425.
- SANDBLUND, O.T., GUNNARSSON, K., JONSSON, B., LINDEM, T., MAGNUSSON, K.P., MALMQUIST, H.J., SIGURJONSDOTTIR, H., SKULASON, S., SNORRASON, S.S. (1992): The Arctic charr, *Salvelinus alpinus* in Thingvallavatn. *Oikos* 64, 305-351.
- SCHILLINGER, A. (1896): Bericht über die Leistung der Fischzuchtanstalt des Bey. Landes-Fischerei-Vereins zu Starnberg im Jahre 1895. *Allgemeine Fischerei Zeitung*, 21, 139.
- SCHMIDT, G. UND WEDEKIND, H. (2007): Erfassung und Dokumentation der aquatischen genetischen Ressourcen in bayerischen Fischzuchtbetrieben. Projektbericht für die BLE, unveröffentlicht.
- SCHRANK, F.V P. (1798): *Fauna Boica*, durchdachte Geschichte der in Baiern einheimischen und zahmen Tiere. Bd. 1 Nürnberg.
- SCHRANK, F.V P.(1793): *Reise nach den südlichen Gebirgen von Baiern*. München.
- SCHRECKENBACH, K. (1996): Ernährungsbedingte Dysbakterien bei Störhybriden (*Acipenser baeri* x *A. ruthenus*). Tagung der Fachgruppe EAFP, Königswartha, 24.-26. Sept. 1996, Tagungsbericht: 98-110.
- SCHRECKENBACH, K.; KNÖSCHE, R.; EBERT, K. (2001): Nutrient and energy content of freshwater fishes. *Journal of Applied Ichthyology* 17, 142-144.
- SIKAVUOPIO, S.I.; SKYBAKMOEN, S.; SÆTHER, B.S. (2009). Comparative growth study of wild- and hatchery-produced Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) in a coldwater recirculation system. *Aquaculture Engineering* 41, 122-126.
- STEFFENS, W. (1985): *Grundlagen der Fischernährung*. VEB Gustav Fischer Verlag. Jena.
- STEINER, V. (1984): Experiments towards improving the culture of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). In: *Biology of the Arctic charr*, (eds. L. Johnson and B. Burns) University of Manitoba Press: Winnipeg. Pp. 509-521.
- TABACHEK, J. - A. L. (1986): Influence of dietary protein and lipid levels on growth, body composition and utilization efficiencies of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L. *Journal of Fish Biology* 29, 139-151.
- TABERLET, P.; WAITS, L. P. & LUIKART, G. (1999): Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evol.* 14, 323–327.
- TAO, W.J. & BOULDING, E.G. (2003): Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Heredity* 91: 60-69.
- 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. Seiten 21-28. In *DNA Fingerprinting: State of the Science*, eds. S.D.J. Pena, R. Chakraborty, J.T. Epplen & A.J. Jeffreys, Birkhäuser Verlag, Basel.
- TURGEON, J. & BERNATCHEZ, L. (2001): Clinal variation at microsatellite loci reveals historical secondary intergradation between glacial races of *Coregonus artedii* (Teleostei: Corregoninae). *Evolution* 55(11), 2274-2286.

- VØLLESTAD, L.A., L'ABÉE-LUND, J.H. (1994): Evolution of the life history of Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *Evolutionary Ecology*, 8, 315-327.
- VOS, P., HOGERS, R. ET AL. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407-4414.
- WALLACE, J.C., KOLBEINSHAVN A.G., REINSNES T.G. (1988a): The effects of stocking density on early growth in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture* 73, 101-110.
- WEDEKIND, H. (1991): Untersuchungen zur Produktqualität Afrikanischer Welse (*Clarias gariepinus*) in Abhängigkeit von Herkunft, Fütterung, Geschlecht und Schlachalter. Diss. Universität Göttingen, 176 S.
- WEDEKIND, H. (1993): Wachstumsvergleich verschiedener Herkünfte vom Afrikanischen Wels (*Clarias gariepinus*). *Fischer & Teichwirt* 8: 287 - 289.
- WEDEKIND, H. (1996): Product quality in aquaculture species - its Variability and Significance for Processing and Marketing. In: C.-S. Lee (Hrsg.): *Aquaculture in Eastern European Countries, Stara Zagora, Bulgarien, Tungkang Marine Laboratory Conference Proceedings 7 (1996)*.
- WEDEKIND, H. (2002): Bestimmung der Produktqualität bei Fischen. *Schriften des Instituts für Binnenfischerei e.V. Potsdam-Sacrow* 11, 28-29.
- WEDEKIND, H. (2003): Besatzdichte in der Forellenzucht. *AUF AUF, Aquakultur- und Fischereieininformation des Landes Baden-Württemberg*: 7-10.
- WELCOMME, R.L. (1988): International introductions of inland aquatic species. *FAO Fish. Tech. Pap.* 294. 318 p.
- WOLTERS, W.R., BARROWS, F.T., BURR, G.S., HARDY, R.W. (2009). Growth parameters of wild and selected strains of Atlantic salmon, *Salmo salar*, on two experimental diets. *Aquaculture* 297, 136-140.
- WORAM, R. A., MCGOWAN, C. ET AL. (2004): A genetic linkage map for Arctic char (*Salvelinus alpinus*): evidence for higher recombination rates and segregation distortion in hybrid versus pure strain mapping parents. *Genome* 47(2), 304-315.
- WRIGHT, J. (1965): The interpretation of population structure by F-Statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19, 247-251.
- WU, C.-I. (2001): The genic view of the process of speciation. *Journal of Evolutionary Biology* 14(6), 851-865.