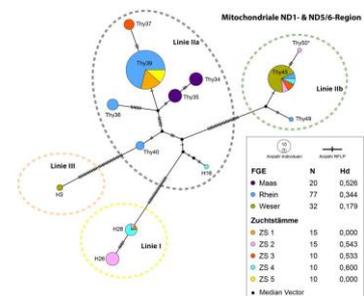


Erfassung der genetischen Variabilität von Äschen-Wildpopulationen (*Thymallus thymallus*) in NRW als Grundlage für die Entwicklung geeigneter Managementstrategien zur nachhaltigen Bestandsentwicklung in NRW

Abschlussbericht

im Auftrag der Bezirksregierung Düsseldorf, Obere Fischereibehörde, Dez. 51



Laufzeit: 15.12.2016 – 30.09.2019

Projektsteuerung:

GWT-TUD GmbH, Freiburger Str. 33
01067 Dresden, Deutschland

Projektbearbeitung

Prof. Dr. Thomas Berendonk

Technische Universität Dresden

01062 Dresden, Deutschland

Weitere Projektbearbeiter/in:

Dr. Dipl.-Biol. Sascha Krenek

M. Sc. Christoph Köbsch

Dipl.-Biol. Thomas Schiller

B. Sc. Thea Hose

M. Sc. Daniel Herzog

TA Ulrike Mogck

Zitiervorschlag: Köbsch, C., Krenek, S., Schiller, T. & Berendonk, T.U. (2019): Erfassung der genetischen Variabilität von Äschen-Wildpopulationen (*Thymallus thymallus*) in NRW als Grundlage für die Entwicklung geeigneter Managementstrategien zur nachhaltigen Bestandsentwicklung in NRW. Institut für Hydrobiologie, Technische Universität Dresden, Dresden, Deutschland, unveröffentlichter Abschlussbericht, 92 S.; im Auftrag der Bezirksregierung Düsseldorf, Obere Fischereibehörde, Dez. 51, Dr. N. Scheifhacken, U. Hasselberg, Finanzierung aus Fischschadensmittel § 40 LFischG NRW.

Danksagung: Der Dank der Autoren gilt der Bezirksregierung Düsseldorf für die Finanzierung und Unterstützung des Projektes. Weiterhin danken wir dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV), den Fischereibehörden in den Regierungspräsidien, den naturschutzrechtlichen Genehmigungsbehörden, den beteiligten selbstständigen Fachkollegen, den involvierten Fischereiverbänden, den beteiligten Aquakulturbetrieben sowie allen involvierten Inhabern von Fischereirechten.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	IV
1 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts	6
2 Planung und Ablauf des Projekts	8
2.1 AP1 – Probenübernahme und Beprobung der Zuchtstämme aus Aquakulturbetrieben	8
2.2 AP2 – Dokumentation der Daten und Entwicklung einer geeigneten Datenbank.....	10
2.3 AP3 – Anpassung und Optimierung der Analyse der genetischen Variabilität von Äschenpopulationen (Wild/Zucht) auf Basis forensischer Abstriche	11
2.4 AP4 – Genetische Analysen	11
2.5 AP5 – Datenauswertung und Bewertung der Ergebnisse.....	11
2.6 AP5 – Berichtslegung.....	12
3 Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde ..	13
3.1 Phylogeographie und Populationsgenetik der Äsche	13
3.2 Methoden zur molekulargenetischen Charakterisierung der Äsche	16
4 Material und Methoden	18
4.1 Untersuchte Herkünfte	18
4.1.1 Probenahme und Elektrobefischung	18
4.1.2 Status-Berichte zu den Herkünften	18
4.2 Molekulare Analysen	25
4.2.1 Verwendung forensischer Abstriche zur DNA-Gewinnung	25
4.2.2 Analyse der mitochondrialen DNA	26
4.2.3 Mikrosatellitenanalyse	29
4.3 Datenanalyse und Statistik.....	32
4.3.1 mtDNA Sequenz- und RFLP-Analyse	32
4.3.2 Mikrosatellitenanalyse	34

5	Ausführliche Darstellung der Ergebnisse.....	37
5.1	Populationsstruktur der Äsche in den erfassten Herkünften	37
5.2	Genetische Diversität der Äsche in den erfassten Herkünften.....	40
5.2.1	Forensische Abstriche zur DNA-Gewinnung	40
5.2.2	mtDNA Sequenz- und RFLP-Analyse	40
5.2.3	Mikrosatellitenanalyse	49
6	Voraussichtliche Nutzung und Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	59
6.1	Bewertung der untersuchten Populationen und Bestände der Äsche.....	59
6.2	Ableitung von Managementmaßnahmen	67
7	Zusammenfassung.....	71
7.1	Deutsche Kurzfassung.....	71
7.2	Abstract	72
8	Gegenüberstellung der geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	74
9	Literaturverzeichnis	76
10	Tabellenverzeichnis	84
11	Abbildungsverzeichnis	85
Appendix	87

1 ZIELE UND AUFGABENSTELLUNG DES PROJEKTS

Die Bundesrepublik Deutschland hat im Jahr 2007 die Nationale Strategie zur biologischen Vielfalt (BMU 2007) beschlossen und bekennt sich damit zu ihrer Verantwortung zum Schutz und Erhalt der Biodiversität. Nach der 1993 in Kraft getretenen Internationalen Biodiversitäts-Konvention (Convention on Biological Diversity, CBD) umfasst der Begriff der Biodiversität die Vielfalt der Ökosysteme, die Vielfalt zwischen und innerhalb von Arten sowie deren genetische Vielfalt (UN 1992). Genetische Variationen sind die Grundlage bei der Entstehung und Weiterentwicklung von Arten im Verlauf der Evolution. Die genetische Diversität kann dabei über das Aussterben oder Überleben von Populationen oder Arten bei sich ändernden Umweltbedingungen entscheiden.

Die Äsche (*Thymallus thymallus*) wird auf Europäischer Ebene aktuell nach der Roten Liste des IUCN als nicht gefährdet eingestuft („least concern“, Freyhof & Brooks, 2011). In Deutschland werden trotz Bestandserholungen bis in die 1990er Jahre, initiiert durch eine massive Verringerung der stofflichen Belastung vieler Fließgewässer, dagegen in jüngerer Zeit erneut Rückgänge vieler Äschenpopulationen beobachtet (u.a. Mueller, Pander & Geist, 2018). Die Äsche gilt daher in Deutschland als stark gefährdet (BfN, 2009). Auch in Nordrhein-Westfalen gingen die Äschenbestände seit den 1990er Jahren zurück, sodass die Art auch hier in der „Roten Listen der gefährdeten Arten“ als stark gefährdet (Tiefeland) bzw. als Art der „Vorwarnliste“ eingestuft wird (LANUV, 2011).

Als Ursachen des Bestandsrückganges kieslaichender, strömungsliebender Fischarten gilt die Gewässerdegradation und dabei insbesondere das Zusammenspiel von Stauregulierung (Potamalisierung von Gewässerabschnitten), der Intensivierung der Landwirtschaft (Sediment- und Nährstoffeintrag) und des Klimawandels (Radinger *et al.*, 2017; Mueller *et al.*, 2018). Aber auch die stoffliche Belastung – als Quelle rückt zunehmend die Landwirtschaft in den Fokus – der potentiellen Laich- und Habitatgewässer (Hübner, 2003) ist oft immer noch problematisch. Weitere Gefährdungsursachen stellen der eingeschränkte Populationsaustausch durch Wanderhindernisse (Kolbinger, 2002; Junge *et al.*, 2014) sowie der Fraßdruck durch Kormorane (*Phalacrocorax carbo sinensis*) oder Gänsesäger (*Mergus merganser*) dar (Schröder, Kohl & Hanfland, 2007; LANUV, 2013; Jepsen, Ravn & Pedersen, 2018).

Die Äsche stellt in der Angelfischerei eine beliebte Fischart dar. Aus diesem Grund spielt auch der Besatz mit Äschen eine Rolle, besonders vor dem Hintergrund der stark zurückgegangenen Bestände. Der Besatz bzw. bestandsstützende Maßnahmen beinhalten jedoch auch die Gefahr der Beeinflussung bzw. Extinktion autochthoner, regional adaptierter Populationen, wenn auch der Erfolg von Fischbesatz für die Angelfischerei art-, größen- und gewässerspezifisch ist (Arlinghaus *et al.*, 2015). Viele Populationen genutzter bzw. bewirtschafteter Fischarten sind in der Vergangenheit durch Besatzmaßnahmen genetisch überprägt und zum großen Teil durch drastische Umweltveränderungen wie Gewässerverschmutzung und Gewässerverbau in ihrer Zusammensetzung und Funktion verändert worden. Natürliche Fischpopulationen wurden dabei z.T. durch Besatz überformt, die genetische Integrität und Diversität entspricht potenziell nicht mehr ihrem ursprünglichen Zustand. Der genetische Effekt von Fischbesatz im Sinne einer mittel- bis langfristigen Etablierung von Besatz-Genmaterial in der betreffenden Population gilt bei Salmoniden als schwer vorhersagbar (Hindar, Ryman & Utter, 1991). Für die Äsche konnten vom Ausbleiben eines Effekts bis hin zum vollständigen Verlust des ursprünglichen Genpools bereits alle denkbaren Szenarien nachgewiesen werden (Gum, Gross & Kuehn, 2006; Meraner, Cornetti & Gandolfi, 2014; Persat *et al.*, 2016).

Ziel der vorliegenden Studie war es, Wildpopulationen der Äsche (*Thymallus thymallus*) Nordrhein-Westfalen genetisch zu charakterisieren. Hierzu sollten mindestens 10 Äschenpopulationen erfasst, molekulargenetisch analysiert und die genetische Variabilität sowie die verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb und zwischen den Populationen erfasst und bewertet werden. Zusätzlich sollten 5 Zuchtstämme genetisch untersucht werden, die für Besatzmaßnahmen in Nordrhein-Westfalen genutzt werden bzw. potenzielle Quellen von Besatzmaterial darstellen.

Auf der Basis dieser Ergebnisse und unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Äschenhilfsprogramms (LANUV, 2017) sollen geeignete Maßnahmen zur langfristigen Arterhaltung und nachhaltigen Bestandsentwicklung sowie für den Erhalt der genetischen Variabilität der Wildpopulationen in den Einzugsgebieten in Nordrhein-Westfalen abgeleitet werden. Übergreifendes Ziel ist es, genetisch eigenständige Populationen der Äsche als „evolutionäre Einheiten“ mit ihren regionalen, genetischen und phänotypischen Eigenheiten zu erhalten und langfristig im Bestand zu sichern. Im Hinblick auf die fischereiliche Bewirtschaftung und gegebenenfalls erforderliche Besatzmaßnahmen steht hierbei eine praxisorientierte Bewertung der genetischen Distanzen bzw. Variabilitäten und Verwandtschaften im Vordergrund.

2 PLANUNG UND ABLAUF DES PROJEKTS

Die inhaltlichen Aufgaben des Projekts wurden in sechs Arbeitspakete (AP1-AP6) unterteilt, deren ursprüngliche Planung und tatsächlicher zeitlicher Ablauf in Abb. 1 dargestellt sind. Im Folgenden wird hauptsächlich auf den inhaltlichen und zeitlichen Ablauf eingegangen, wohingegen die exakte Methodendarstellung der Arbeitspakete unter Kap. 4 erfolgt.

	Vorhabenmonate												2018												2019											
	2017																																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AP 1:	■			■			■																													
AP 2:	■	■						■																												
AP 3:	■	■	■																																	
AP 4:				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
AP 5:				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
AP 6:							■	■	■																											

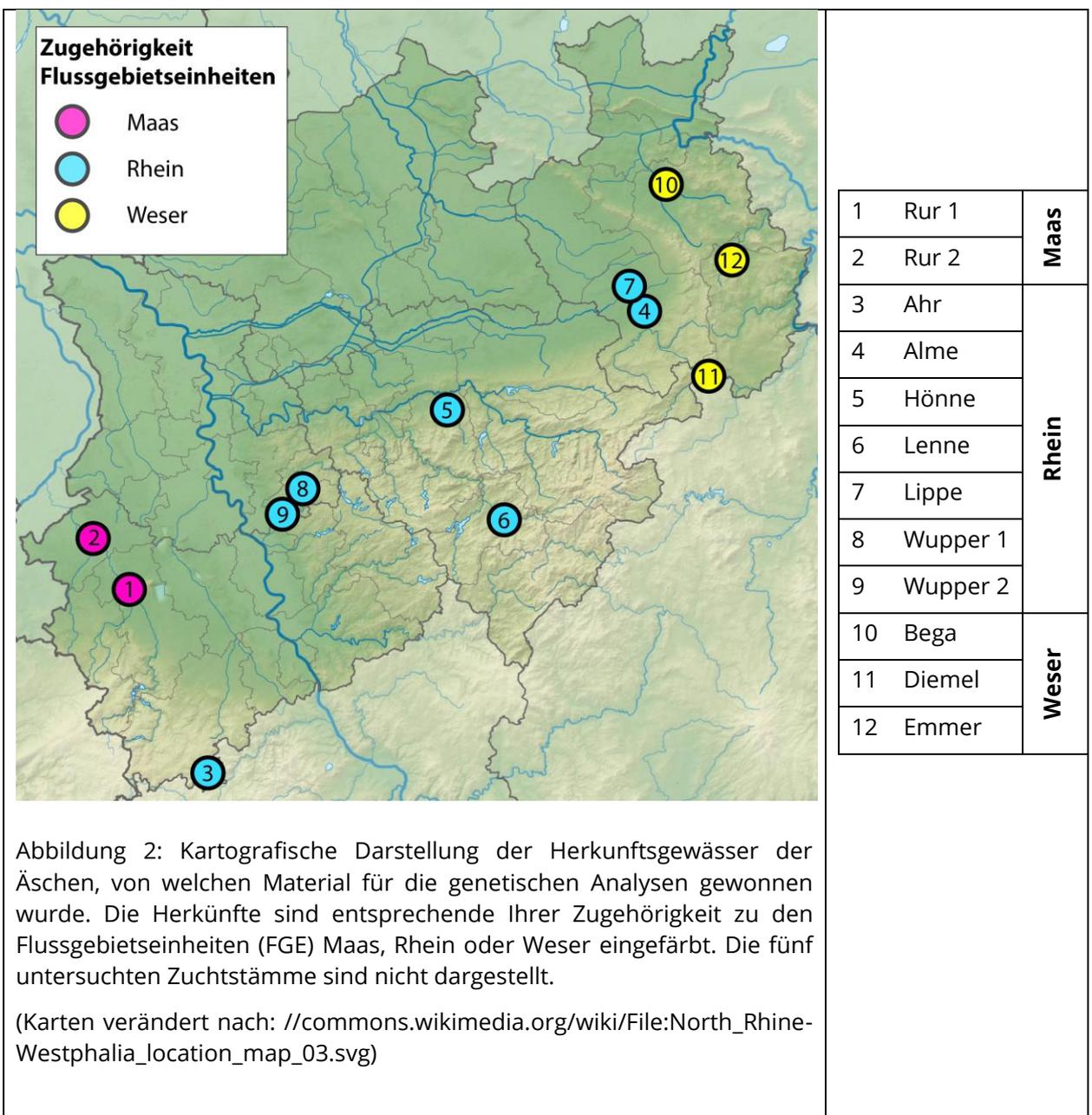
Abbildung 1: Arbeits- und Zeitplan aufgeschlüsselt nach Arbeitspaketen (AP 1-6) des Dienstleistungsangebots.

2.1 AP1 – Probenübernahme und Beprobung der Zuchtstämme aus Aquakulturbetrieben

Ein Großteil der Beprobungen wurden im Zuge der Befischungen im Rahmen des Äschenhilfsprogramms Nordrhein-Westfalen durchgeführt (Herkünfte ‚Rur 1‘, ‚Hönne‘, ‚Lenne‘, ‚Lippe‘, ‚Wupper 1‘, ‚Diemel‘). Die Probenahmen wurden dabei durch verschiedene Akteure (u.a. LANUV, Fischereiverband Westfalen & Lippe e.V., Rheinischer Fischereiverband 1880 e.V.) durchgeführt und die Proben über die Bezirksregierung Düsseldorf an den Auftragnehmer übergeben. Weitere Beprobungen wurden u.a. im Rahmen weiterer Monitoringbefischungen durch den Fischereiverband Westfalen & Lippe e.V., den Rheinischen Fischereiverband 1880 e.V. und die Interessengemeinschaft Untere Rur e.V. durchgeführt (Herkünfte ‚Alme‘, ‚Wupper 2‘, ‚Bega‘, ‚Emmer‘, ‚Rur 2‘). Die Herkunft ‚Ahr‘ wurde durch den Auftragnehmer beprobt. Die fünf in Absprache mit dem Auftraggeber ausgewählten Zuchtstämme der Äsche wurden durch die jeweiligen Aquakulturbetriebe beprobt und postalisch übergeben. Die im Rahmen des Äschenhilfsprogramms gesammelten

Abstrichproben aus der ‚Sülz‘ konnten aufgrund der Protokollage in der Analyse bzw. im Bericht nicht berücksichtigt werden.

Vor allem die Auswahl von geeigneten Zuchtstämmen der Äsche und die Beschaffung der genetischen Proben dauerten wesentlich länger, als im ursprünglichen Zeitplan veranschlagt. Die Probenahmen ließen sich seitens der beteiligten Aquakulturbetriebe schwer in die Arbeitsabläufe vor Ort integrieren bzw. mussten aus betrieblichen Gründen mehrmals verschoben werden. Genetische Proben aus fünf Zuchtstämmen der Äsche lagen im geforderten Umfang somit erst Ende 2018 vor.



2.2 AP2 – Dokumentation der Daten und Entwicklung einer geeigneten Datenbank

Die im Rahmen der genetischen Analysen generierten Daten sowie darüber hinaus verfügbare Daten zu den analysierten Individuen (Bezeichnung der Population, geographische Angaben, Gewässername, -typ, Probestelle mit GIS Kennung, Fischgewässertyp NRW, ökologische Gewässersituation WRRL, wissenschaftlicher Name, morphologische Charakterisierung, Informationen zum fischereilichen Management/Besatz) wurden in einer MS-Excel-basierten Datenbank erfasst.

Tabelle 1: Herkunftsgewässer der Äsche, in denen Proben für die Analyse der genetischen Variabilität gewonnen wurden. Aufgeführt sind die Flussgebietseinheiten (FGE), Landkreise, Gemeinden, Bundesländer und GPS-Koordinaten der Probestellen sowie die Anzahl der gefangenen Individuen (N) und deren durchschnittliche Längen (l), Massen (m) und Korpulenzfaktoren (K) jeweils (\pm Standardfehler).

Herkunft	FGE	Gemeinde	Landkreis	GPS-Koord. (WGS84)	Zeitraum Probenahmen	Ind (N)	\bar{l} (mm)	\bar{m} (g)	\bar{K}
Rur 1	Maas	Jülich	Düren	50°54'2.0"N 6°21'37.4"E	Sep/Okt 2015	33	240,9 ($\pm 21,0$)	-	-
Rur 2	Maas	Heinsberg	Heinsberg	51°5'54.8"N 6°6'4.7"E	Mai-Okt 2017	16	180,6 ($\pm 7,3$)	-	-
Ahr	Rhein	Blankenheim	Euskirchen	50°24'30.1"N 6°41'19.5"E	Jun 2017	30	242,6 ($\pm 20,9$)	170,5 ($\pm 24,2$)	0,74 ($\pm 0,02$)
Alme	Rhein	Amt Schloss Neuhaus	Paderborn	51°44'43.7"N 8°42'29.3"E	Apr 2017	39	258,2 ($\pm 11,5$)	217,4 ($\pm 24,8$)	1,06 ($\pm 0,02$)
Hönne	Rhein	Menden (Sauerland)	Märkischer Kreis	51°25'25.3"N 7°49'13.0"E	Sep 2015	42	158,3 ($\pm 11,7$)	-	-
Lenne	Rhein	Lennestadt	Olpe	51°06'17.9"N 8°05'27.4"E	Nov 2015	29	181,2 ($\pm 13,0$)	-	-
Lippe	Rhein	Paderborn	Paderborn	51°45'08.3"N 8°40'49.7"E	Sep 2015	25	252,8 ($\pm 14,4$)	-	-
Wupper 1	Rhein	Solingen	Solingen	51°9'36.0"N 7°7'59.1"E	Sep 2015	25	274,4 ($\pm 19,0$)	-	-
Wupper 2	Rhein	Solingen	Solingen	51°7'41.8"N 7°3'0.3"E	Mai 2016	28	-	-	-
Bega	Weser	B. Salzuflen	Lippe	52°2'46.7"N 8°46'50.2"E	Okt 2015	31	181,0 ($\pm 11,8$)	-	-
Diemel	Weser	Marsberg	Hochsauer -landkreis	51°28'24.1"N 8°52'21.3"E	Dez 2015	30	261,7 ($\pm 13,7$)	-	-
Emmer	Weser	Steinheim	Höxter	51°51'59.5"N 9°6'2.6"E	Nov 2017	34	184,1 ($\pm 10,2$)	-	-
ZS 1	Die Daten zu den untersuchten Zuchtstämmen liegen dem Auftraggeber vor.				Nov 2017	40	160,3 ($\pm 2,9$)	-	-
ZS 2					Apr 2017	36	384 ($\pm 5,5$)	-	-
ZS 3					Okt 2017	35	165,7 ($\pm 4,0$)	41,3 ($\pm 14,2$)	0,89 ($\pm 0,02$)
ZS 4					Apr 2018	30	354 ($\pm 7,7$)	419,4 ($\pm 25,4$)	0,92 ($\pm 0,01$)
ZS 5					Nov 2018	36	-	-	-

2.3 AP3 – Anpassung und Optimierung der Analyse der genetischen Variabilität von Äschenpopulationen (Wild/Zucht) auf Basis forensischer Abstriche

Forensische Schleimhautabstriche als nicht-invasives Verfahren zur DNA-Gewinnung wurden bereits im Rahmen der Erfassung der genetischen Variabilität von Wildpopulationen der Barbe (*Barbus barbus*) getestet und etabliert (Berendonk *et al.*, 2015). Auch in dieser Studie zeigte die extrahierte DNA der Äsche eine für die durchgeführten Analysen ausreichende Qualität und Quantität. Das Protokoll zur Entnahme, Lagerung und Extraktion der Proben aus forensischen Schleimhautabstrichen konnte im Rahmen dieser Studie noch weiterentwickelt werden (siehe Kapitel 4.1.1 & 4.2.1).

2.4 AP4 – Genetische Analysen

Für die Mikrosatelliten-Analyse wurde ein Gen-Analysator (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer) angeschafft. Die Analyse der Mikrosatelliten-Marker mittels eigenen Gen-Analysators ermöglichte die optimale Etablierung und Testung der Multiplex-Sets und machte diese zielgerichteter und weniger zeitintensiv, im Vergleich zur Analyse durch Unterauftragsnehmer. Dies war gerade im Hinblick auf die für die zu verwendenden Marker von besonderer Bedeutung. Diese bestehen vorwiegend aus Dinukleotid-Repeats, welche anfällig für sog. „Stutter-Peaks“ sind und somit zu fehlerhaften Fragmentlängen führen können. Durch die optimale Etablierung wurde die spätere Auswertung erleichtert und weniger fehleranfällig. Aufgrund erheblicher Verzögerungen bei der Beschaffung des Geräts und zeitaufwändigen Etablierungs- und Wartungsarbeiten wurde die Analyse der Mikrosatellitenmarker allerdings zusätzlich verzögert. Weiterhin kam es zu vielen Ausfällen der Fragmentlängenanalysen (siehe Kapitel 4.4.3.).

2.5 AP5 – Datenauswertung und Bewertung der Ergebnisse

Parallel zur vorliegenden Studie wurde durch den Auftragnehmer auch eine bundesweite Studie zur genetischen Variabilität der Äsche durchgeführt (Köbsch *et al.*, in Vorbereitung). In Absprache mit dem Auftraggeber wurde eine Diskussion und Beurteilung der Ergebnisse für Nordrhein-Westfalen in einem größeren geografischen Kontext angestrebt. Durch den Vergleich mit Äschenpopulationen aus anderen Flussgebietseinheiten (FGE) bzw. anderen Teilen der untersuchten FGEs wird die Aussagekraft der Ergebnisse erhöht. Die größere Datenbasis über

Bundeslandgrenzen hinaus ermöglicht eine fundierte Bewertung und Ableitung von Maßnahmen zur langfristigen Arterhaltung und nachhaltigen Bestandsentwicklung sowie für den Erhalt der genetischen Variabilität der Wildpopulationen in Nordrhein-Westfalen.

Die Auswertung der Ergebnisse konnte zwar teils schon vor Beendigung der Laborarbeiten begonnen werden, für den populationsgenetischen Vergleich war jedoch das Vorliegen aller bundesweit erhobenen molekulargenetischen Daten notwendig, weshalb diese Analysen erst ab Mitte 2019 durchgeführt werden konnten.

Das technisch bedingte Auftreten von sogenannten „Stutter-Peaks“ (Amplifikationsfehler während der PCR) war eines der Hauptprobleme bei der Analyse der Daten (siehe Kapitel 4.5). Die Bestimmung der Fragmentlängen war hierbei nur schwer automatisierbar bzw. häufig fehlerbehaftet, weshalb die Rohdaten der Fragmentlängenanalysen aller Individuen und Loci manuell kuratiert und ausgewertet werden mussten. Zusammen mit den o.g. projektübergreifenden Abhängigkeiten zur Gewährleistung und den zahlreichen Ausfällen bei der Mikrosatellitenamplifizierung ergab sich daraus eine zeitliche Verzögerungen von über 17 Monaten gegenüber dem ursprünglichen Zeitplan.

2.6 AP5 – Berichtslegung

Fristgerecht wurden dem Auftraggeber erste Projektergebnisse schriftlich als Zwischenbericht (17 Seiten) in digitaler Form übergeben. Aufgrund der Verlängerung der Projektlaufzeit wurde im August 2018 ein zweiter Zwischenbericht in digitaler Form vorgelegt, der die Ergebnisse der mitochondrialen Analysen vorstellte und einige vorläufige Empfehlungen in Bezug auf Bewirtschaftungsfragen ableitete.

Der Abschlussbericht in Form einer ausführlichen Langfassung (92 Seiten), sowie einer Kurzfassung und eines Abstracts in englischer Sprache wurden vertragsgemäß angefertigt und dem Auftraggeber fristgerecht in digitaler und gedruckter Form einschließlich der Rohdaten übergeben.

3 WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER STAND AN DEN ANGEKNÜPFT WURDE

3.1 Phylogeographie und Populationsgenetik der Äsche

Die Äsche ist europaweit in stark strömenden, sommerkühlen Fließgewässern verbreitet. Ihre geographische Verbreitung reicht dabei von Nordwestrussland und der Ukraine im Osten bis nach Westfrankreich und England im Westen, sowie von Skandinavien im Norden bis zum Balkan im Süden (Kottelat & Freyhof, 2007). Im subkontinentalen Gebiet Deutschlands findet sich die Äsche vor allem in Flüssen der Mittelgebirgslagen und der Voralpenregion. Im (westlichen) atlantisch geprägten Lebensraum, stellen Flüsse in mittelgebirgsnahen Lagen, wie dem nördlichen Harzvorland, der Lüneburger Heide oder der westfälischen Tieflandbucht, geeignete Gewässer dar (BfN, 2013). Auf dem Gebiet von Nordrhein-Westfalen sind Gewässer der FGEs Maas, Rhein und Weser Teil des natürlichen Verbreitungsgebiets der Äsche. Inwieweit die Äsche historisch in Gewässern der FGE Ems bzw. Flüssen der IJssel- und Zuider-See vorkam, ist unklar (Hoffmann, 2010).

Wichtige Erkenntnisse zur populationsgenetischen Struktur und zur Phylogeographie der Äsche in Europa auf Basis mitochondrialer Marker finden sich in den Arbeiten von Koskinen *et al.* (2000), Gross *et al.* (2001), Weiss *et al.* (2002), Gum, Gross & Kuehn (2005), Gum *et al.* (2006), Marić *et al.* (2011, 2012, 2014) und Meraner & Gandolfi (2012). Eine Synthese dieser und weiterer Studien findet sich im Review von Gum, Gross & Geist (2009).

Erste Informationen zur postglazialen Ausbreitung anhand mitochondrialer Markergene von *Thymallus thymallus* lieferte dabei die Studie von Koskinen *et al.* (2000). Die Studie umfasste 561 Individuen aus 28 Populationen, wobei der größte Anteil aus Nordeuropa (v.a. Finnland und Schweden) stammte. Zwei der untersuchten Populationen stammten aus Flussgebietseinheiten (FGE) innerhalb Deutschlands (Elbe und Donau). Anhand von RFLP-Analysen und Sequenzvariationen von ND5/6 und Cytochrom b/D-loop Daten wurden 27 Composite-Haplotypen erkannt. Es konnten drei unterschiedliche mitochondriale Hauptlinien im europäischen Verbreitungsgebiet beschrieben werden. Diese erstrecken sich über Nordeuropa (Linie I), Mittel-/Osteuropa (Linie II) und südlichere Regionen, speziell das Donaueinzugsgebiet (Linie III) (Koskinen *et al.*, 2000).

Eine weitere Untersuchung zur genetischen Differenzierung der Äsche innerhalb Deutschlands wurde von Gross *et al.* (2001) anhand von 4 bayerischen Populationen durchgeführt. Durch RFLP-Analysen der mitochondrialen ND1- und ND3/4-Region sowie des nukleären GH-1 Gens, wurden 6 Composite-Haplotypen im bayrischen Gebiet erkannt, welche sich in drei Gruppen einteilen. Gruppe I umfasste Haplotypen, welche sich in allen bayrischen FGE wiederfinden. Gruppe II enthielt mit einer Ausnahme ausschließlich Individuen aus der FGE Donau und Gruppe III (Außengruppe) umfasste Individuen aus Estland. Diese Studie fand ebenfalls Hinweise auf einen Genfluss zwischen den Flussgebietseinheiten Rhein/Main, Elbe und Donau, der durch Sekundärkontakte nach der (post-)glazialen Differenzierung der genetischen Linien ermöglicht wurde (Gross *et al.*, 2001).

Gum *et al.* (2005) legten den Fokus ihrer Untersuchungen auf Mittel- und Nordeuropa und die Kontaktzonen der bis dahin bekannten mitochondrialen Linien. Anhand von RFLP- und Mikrosatelliten-Analysen von 780 Individuen aus 29 Standorten konnten 30 Composite-Haplotypen erfasst werden. Dabei ergaben sich vier mitochondriale Hauptlinien, welche anhand der ND1- und ND5/6-Region erhoben wurden. Linie I und III waren identisch mit den von Koskinen *et al.* (2000) beschriebenen Regionen. Gum *et al.* (2005) konnten die von Koskinen *et al.* (2000) beschriebene Linie II (Mittel-/Osteuropa) in Südwest-/Westeuropa (IIa) und Zentral-/Osteuropa (IIb) unterteilen. Linie IIa enthält Populationen der FGE Rhein/Main und aus Gewässern Englands. Die Populationen von Linie IIb finden sich ausgehend von den FGE Elbe und Weser in östlicher Richtung bis in Gewässer Litauens und nördlicher Richtung bis in Gewässer Südkandinaviens wieder. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass es einen Sekundärkontakt zwischen den Linien in bestimmten Gebieten Deutschlands als auch in anderen europäischen Regionen gegeben hat (Gum *et al.*, 2005). Unter Hinzunahme einer weiteren Studie (Sušnik, Snoj & Dovč, 2001), welche die phylogeographische Verbreitung der Äsche in nördlich gelegenen Flusssystemen der Adria untersucht, definieren Gum *et al.* (2009) insgesamt fünf genetische Hauptlinien der Äsche im europäischen Verbreitungsgebiet.

Im Gegensatz zu diesen größtenteils auf RFLP-Analysen der ND1- bzw. ND5/6-Region beruhenden Studien, untersuchten Weiss *et al.* (2002) die Phylogeographie der Europäischen Äsche auf Basis der mitochondrialen Kontrollregion und flankierender tRNA Gene. Die Studie umfasste Populationen aus ganz Europa, setzte den Fokus aber auf das südliche und südwestliche Verbreitungsgebiet. Es konnten acht genetische Linien festgestellt werden, wobei für Deutschland vor allem folgende

Linien von Bedeutung sein dürften: „Danube drainage (Northern Alps)“, „Mixed Rhine/Danube drainages“ und „Mixed Central Europe (Rhine/Rhone/Denmark)“. Die komplexe genetische Struktur ist ein Hinweis auf das Vorhandensein mehrerer disjunkter Refugien im süd- und mitteleuropäischen Verbreitungsgebiet (Weiss *et al.*, 2002). Im Rahmen von weiteren Untersuchungen zur genetischen Variation der Europäischen Äsche in der Balkanregion und im Wolga-/Ural-Einzugsgebiet konnten weitere (Sub-) Linien beschrieben werden (Marić *et al.*, 2011, 2012, 2014).

Mikrosatelliten-basierte Studien zur Populationsgenetik der Äsche zeigten eine im Vergleich zu anderen Fischarten geringe genetische Diversität innerhalb der Populationen. Gleichzeitig wurde ein hohes Maß an genetischer Strukturierung zwischen Populationen gefunden (mittlerer F_{ST} -Wert für Äschenpopulationen in Europa = 0,367; Gum *et al.*, 2005), wobei in vielen Fällen selbst benachbarte Populationen innerhalb derselben Einzugsgebiete signifikant voneinander differenziert sind (Gum *et al.*, 2003, 2005, 2009; Vonlanthen & Schlunke, 2015; Vonlanthen & Hefti, 2016). Die auf Basis der mitochondrialen Marker definierten genetischen Linien konnten auch auf Basis von Mikrosatellitenanalysen klar voneinander abgegrenzt werden (Gum *et al.*, 2009).

In Nordrhein-Westfalen wurden Äschenpopulationen bisher nur in einer Studie von Kühn (2011) genetisch charakterisiert. Diese untersuchten Äschen aus Gewässern der FGE Weser (Bega/Werre, Emmer, Nethe) und der FGE Rhein (Afte, Alme, Broker Kanal) im Regierungsbezirk Detmold hinsichtlich mitochondrialer und Mikrosatelliten-Marker. Dabei zeigte sich ähnlich wie bei anderen Populationen in Deutschland eine relativ geringe Diversität innerhalb der untersuchten Wildpopulationen.

Hinsichtlich der festgestellten genetischen Distanzen lassen sich die Populationen auf der Basis beider Markersystem klar zwischen den FGEs abgrenzen. Kühn (2011) definiert die FGEs Rhein und Weser daher als getrennte ‚evolutionarily significant units‘ (ESU), die dementsprechend getrennt zu bewirtschaften sind. In Bezug auf die mitochondriale RFLP-Analyse (ND1- & ND5/6-Region) konnte nur in der Population der Werre eine Durchmischung zwischen Haplotypen der Linien IIa und IIb gefunden werden, welches entweder auf nacheiszeitliche Sekundärkontakte oder FGE-übergreifende Besatzmaßnahmen hinweist. Die Studie von Kühn (2011) untersuchte darüber hinaus zwei Zuchtstämme der Äsche, um deren Eignung als Besatzquelle zur Bestandsstützung der untersuchten Wildpopulationen zu evaluieren. Dabei zeigte sich, dass ein Zuchtstamm sich grundsätzlich als Besatzquelle für die untersuchten

Populationen der FGE Weser eignete, während die Verwendung des zweiten Zuchtstamms aufgrund einer 89-100%igen Haplotypenzugehörigkeit zur mitochondrialen Hauptlinie I (Nord-/Nordosteuropa) nicht empfohlen werden konnte. Methodisch folgte Kühn (2011) der Studie von Gum *et al.* (2005) und die Ergebnisse sollten damit sehr gut mit denen der vorliegenden Studie vergleichbar sein.

Aufgrund ihrer Beliebtheit in der Angelfischerei und vor dem Hintergrund zurückgehender Bestände wurden und werden Besatzmaßnahmen mit Äschen in vielen Gewässern vorgenommen (Kottelat & Freyhof, 2007). Die mittel- bis langfristigen Folgen dieser oft intensiven Besatzmaßnahmen sind aus genetischer Sicht allerdings höchst unterschiedlich. So konnten in Äschenpopulationen im Einzugsgebiet der Vienne (Loire) trotz jahrzehntelanger Besatzmaßnahmen mit Äschen aus dem Rhein/Rhone-Einzugsgebiet und trotz fragmentierter Populationen in degradierten Gewässerabschnitten keine Einkreuzung gebietsfremder Haplo- oder Genotypen detektiert werden (Persat *et al.*, 2016). Ähnliches wurde für die Äschenpopulation der Drau in Österreich und einige Populationen im adriatischen Raum festgestellt (Meraner, Unfer & Gandolfi, 2013; Meraner *et al.*, 2014). Auf der anderen Seite konnte besonders im adriatischen Raum aber auch ein kompletter Verlust des ursprünglichen Genpools als Folge intensiver Besatzmaßnahmen mit allochthonem Besatzmaterial nachgewiesen werden (Meraner & Gandolfi, 2012; Meraner *et al.*, 2014). In Deutschland wurden in einigen bayerische Populationen der Äsche substantielle Einkreuzung gebietsfremder Genotypen detektiert (Gum *et al.*, 2006). Köbsch *et al.* (in Vorbereitung) fanden Hinweise auf die Einkreuzung von gebietsfremden Genotypen in den Äschenpopulationen der Ilm, der Gera (beide FGE Weser) und der Isar (FGE Donau).

3.2 Methoden zur molekulargenetischen Charakterisierung der Äsche

Ähnlich dem Vorgehen in einer vorangegangenen Studie zur genetischen Diversität der Barbe wurde DNA aus forensischen Schleimhautabstrichen extrahiert (Berendonk *et al.*, 2015). Dabei wurde im Rahmen dieser Studie sowie in der parallel durchgeführten bundesweiten Untersuchung der genetischen Vielfalt der Äsche (Köbsch *et al.*, in Vorbereitung) das Protokoll zur Entnahme, Lagerung und Extraktion der Proben noch weiterentwickelt (Details siehe Kapitel 4).

Die Analyse mitochondrialer Marker eignet sich aufgrund geringerer Mutationsraten gegenüber Mikrosatelliten-Marker zur Erkennung großräumiger, phylogeographischer Muster und zur Beschreibung historischer Genflüsse. Um eine Einordnung der gewonnenen Erkenntnisse in die bereits bekannten genetischen Linien nach Gum *et al.* (2005) bzw. Weiss *et al.* (2002) zu ermöglichen, war die Verwendung der in dieser Studie benutzten RFLP-Analyse der mitochondrialen ND1 & ND5/6-Region und die Sequenzierung der Kontrollregion (CR) durch den Auftraggeber vorgegeben.

Im Gegensatz zu den mitochondrialen Markern dienen nukleäre Mikrosatelliten-Marker zur Analyse der genetischen Diversität auf Populationsebene bzw. zwischen Populationen auf kleinerer geografischer Skala und zur Beurteilung rezenter Genflusses. Um auch hier eine Einordnung der Ergebnisse gegenüber u.a. Gum *et al.* (2005) zu ermöglichen wurden folgende 10 Mikrosatelliten-Marker in der vorliegenden Studie verwendet: BFR0004, BFR0005, BFR0006, BFR0009, BFRO010, BFRO011, F-43, Ocl-8, Ogo-2, One-9. Zusätzlich wurden ohne weitere Kosten für den Auftraggeber zwei weitere Mikrosatelliten-Marker untersucht (BFRO007, SSOSL311).

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Untersuchte Herkünfte

4.1.1 Probenahme und Elektrobefischung

Der Fang der Äschen und die Probenahme erfolgten im Rahmen von Monitoringbefischungen bzw. im Fall der Zuchtstämme im Rahmen von fischereiwirtschaftlichen Maßnahmen der Aquakulturbetriebe. In einem Fall („Rur 2“) wurden die beprobten Äschen von Fischereiausübungsberechtigten im Rahmen der Angelfischerei gefangen. Die Details zur angewandten Methodik der Elektrofischerei im Rahmen des Äschenhilfsprogramms sind dem entsprechenden Abschlussbericht zu entnehmen (LANUV, 2017). In der Ahr wurde eine Monitoringbefischung nach Genehmigung durch und in Abstimmung mit den verantwortlichen Fischerei- und Naturschutzbehörden durch den Auftragnehmer durchgeführt. Die Befischung wurde als Watbefischung mit Hilfe eines Elektrofischfanggerätes (EFGI 650, Firma Bretschneider Spezialelektronik) durch entsprechend ausgebildete Fachkräfte mit Elektrofischereischein und Fischereischein durchgeführt. Die Elektrobefischung führt bei schonender und vor allem der Fischart und den Gewässerverhältnissen angepasster Durchführung zu keiner dauerhaften Schädigung der Fische (Rümmler, Schreckenbach & Pfeiffer, 1998). Die gefangenen Individuen wurden in einem Fischtransportbehälter gesammelt und anschließend schonend vermessen und gewogen. Die Berechnung des Korpulenzfaktors erfolgte nach Heincke (1908).

Während der Vermessung wurden mit einem Abstrichtupfer (forensic swab, Sarstedt AG) insgesamt zwei oder drei Abstriche im Kopfbereich, an den Körperflanken und/oder aus der Maulhöhle (Bukkalprobe) entnommen. Dabei wird der Tupfer auf der Haut (im Kopfbereich bzw. seitliche Körperoberfläche) mit sanftem Druck gerieben und dabei leicht gedreht, so dass der komplette Wattekopf als Trägerfläche genutzt wird. Beim Abstrich werden so Epithelzellen zur Isolierung von DNA gewonnen. Insgesamt standen Proben von 539 Individuen für die Analyse zur Verfügung.

4.1.2 Status-Berichte zu den Herkünften

In diesem Kapitel werden die Informationen zu den 12 untersuchten Wildpopulationen, in welchen Äschen gefangen werden konnten, in Steckbriefen

zusammengefasst. Bei den befischten Gewässern wurde der Fließgewässertyp angegeben, welcher im Bereich der beprobten Gewässerstrecke vorlag. Informationen zur Einordnung des beprobten Gewässers in das Gesamtflusssystem lassen sich über die Angabe ‚Abfluss in/über‘ sowie über die Angaben zur Gewässerlänge und Einzugsgebietsgröße ermitteln. Die Informationen zur fischereilichen Bewirtschaftung sowie zum Besatz mit Äschen wurden über die Fischerei- und Naturschutzbehörden sowie die ortsansässigen Anglervereine, Fischerei- und Gewässergenossenschaften erhoben oder dem Abschlussbericht des Äschenhilfsprogramms (LANUV, 2017) entnommen. Für den Fall, dass Informationen zum Besatz mit Äschen vorlagen, sind diese unter ‚Besatz mit Äschen‘ vermerkt, wenn der Besatz durch die erfolgreich kontaktierten Akteure ausgeschlossen wurde ist dies mit ‚nein‘ vermerkt. Für die Fälle, in denen keine (ausreichenden) Informationen verfügbar waren, wurde der Besatz mit Äschen als ‚unbekannt‘ gekennzeichnet.

Herkunft - Gewässer	Rur 1
Population (AGRDEU-Nr.)	THY-012
Gewässertyp nach WRRL ¹	Typ 9 : Silikatische, fein- bis grobmaterialreiche Mittelgebirgsflüsse
Ökologischer Zustand n. WRRL ⁶	unbefriedigend
Fischgewässertyp NRW ⁴	oberer Barbentyp Mittelgebirge
Abfluss über/in	Maas → Hollands Diep → Nordsee
Gewässerlänge (km) ³	164,5
Einzugsgebietsgröße (km ²) ³	2360,9
Flussgebietseinheit	Maas
Landkreis ²	Düren
Gemeinde ²	Jülich
Bundesland ²	Nordrhein-Westfalen
GPS-Koordinaten (WGS84)	50°54'2.0"N 6°21'37.4"E
Fischereiliche Bewirtschaftung	Angelfischerei
Besatz mit Äschen	Nein. Es wurde auch in der Vergangenheit kein Besatz vorgenommen (Aussage von H.-J. Jochims, Interessengemeinschaft Untere Rur e.V.).
Wildpopulation nach GAK-Liste ⁵	nein

Herkunft - Gewässer	Rur 2
Population (AGRDEU-Nr.)	THY-013
Gewässertyp nach WRRL ¹	Typ 9 : Silikatische, fein- bis grobmaterialreiche Mittelgebirgsflüsse
Ökologischer Zustand n. WRRL ⁶	mäßig
Fischgewässertyp NRW ⁴	oberer Barbentyp Mittelgebirge
Abfluss über/in	Maas → Hollands Diep → Nordsee
Gewässerlänge (km) ³	164,5
Einzugsgebietsgröße (km ²) ³	2360,9
Flussgebietseinheit	Maas
Landkreis ²	Heinsberg
Gemeinde ²	Heinsberg
Bundesland ²	Nordrhein-Westfalen
GPS-Koordinaten (WGS84)	51°5'54,8"N 6°6'4,7"E
Fischereiliche Bewirtschaftung	Angelfischerei
Besatz mit Äschen	Nein. Es wurde auch in der Vergangenheit kein Besatz vorgenommen (Aussage von H.-J. Jochims, Interessengemeinschaft Untere Rur e.V.).
Wildpopulation nach GAK-Liste ⁵	nein

Herkunft - Gewässer	Ahr
Population (AGRDEU-Nr.)	THY-014
Gewässertyp nach WRRL ¹	Typ 9 : Silikatische, fein- bis grobmaterialreiche Mittelgebirgsflüsse
Ökologischer Zustand n. WRRL ⁶	gut
Fischgewässertyp NRW ⁴	unterer Forellentyp Mittelgebirge
Abfluss über/in	Rhein → Nordsee
Gewässerlänge (km) ³	85,1
Einzugsgebietsgröße (km ²) ³	896,4
Flussgebietseinheit	Rhein
Landkreis ²	Euskirchen
Gemeinde ²	Blankenheim
Bundesland ²	Nordrhein-Westfalen
GPS-Koordinaten (WGS84)	50°24'30,1"N 6°41'19,5"E
Fischereiliche Bewirtschaftung	Angelfischerei
Besatz mit Äschen	Nein. Isolierter Oberlauf (abgetrennt durch nicht durchgängiges Wehr), in dem nach Aussagen der Pächter noch nie Äschenbesatz vorgenommen wurde (Aussage der Pächter H. Rütz und G. Burock).
Wildpopulation nach GAK-Liste ⁵	nein

Herkunft - Gewässer		Alme
Population (AGRDEU-Nr.)		THY-015
Gewässertyp nach WRRL ¹	Typ 9.1: Karbonatische, fein- bis grobmaterialreiche Mittelgebirgsflüsse	
Ökologischer Zustand n. WRRL ⁶		mäßig
Fischgewässertyp NRW ⁴		Äschentyp Karstbereiche
Abfluss über/in		Lippe → Rhein → Nordsee
Gewässerlänge (km) ³		59,4
Einzugsgebietsgröße (km ²) ³		763,0
Flussgebietseinheit		Rhein
Landkreis ²		Paderborn
Gemeinde ²		Paderborn
Bundesland ²		Nordrhein-Westfalen
GPS-Koordinaten (WGS84)		51°45'08.3"N 8°40'49.7"E
Fischereiliche Bewirtschaftung		Angelfischerei
Besatz mit Äschen	Ja, Besatz aus eigenem Zuchtstamm (ZS 1), der mit Äschen aus der Alme aufgebaut wurde.	
Wildpopulation nach GAK-Liste ⁵		nein

Herkunft - Gewässer		Hönne
Population (AGRDEU-Nr.)		THY-018
Gewässertyp nach WRRL ¹	Typ 9 : Silikatische, fein- bis grobmaterialreiche Mittelgebirgsflüsse	
Ökologischer Zustand n. WRRL ⁶		unbefriedigend
Fischgewässertyp NRW ⁴		Äschentyp Mittelgebirge
Abfluss über/in		Ruhr → Rhein → Nordsee
Gewässerlänge (km) ³		33,4
Einzugsgebietsgröße (km ²) ³		262,2
Flussgebietseinheit		Rhein
Landkreis ²		Märkischer Kreis
Gemeinde ²		Menden (Sauerland)
Bundesland ²		Nordrhein-Westfalen
GPS-Koordinaten (WGS84)		51°25'25,3"N 7°49'13,0"E
Fischereiliche Bewirtschaftung		Angelfischerei
Besatz mit Äschen		unbekannt
Wildpopulation nach GAK-Liste ⁵		nein

Herkunft - Gewässer	Lenne
Population (AGRDEU-Nr.)	THY-020
Gewässertyp nach WRRL ¹	Typ 9.2: Große Flüsse des Mittelgebirges
Ökologischer Zustand n. WRRL ⁶	unbefriedigend
Fischgewässertyp NRW ⁴	Äschentyp Mittelgebirge
Abfluss über/in	Ruhr → Rhein → Nordsee
Gewässerlänge (km) ³	129,0
Einzugsgebietsgröße (km ²) ³	1354,6
Flussgebietseinheit	Rhein
Landkreis ²	Olpe
Gemeinde ²	Lenne
Bundesland ²	Nordrhein-Westfalen
GPS-Koordinaten (WGS84)	51°06'17.9"N 8°05'27.4"E
Fischereiliche Bewirtschaftung	Angelfischerei
Besatz mit Äschen	aktuelle Situation unbekannt, Initialbesatz in den 1970er Jahren in einem angrenzenden Abschnitt (Völker et al. 2010)
Wildpopulation nach GAK-Liste ⁵	nein

Herkunft - Gewässer	Lippe
Population (AGRDEU-Nr.)	THY-021
Gewässertyp nach WRRL ¹	Typ 15: Sand- und lehmgeprägte Tieflandflüsse
Ökologischer Zustand n. WRRL ⁶	mäßig
Fischgewässertyp NRW ⁴	Äschentyp Lippe
Abfluss über/in	Rhein → Nordsee
Gewässerlänge (km) ³	220,3
Einzugsgebietsgröße (km ²) ³	4890,0
Flussgebietseinheit	Rhein
Landkreis ²	Paderborn
Gemeinde ²	Paderborn
Bundesland ²	Nordrhein-Westfalen
GPS-Koordinaten (WGS84)	51°45'08.3"N 8°40'49.7"E
Fischereiliche Bewirtschaftung	Angelfischerei
Besatz mit Äschen	Ja, Besatz mit Äschen aus Zuchtstamm ,ZS 1'
Wildpopulation nach GAK-Liste ⁵	nein

Herkunft - Gewässer	Wupper 1	
Population (AGRDEU-Nr.)		THY-024
Gewässertyp nach WRRL ¹	Typ 9 : Silikatische, fein- bis grobmaterialreiche Mittelgebirgsflüsse	
Ökologischer Zustand n. WRRL ⁶		unbefriedigend
Fischgewässertyp NRW ⁴		Äschentyp Mittelgebirge
Abfluss über/in		Rhein → Nordsee
Gewässerlänge (km) ³		115,8
Einzugsgebietsgröße (km ²) ³		813,4
Flussgebietseinheit		Rhein
Landkreis ²		Solingen
Gemeinde ²		Solingen
Bundesland ²		Nordrhein-Westfalen
GPS-Koordinaten (WGS84)		51°9'36,0"N 7°7'59,1"E
Fischereiliche Bewirtschaftung		Angelfischerei
Besatz mit Äschen		unbekannt
Wildpopulation nach GAK-Liste ⁵		nein

Herkunft - Gewässer	Wupper 2	
Population (AGRDEU-Nr.)		THY-025
Gewässertyp nach WRRL ¹	Typ 9 : Silikatische, fein- bis grobmaterialreiche Mittelgebirgsflüsse	
Ökologischer Zustand n. WRRL ⁶		unbefriedigend
Fischgewässertyp NRW ⁴		Äschentyp Mittelgebirge
Abfluss über/in		Rhein → Nordsee
Gewässerlänge (km) ³		115,8
Einzugsgebietsgröße (km ²) ³		813,4
Flussgebietseinheit		Rhein
Landkreis ²		Solingen
Gemeinde ²		Solingen
Bundesland ²		Nordrhein-Westfalen
GPS-Koordinaten (WGS84)		51°7'41,8"N 7°3'0,3"E
Fischereiliche Bewirtschaftung		Angelfischerei
Besatz mit Äschen		unbekannt
Wildpopulation nach GAK-Liste ⁵		nein

Herkunft - Gewässer		Bega
Population (AGRDEU-Nr.)		THY-026
Gewässertyp nach WRRL ¹	Typ 9.1: Karbonatische, fein- bis grobmaterialreiche Mittelgebirgsflüsse	
Ökologischer Zustand n. WRRL ⁶		mäßig
Fischgewässertyp NRW ⁴		Äschentyp Mittelgebirge
Abfluss über/in		Werre → Weser → Nordsee
Gewässerlänge (km) ³		42,9
Einzugsgebietsgröße (km ²) ³		376,7
Flussgebietseinheit		Weser
Landkreis ²		Lippe
Gemeinde ²		Bad Salzuflen
Bundesland ²		Nordrhein-Westfalen
GPS-Koordinaten (WGS84)		52°2'46,7"N 8°46'50,2"E
Fischereiliche Bewirtschaftung		Angelfischerei
Besatz mit Äschen	Besatz in der Vergangenheit nach Aussterben der Äsche in den 1950er Jahren, Quelle des Materials unbekannt	
Wildpopulation nach GAK-Liste ⁵		nein

Herkunft - Gewässer		Diemel
Population (AGRDEU-Nr.)		THY-027
Gewässertyp nach WRRL ¹	Typ 9.1: Karbonatische, fein- bis grobmaterialreiche Mittelgebirgsflüsse	
Ökologischer Zustand n. WRRL ⁶		unbefriedigend
Fischgewässertyp NRW ⁴		Äschentyp Mittelgebirge
Abfluss über/in		Weser → Nordsee
Gewässerlänge (km) ³		110,4
Einzugsgebietsgröße (km ²) ³		1.761,964
Flussgebietseinheit		Weser
Landkreis ²		Hochsauerlandkreis
Gemeinde ²		Marsberg
Bundesland ²		Nordrhein-Westfalen
GPS-Koordinaten (WGS84)		51°28'24.1"N 8°52'21.3"E
Fischereiliche Bewirtschaftung		Angelfischerei
Besatz mit Äschen	Aktuell wird Äschenbesatz in Teilstrecken durchgeführt (LANUV 2017).	
Wildpopulation nach GAK-Liste ⁵		nein

Herkunft - Gewässer	Emmer
Population (AGRDEU-Nr.)	THY-028
Gewässertyp nach WRRL ¹	Typ 9.1: Karbonatische, fein- bis grobmaterialreiche Mittelgebirgsflüsse
Ökologischer Zustand n. WRRL ⁶	mäßig/unbefriedigend
Fischgewässertyp NRW ⁴	Äschentyp Mittelgebirge
Abfluss über/in	Weser → Nordsee
Gewässerlänge (km) ³	61,7
Einzugsgebietsgröße (km ²) ³	535,1
Flussgebietseinheit	Weser
Landkreis ²	Höxter
Gemeinde ²	Steinheim
Bundesland ²	Nordrhein-Westfalen
GPS-Koordinaten (WGS84)	51°51'59,5"N 9°6'2,6"E
Fischereiliche Bewirtschaftung	Angelfischerei
Besatz mit Äschen	Im Vorfeld der Befischungen fand Äschenbesatz mit Äschen aus einem eigenem Zuchtstamm der Hegegemeinschaft 'Oberer Emmer' statt (Information von C. Nolting, Landesfischereiverband Westfalen/Lippe)
Wildpopulation nach GAK-Liste ⁵	nein

1 www.fliessgewaesserbewertung.de/downloads/typ_typenkarte_dez_2003.pdf

2 Google Maps

3 Gewässerverzeichnis des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW 2010 (<https://www.lanuv.nrw.de/fileadmin/lanuv/wasser/pdf/Gewaesserverzeichnis%20GSK3C.xls>)

4 Fischgewässertypen NRW (https://www.flussgebiete.nrw.de/system/files/atoms/files/d9_kap-143-karte_referenzfischfauna.pdf)

5 GAK-Liste, GENRES (2009)

6 ELWAS Informationssystem (Ökologischer Zustrand/Potenzial 3. Zyklus OFWK3D Auflage 2013)

4.2 Molekulare Analysen

4.2.1 Verwendung forensischer Abstriche zur DNA-Gewinnung

Die nichtinvasive Gewinnung von DNA mittels Schleimhaut- bzw. Maulhöhlenabstrichen (Skin & Buccal swabbing) wurde bereits für verschiedene Fischarten erfolgreich getestet (Smalley & Campanella, 2005; Campanella & Smalley, 2006; Le Vin *et al.*, 2011; Reid, Kidd & Wilson, 2012; Breacker *et al.*, 2017; Colussi *et al.*, 2017). Auch bei der ebenfalls vom Institut für Hydrobiologie durchgeführten Studie zur genetischen Diversität der Barbe in Deutschland (Berendonk *et al.*, 2015) wurden

DNA-Proben mit Hilfe von forensischen Schleimhautabstrichen gewonnen. Gegenüber der damals angewandten Methodik konnte das verwendete Protokoll weiterentwickelt werden. So wurde im Rahmen dieser Studie dazu übergegangen, die Abstrichproben schnellstmöglich nach der Entnahme in geschlossenen Beuteln mit Silica-Gel einzufrieren, um Degradierungsprozesse zu verlangsamen. Bei Entnahme der Proben durch Dritte wurden die Proben im gefrorenen Zustand versendet und danach schnellstmöglich die DNA extrahiert.

Bei der Etablierung des Extraktionsprotokolls für *T. thymallus* wurden zunächst verschiedene DNA-Extraktions-Kits getestet. Dabei erwies sich das „QIAAMP®“ DNA MINI KIT (QUIAGEN) als geeignet. Hierfür wurde das Standard-Protokoll des Herstellers wie folgt ergänzt: Nach dem Lyse-Schritt muss das Lysat auf eine Filtersäule überführt werden. Beim Arbeiten mit Abstrichtupfern saugen diese einen Teil des Lysats während des Inkubationsschritts auf. Daher wurde ein Zentrifugationsschritt nach der Lyse eingeführt, um das aufgesogenen Lysat aus den Abstrichtupfern zu gewinnen. Hierfür wurde eine sterile und kontaminationsfreie 10µl-Pipettenspitze in das gleiche Reaktionsgefäß gegeben, in dem der Abstrichtupfer inkubiert wurde und welcher auf der Oberseite der eingelegten Spitze platziert wurde. Während des kurzen Zentrifugationsschritts nach der vollständigen Lyse wurde das Lysat auf dem Boden des Reaktionsgefäßes aufgefangen, wobei der Tupfer von der Pipettenspitze zurückgehalten wurde. Die Elution der DNA erfolgte in 80 µL Elutionspuffer, der zur Erhöhung der Ausbeute nach einer ersten Zentrifugation ein zweites Mal auf die Säule pipettiert und zentrifugiert wurde. Die genutzten Scheren und Pinzette wurden zwischen den Arbeitsschritten mit 1 M NaOH-Lösung und sterilem, destilliertem Wasser gereinigt, um Kreuzkontamination von Proben zu vermeiden.

4.2.2 Analyse der mitochondrialen DNA

Die mitochondriale Diversitätsanalyse erfolgte für die drei Loci NADH Dehydrogenase Untereinheit 1 (ND1), Untereinheit 5/6 (ND5/6) und die Kontrollregion (CR). Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der ND1- und ND5/6-Region wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Der GoTaq® G2 Hot Start colorless Master Mix (Promega GmbH) wurde als PCR Reaktionspuffer verwendet, wobei Endkonzentrationen von 200 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 400 nM (ND1) bzw. 480 nM (ND5/6) jedes Primers und 40 ng DNA pro Reaktion angewendet wurden. Detaillierte Informationen zu den verwendeten Primern sind in Tabelle 2 dargestellt. Für die Amplifikation der Genfragmente wurde folgendes PCR-Programm verwendet: initiale

Denaturierung von 3 min. bei 95°C, gefolgt von 35 Zyklen mit 45 sec. bei 95°C, 45 sec. bei 55°C und 80 sec. bei 72°C, und einem finalen Elongationsschritt von 5 min bei 72°C.

Tabelle 2: Verwendete Primer für die mitochondrialen Loci ND1, ND5/6 und Kontrollregion (CR) in *Thymallus thymallus*, T_m = Schmelztemperatur

Primer	Primer Sequenz (5'-3')	T _m (°C)	GC-Gehalt (%)	Referenz
Thy_CR_for1	for: ACCCTCCCTAGTGCTCAGAG	62,0	60,0	Diese Studie
Thy_CR_rev2	rev: GCTACGCCAGCGATGCTTATATAG	62,5	50,0	Diese Studie
Thy_ND1	for: GCCTCGCCTGTTTACCAAAAACAT	63,9	45,8	(Nielsen, Hansen & Mensberg, 1998)
	rev: GGTATGGGCCCGAAAGCTTA	61,6	55,0	
Thy_ND5/6	for: AATAGCTCATCCATTGGTCTTAGG	59,6	41,7	
	rev: TAACAACGGTGGTTTTTCAAGTCA	60,8	37,5	

Die quali- und quantitative Analyse der PCR-Produkte erfolgte standardmäßig über eine gelelektrophoretische Auftrennung in einem 1%-igen Agarosegel und einer Färbung und Detektion der DNA mittels Clear G (SERVA) unter UV-Licht. Die Bestimmung der DNA-Stoffmenge in ng erfolgte mithilfe der Software Image Lab™ (Vers. 5.3). Die anschließende RFLP-Analyse der mitochondrialen ND1 & ND5/6-Region erfolgte nicht durch die klassische Methode des Verdauens der PCR-Produkte mittels spezifischer Restriktionsenzyme, sondern durch *in-silico* Simulation der Restriktionsverdauung von Sequenzdaten mittels bioinformatischer Software. Hierfür erfolgte eine Sequenzierung der PCR-Produkte mittels Hochdurchsatzverfahren (Illumina *NextSeq*), wobei die drei amplifizierten Genregionen (ND1, ND5/6, CR) eines Individuums jeweils in äquimolaren Verhältnissen zusammengeführt wurden.

Die resultierenden, jeweils 30µl umfassenden PCR-Produkt-Gemische wurden von der Deep Sequencing Group des Biotechnologischen Zentrums (BIOTEC) der TU Dresden wie folgt bearbeitet: Die DNA-Konzentration wurde mithilfe des *AccuBlue Broad Range dsDNA Quantification Kit* (BIOTIUM) gemessen und auf 0,5ng/µl normalisiert. Zur Konstruktion sequenzierbarer Libraries wurde von jeder Probe 1ng in der Vakuumentrifuge (CONCENTRATOR PLUS EPPENDORF) für 15 Minuten bei 30°C getrocknet. Anschließend erfolgte die Resuspendierung im *Tagmentation-Master-Mix*

bestehend aus 0,5µl nuklease-freiem Wasser, 0,4µl *Tagment DNA Puffer* und 0,1µl *Tagment DNA Enzyme Mix* (beides NEXTERA DNA LIBRARY PREP KIT, ILLUMINA). Nach 5 min. Tagmentierung bei 55°C erfolgte die Indizierung der Libraries mit Barcodes über eine PCR unter Verwendung eines *KAPA High Fidelity Hot Start Master Mix* (KAPA BIOSYSTEMS) und 2pMol Index-Primer (PCR-Bedingungen: 72°C 3 min, 98°C 30 sec, 12 Zyklen [98°C 10 sec, 63°C 30 sec, 72°C 60 sec], 72°C 5 min). Die fertigen Libraries wurden im Verhältnis 1:2 verdünnt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem *AccuBlue Broad Range dsDNA Quantification Kit* (BIOTIUM). Anschließend wurden die Libraries äquimolar gepoolt. Die Pools wurden mit *1x Ampure XP beads* (BECKMAN COULTER) doppelt aufgereinigt und dann auf dem Fragment Analyzer (AATI) mit dem *High Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit* (AATI) quantifiziert. Schlussendlich wurden die Pools dann auf dem *NextSeq500* (ILLUMINA) im „76bp single end“ Modus sequenziert, sodass auf jede Probe zwischen 50.000 und 80.000 Reads entfielen.

Für die Variationsanalyse wurde zuerst jede Probe wie folgt prozessiert: Reads wurden mit dem BURROWS-WHEELER ALIGNER (v0.7.10; Li & Durbin, 2009) auf Referenzsequenzen der drei amplifizierten Genregionen (ND1, ND5/6, CR) gemappt. PCR-Duplikate wurden mit MARKDUPLICATES des PICARD TOOLS (v2.9.0; <https://github.com/broadinstitute/picard>) markiert und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Positionen mit möglichen Insertionen/Deletionen wurden mit REALIGNERTARGETCREATOR des GENOME ANALYSIS TOOLKIT (GATK; v3.4.0; McKenna *et al.*, 2010) identifiziert und mit dem GATK INDELREALIGNER genauer aufgelöst.

Für die eigentliche Variationsanalyse wurde zuerst jede prozessierte Probe individuell mit dem GATK HAPLOTYPECALLER analysiert. Die identifizierten Varianten (Basensubstitutionen und Insertionen/Deletionen) wurden dann über alle Proben mittels GATK COMBINEGVCF in einen Katalog zusammengeführt. Schließlich wurden sämtliche prozessierten Proben für jede Variante des Katalogs mittels dem GATK GENOTYPEGVCF genotypisiert. Abschließend wurden die genotypisierten Varianten basierend auf „Best Practices“-Empfehlung von GATK mit dem GATK VARIANTFILTRATION gefiltert, sodass ein reduzierter Katalog von verlässlichen Varianten erstellt wurde.

Für jede Probe wurde dann mittels GATK SELECTVARIANTS ein eigener Katalog erstellt, der nur die probenspezifischen Varianten enthielt. Varianten, bei denen der Anteil an Reads mit alternativen Allelen an heteroplasmatischen Positionen unter 50% lag, wurden ausgeschlossen. Die alternativen Allele wurden in die Sequenzen der PCR-Produkte mittels GATK FASTAALTERNATEREFERENCEMAKER korrigiert. Die Konsensus-

Sequenzen für jede Probe wurden in Form von FASTA Dateien zur Verfügung gestellt. Eine in manchen Proben auftretende, 328 – 410bp lange Insertion (vier- oder fünfmalige Wiederholung eines 82bp langen Motivs) innerhalb der CR-Region konnte aufgrund der nur 76bp langen Sequenzfragmente nicht berücksichtigt werden.

Hierbei wurde angestrebt, von jeweils mindestens 10 zufällig ausgewählten Individuen pro beprobter Herkunft die drei Markergene (ND1, ND5/6, CR) zur Abschätzung der mitochondrialen Diversität zu analysieren. Insgesamt wurden somit 189 Individuen aus 17 Herkünften typisiert, wobei 6 Herkünfte bzw. Zuchtstämme mit einer Anzahl von 11-15 Individuen und 11 Herkünfte mit 10 Individuen in die Analysen gingen (vgl. Tabelle 5). Von B. Gum (Fischereifachberatung Oberbayern) wurde DNA von Referenzindividuen aus mehreren genetischen Linien der Äsche zur Verfügung gestellt. Zur Kalibrierung und Überprüfung unserer Ergebnisse wurden, gemeinsam mit den für diese Studie gesammelten Proben, die drei mitochondrialen Markergene für fünf Referenzindividuen sequenziert.

4.2.3 Mikrosatellitenanalyse

Um die Vergleichbarkeit zu früheren Studien zu gewährleisten (u.a. Gum *et al.*, 2005, 2006) wurden folgende Mikrosatelliten ausgewählt: BFRO004, BFRO005, BFRO006, BFRO007, BFRO009, BFRO010, BFRO011, F43, Ocl8, Ogo2, One9 und SSOSL311 (Slettan, Olsaker & Lie, 1995; Scribner, Gust & Fields, 1996; Sánchez *et al.*, 1996; Condrey & Bentzen, 1998; Olsen, Bentzen & Seeb, 1998; Snoj *et al.*, 1999; Sušnik, Snoj & Dovč, 1999; Sušnik *et al.*, 2000).

Diese ausgewählten 12 Primerpaare wurden in Abhängigkeit von ihren erwarteten Fragmentlängen und den Reaktionsbedingungen der Primer in vier Multiplex-Sets zusammengestellt. Jedes Set enthielt dabei mehrere Primerpaare, wobei die jeweiligen ‚Forward-Primer‘ mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (6-FAM, ATTO 550, ATTO 565 und JOE) markiert wurden (siehe Tabelle 3 für Details). Dadurch konnten die PCR Fragmente nach kapillar-elektrophoretischer Auftrennung basierend auf ihren Farbmarkierungen den jeweiligen Mikrosatelliten-Loci zugeordnet werden. Die Reaktionsbedingungen wurden basierend auf einem Testset optimiert, um möglichst ähnliche Fluoreszenzsignale innerhalb und zwischen den Proben zu erhalten. Aus jeder beprobten Herkunft (mind. 30) wurde anschließend angestrebt 30 bis 50 Individuen mit dem finalen Primer-Set bestehend aus 12 Loci zu untersuchen. Nach einer Optimierungs- und Evaluierungsphase wurde das ursprüngliche Set 4 aus

3 Primerpaaren nochmals aufgeteilt, da der Locus One9 sich als wenig kompatibel mit den anderen beiden Markern erwies und daher als Simplex-PCR amplifiziert werden musste.

Tabelle 3: Detailinformation zu den verwendeten Mikrosatellitenmarkersystemen

Multiplex Set	Marker	Motiv	Allelbereich (bp)	Fluorophor	Referenz
1	BFRO011	(GT) ₁₆	223-257	6-FAM	(Sušnik <i>et al.</i> , 2000)
	BFRO007	(AG) ₁₃	184-200	JOE	(Sušnik <i>et al.</i> , 1999)
	SSOSL311	(TG) _n	108-120	ATTO 550	(Slettan <i>et al.</i> , 1995)
	BFRO006	(CA) ₁₅	132-152	ATTO 565	(Sušnik <i>et al.</i> , 1999)
2	Ocl8	(GT) ₄₆	97-127	6-FAM	(Condrey & Bentzen, 1998)
	BFRO004	(GT) ₁₁	149-167	ATTO 550	(Snoj <i>et al.</i> , 1999)
	BFRO009	(CA) ₈ T(AC) ₄ T (AC) ₈ G(CA) ₆	235-251	ATTO 565	(Sušnik <i>et al.</i> , 1999)
3	BFRO005	(CA) ₁₇	113-141	6-FAM	(Sušnik <i>et al.</i> , 1999)
	BFRO010	(AC) ₁₇	202-260	JOE	(Sušnik <i>et al.</i> , 2000)
4	One9	(CA) ₅₄	182-204	6-FAM	(Scribner <i>et al.</i> , 1996)
	F43	(AC) _n	117-152	ATTO 550	(Sánchez <i>et al.</i> , 1996)
	Ogo2	(GA) ₂₄	204-258	ATTO 565	(Olsen <i>et al.</i> , 1998)

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Der GoTaq® G2 Hot Start colorless Master Mix (Promega GmbH) wurde als PCR Reaktionspuffer verwendet, wobei Endkonzentrationen von 200 mM dNTPs und 60 ng DNA pro Reaktion angewendet wurden. Die MgCl₂-, BSA- und Primer-Konzentration sowie die Annealing-Temperatur wurde für jedes Multiplex-Set optimiert (siehe Tabelle 4). Die Amplifikation der Mikrosatelliten-Fragmente wurde mittels folgendem PCR-Programm durchgeführt: Initiale Denaturierung für 5 min bei 95°C, 35 Zyklen mit 20 sec bei 95°C, 20 sec bei 50,5-57°C und 20 sec bei 72°C, und einem finalen Elongationsschritt von 45 min bei 72°C.

Der Erfolg der Amplifikation wurde mittels Gelelektrophorese unter Verwendung eines 2%igen Agarosegels und Visualisierung mittels UV-Licht nach Färbung der DNA mit Clear G (SERVA) überprüft. Die Fragmentlängenanalyse positiver PCR-Proben wurde anschließend mit einem ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer durchgeführt.

Von den zur Verfügung stehenden Abstrichproben der insgesamt 539 Individuen wurde von 515 Proben erfolgreich DNA gewonnen. Von diesen 515 Proben, die aus 17 verschiedenen Herkunft/Zuchtstämmen stammen, wurde eine Mikrosatellitenanalyse durchgeführt. Dabei zeigten 312 Proben nach einer ersten Analyse ein vollständiges Marker-Set. Die verbleibenden Proben zeigten Ausfälle sowohl einzelner jedoch nicht konsistent gleicher Mikrosatelliten-Loci, als auch kompletter Multiplex-Sets. Um für die Datenanalyse vollständige Mikrosatelliten-Marker-Sets zur Verfügung zu haben, wurden für die ausgefallenen Individuen entweder komplette Multiplex-Sets wiederholt analysiert oder in den vorwiegenden Einzel-Loci Ausfällen sog. Simplex-PCRs durchgeführt. Für diese Simplex-PCRs wurden die den Multiplex-Sets entsprechenden Bedingungen gewählt, wobei nur einzelne Primerpaare in die Reaktionen eingesetzt wurden. Durch diese Vorgehensweise und durch die teilweise Analyse von „B-Proben“ derselben Individuen konnte für insgesamt 506 Individuen aus 17 Herkunft/Zuchtstämmen stammend ein vollständiges Markerset von 12 Loci erstellt werden.

Zur Kalibrierung des von uns verwendeten Binnings (Detektion und Klassifikation der Allel-Längen) und zur Validierung unserer Ergebnisse wurden, gemeinsam mit den für diese Studie gesammelten Proben, Mikrosatellitenanalysen von fünf Referenzindividuen aus verschiedenen genetischen Linien der Äsche (zur Verfügung gestellt von B. Gum) durchgeführt.

Tabelle 4: Mikrosatelliten-PCR Bedingungen für die 3 verwendeten Multiplex-Sets. * One9 wurde anfangs mit im Multiplex-Set 4 amplifiziert, musste allerdings doch als Simplex-PCR durchgeführt werden.

Multiplex Set	1	2	3	4	One9
Hybridisierungstemperatur	57 °C	57 °C	56 °C	54 °C	50,5
MgCl ₂ Konz.	937,5 µM	625 µM	625 µM	1,25 mM	1,25 mM
BSA Konz.	-	0,25 µg/µl	-	0,125 µg/µl	0,125 µg/µl
Marker mit entsprechenden Konzentrationen der Primer	BFRO011 500 nM BFRO007 625 nM SSOSL311 250 nM BFRO006 375 nM	Ocl8 250 nM BFRO004 250 nM BFRO009 500 nM	BFRO005 250 nM BFRO010 500 nM	(One9 625 nM) * F43 250 nM Ogo2 375 nM	One9 625 nM

4.3 Datenanalyse und Statistik

4.3.1 mtDNA Sequenz- und RFLP-Analyse

Für die untersuchten Regionen (ND1, ND5/6, CR) wurden die für die weiteren Analysen benötigten Alignments mithilfe der Software *Geneious* 10.1.3 (BIOMATTER LDT.) mit 65% similarity (5,0/-4,0) unter Verwendung des implementierten Geneious-Algorithmus erstellt.

Im Falle der mitochondrialen Kontrollregion (CR) konnten Sequenzvariationen an Position 630bp nicht sicher aufgelöst werden, da diese innerhalb eines Homopolymer Stretches (Poly-T) liegen. Der Homopolymer-Stretch wurde daher im Bereich 624-637bp getrimmt und aus den folgenden Analysen ausgeschlossen.

Neben den ermittelten DNA-Sequenzen aus dieser Studie wurden weitere Sequenzen der Kontrollregion, welche in der Nucleotid-Datenbank der NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) hinterlegt sind, unter den Kriterien Sequenzlänge >1080bp und Insertion/Deletion <10bp ausgewählt (siehe Appendix 3). Die Sequenzlänge lag nach Zuschneiden der Sequenzen auf gleiche Anfangs- und Endsequenzen, sowie nach Trimmen des oben erwähnten Homopolymer-Stretches bei 1040bp.

Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit mit den RFLP-Analysen von Gum *et al.* (2005, 2006) wurden die ND1 und ND5/6-Sequenzen *in-silico* verdaut. Für die ND1-Region wurden die Restriktionsenzyme *HaellI*, *BstNI*, *Hinfl*, *Mbol*, *Bcni* & *RsaI* verwendet. Die ND5/6-Region wurde mit den Restriktionsenzymen *HaellI*, *StyI*, *Hinfl*, *AluI*, *ApaI*, *RsaI* & *AluI* geschnitten. Aus den Konsensus-Sequenzen der ND1- bzw. ND5/6-Region wurden die RFLP-Profile *in-silico* mithilfe der Software R vers. 3.5.1 (R Core Team, 2018) unter Verwendung der Pakete ‚*Digestion*‘ (Roselius *et al.*, 2011) und ‚*Biostrings*‘ (Pagès *et al.*, 2016) generiert.

Die erhaltenen RFLP-Fragment-Profile wurden mit bereits bekannten RFLP-Profilen (Referenzen für Fragmentlängen von B. Gum bereitgestellt) für die entsprechenden Restriktionsenzyme in R vers. 3.5.1 (R Core Team, 2018) abgeglichen. Das von Gum *et al.* (2005) verwendete Restriktionsenzym *AluI* wurde aufgrund von nicht mehr vorhandenen Referenzdaten für die Fragmentlängen aus der Analyse ausgeschlossen. Entsprach ein ermitteltes RFLP-Profil einem bereits bekannten Profil, wurde für dieses der entsprechende Haplotyp übernommen (siehe Gum *et al.*, 2005).

Durch die Kombination der Haplotypenbezeichnungen in einer vorgegebenen Reihenfolge (siehe Gum *et al.*, 2005) wurden sogenannte Composite-Haplotypen definiert. Für die anschließende populationsgenetische Datenanalyse wurde der Composite-Haplotyp in einen Binärcode umgewandelt. Das Vorhandensein eines spezifischen Restriktionsfragments wurde als „1“ und das Fehlen als „0“ kodiert.

Der *in-silico*-Verdau der Referenzsequenzen (Probenmaterial von B. Gum bereitgestellt) ergab teilweise Unterschiede gegenüber den bereitgestellten Referenz-RFLP-Profilen (Fragmentlängen anhand von Gelbildern bestimmt, siehe Gum *et al.*, 2005). Daher wurden für die Erkennung der Haplotypen Restriktionsenzym-spezifische Toleranzen zwischen 2bp und 13bp für den Abgleich festgelegt. Jedes unbekannte RFLP-Fragment-Profil wurde durch einen neuen Haplotypen für das jeweils verwendete Restriktionsenzym klassifiziert.

Für die CR-Sequenzdaten und die RFLP-Binärdatensätze erfolgte die Abschätzung der Variation innerhalb der Populationen bzw. Flussgebietseinheiten (FGE) durch die Berechnung der Haplotypen- und Nukleotid-Diversität mit der Software Arlequin Ver. 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010). In Arlequin wurde weiterhin eine hierarchische Analyse der molekularen Varianz (AMOVA) durchgeführt, wobei die Gruppeneinteilung mit den FGEs korrespondierte, zu welchen die jeweiligen Populationen gehören. Insgesamt wurden 10.000 Permutationen durchgeführt, um die Signifikanz der Resultate zu bewerten. Für die notwendige Berechnung der genetischen Distanzen im Fall der Kontrollregion wurde das Tamura & Nei (TrN) Evolutionsmodell (Tamura & Nei, 1993) verwendet, welches das beste verfügbare Modell für die Daten darstellt. Dieses Modell der molekularen Evolution wurde mit der Software jModeltest 2.1.4 (Darriba *et al.*, 2012) basierend auf hierarchischen Likelihood-Ratio-Tests und dem Akaike Informationskriterium (AIC) ausgewählt. Zur Abschätzung der genetischen Differenzierung zwischen den Populationen bzw. FGEs wurden in Arlequin (Excoffier & Lischer, 2010) paarweise F_{ST} - bzw. ϕ_{ST} -Werte (analog zu Wright's Allelfrequenz-basierter F-Statistik) berechnet und deren Signifikanz mit 10.000 Permutationen abgeschätzt.

Mit der Software POPART (Leigh & Bryant, 2015) wurden jeweils ein Median-Joining Haplotypen Netzwerk basierend auf den RFLP-Binärdaten der ND1- & ND5/6-Region (Abbildung 5) bzw. den Sequenzdaten der Kontrollregion erstellt (Abbildung 6). Dabei gingen auch alle 32 von Gum *et al.*, (2005, 2006) definierten Composite-Haplotypen (RFLP-Analyse) bzw. die Referenzsequenzen aus der NCBI GenBank (Auflistung siehe

Appendix 3) in die Analyse ein. Zwei weitere Composite-Haplotypen aus Gum *et al.* (2006) und Kühn (2011) konnten aufgrund fehlender Informationen zu den jeweiligen RFLP-Mustern nicht in die Analyse aufgenommen werden. Haplotypen bzw. Composite-Haplotypen, die unter Berücksichtigung der bundesweiten Untersuchung (Köbsch *et al.*, in Vorbereitung) nur in einer Population auftraten, wurden als private Haplotypen definiert. Dies umfasst also auch bereits bekannte Composite-Haplotypen, die in vorherigen Studien bereits in anderen Populationen gefunden wurden.

4.3.2 Mikrosatellitenanalyse

Aufgrund des technisch bedingten Auftretens von sog. „Stutter-Peaks“ (Amplifikationsfehler während der PCR) war die Bestimmung der Fragmentlängen nur schwer automatisierbar bzw. häufig fehlerbehaftet, wenn ausschließlich Computeralgorithmen angewendet wurden. Daher wurden die Rohdaten der Fragmentlängenanalysen aller Individuen und Loci manuell kuratiert und ausgewertet. Hierfür wurde das ‚Microsatellite Plugin‘ der Software Geneious® 11.0.5 (Kearse *et al.*, 2012) genutzt.

Für die Abschätzung der genetischen Variation innerhalb der Populationen bzw. Flusseinzugsgebiete (FGE) erfolgte die Berechnung der auf die Probengröße korrigierten, erwarteten Heterozygotie (H_{EC}) in Arlequin (Excoffier & Lischer, 2010). Die Berechnung des mittleren Inzuchtkoeffizienten pro Population erfolgte mit der Software FSTAT version 2.9.4 (Goudet, 2001). Die mittlere und maximale Anzahl an Allelen pro Locus, der mittlere Allelreichtum pro Population, die mittlere Anzahl privater Allele (Anzahl privater Allele pro Population / Anzahl an Mikrosatelliten-Loci) wurden in R (R Core Team, 2018) mit den Paketen „Poppr“ (Kamvar, Tabima & Grünwald, 2014) und „hierfstat“ (Goudet & Jombart, 2015) berechnet. Mit Hilfe der Software BOTTLENECK 1.2.02 (Piry, Luikart & Cornuet, 1999) wurde ein Wilcoxon- und ein „mode-shift“-Test durchgeführt, um Hinweise auf Flaschenhalseffekte über relativ rezente Zeitperioden hinweg zu detektieren.

Die genetische Differenzierung zwischen den Populationen bzw. FGEs wurde analog zu den mitochondrialen Daten in Arlequin (Excoffier & Lischer, 2010) mit paarweisen F_{ST} -Werten abgeschätzt, und die Signifikanz der Werte mit 10.000 Permutationen bestimmt. Eine hierarchische AMOVA wurde ebenfalls in Arlequin (Excoffier & Lischer, 2010) durchgeführt, wobei die Gruppeneinteilung mit den FGEs korrespondierte, zu

welchen die jeweiligen Populationen gehören. Die Berechnung der genetischen Distanzen erfolgte über paarweise Unterschiede und die Bewertung der Signifikanz der Resultate erfolgte mit 10.000 Permutationen.

Mit Hilfe einer Hauptkoordinaten-Analyse wurde die räumliche genetische Struktur der Populationen analysiert. Die Hauptkoordinaten-Analyse ist eine ‚Metrische Multidimensionale Skalierung‘, bei der die Distanzen zwischen den Individuen wie bei einer Hauptkomponenten-Analyse weitestgehend bewahrt werden, um eine räumliche Autokorrelation zu testen. Diese multivariate Methode erlaubt somit die Hauptmuster in einem multivariaten Datensatz über eine Distanz- oder Ähnlichkeitsmatrix zu finden und graphisch darzustellen indem die enthaltene Information der zahlreichen paarweisen Kombinationen auf wenige Dimensionen (i.d.R. 2 - 3) reduziert wird. Dabei werden sog. ‚Eigenwerte‘ und ‚Eigenvektoren‘ einer Matrix berechnet, die die Distanzen zwischen allen Datenpunkten in der Matrix enthält. Die „wichtigsten“ Dimensionen werden durch die größten Eigenwerte repräsentiert und stellen die Hauptachsen der Variation des mehrdimensionalen Datensatzes dar. Jede aufeinanderfolgende Achse (mit geringer werdenden Eigenwerten) erklärt somit proportional weniger der Gesamtvariation im Datensatz. Die ersten 2 bis 3 Achsen legen somit typischerweise den größten Anteil der Trennung von Gruppen im Datensatz offen. Diese Trennung lässt sich dabei graphisch in Form von Punktwolken ähnlicher Eigenvektoren darstellen. Diese Analyse wurde in R (R Core Team, 2018) mit Hilfe des Pakets „ape“ (Paradis & Schliep, 2018) unter Verwendung der Binärdaten genutzt, um die Beziehungen aller einzelnen Individuen zueinander zu berechnen. Hierfür wurden die ermittelten Multilocus Allel-Daten in eine Binärmatrix (0=abwesend, 1=anwesend) transformiert. Für die Darstellung der Beziehungen der Populationen zueinander wurden die paarweisen genetischen Distanzen der Populationen nach Nei (Nei, 1972, 1978) verwendet, die in R (R Core Team, 2018) mit Hilfe des Pakets „adegenet“ (Jombart, 2008) auf Basis des Allel-Datensatzes berechnet wurden.

Mit Hilfe einer ‚Structure‘ Analyse wurden die genetischen Gruppierungen aller Individuen unabhängig ihrer Herkunft untersucht, um die Anzahl der Gruppen, die sich genetisch stark voneinander unterscheiden, zu bestimmen. Hierfür wurde das Programm STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000; Falush, Stephens & Pritchard, 2003, 2007; Hubisz *et al.*, 2009) genutzt, welches über ein Bayes’sches Clusterverfahren die Zuordnungswahrscheinlichkeiten eines Individuums zu jeder Gruppe in mehreren Wiederholungen berechnet und eine Gesamtwahrscheinlichkeit

für jede vorgegebene Anzahl von Gruppen (K) ermittelt. Als Parametereinstellungen für die Markov Chain Monte Carlo (MCMC) Schätzungen wurde das ‚Admixture Model‘ (mit angenommenem genetischem Austausch zwischen den Populationen), und die Einstellung ‚Independent Allele Frequencies‘ gewählt. Alle Simulationen wurden mit einer ‚BurnIn‘ Phase von 25.000 Wiederholungen und 100.000 MCMC Wiederholungen nach der ‚Burnin‘ Phase durchgeführt. In die Analyse wurden auch die Mikrosatellitendaten der bundesweiten Untersuchung zur genetischen Vielfalt der Äsche (Köbsch *et al.*, in Vorbereitung) integriert. Das Ableiten der Anzahl der genetischen Gruppen (K), welche die Daten am besten beschreiben, wurde mit dem Programm STRUCTURE HARVESTER Web v0.6.94 (Earl & vonHoldt, 2012) mittels der Evanno-Methode (Evanno, Regnaut & Goudet, 2005) auf Basis von 5 Wiederholungen für K = 2-40 durchgeführt. Dabei stellte sich K=4 als die wahrscheinlichste und K=8 als die zweitwahrscheinlichste Anzahl von Gruppen (K) heraus. Die Ergebnisse aus den 5 STRUCTURE-Wiederholungen für diese beiden Gruppenanzahlen (K=4, K=8) wurden mittels der Software CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg, 2007) gemittelt und mit dem Programm DISTRICT (Rosenberg, 2003) visualisiert.

5 AUSFÜHRLICHE DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE

5.1 Populationsstruktur der Äsche in den erfassten Herkünften

In den 17 Herkünften (Abbildung 2) konnte von insgesamt 539 Äschen Material für die molekularen Analysen gewonnen werden. Informationen zu den Herkünften, die Anzahl der Individuen sowie Daten zu durchschnittlichen Längen, Massen und Korpulenzfaktoren der Populationen sind in Tabelle 1 dargestellt.

In 12 Wildpopulationen konnten die Fische vermessen werden (Abbildung 3, Tabelle 1). Die Größenklassenverteilung zeigte eine hohe Heterogenität zwischen den Herkünften. So konnten zwar in den meisten Gewässern mehrere Altersklassen erfasst werden, allerdings sind diese in ihren Verhältnissen sehr unterschiedlich stark vertreten. Das lag möglicherweise daran, dass sich die Habitate der Juvenilen und Adulten nicht oder nur bedingt überlappen bzw. dass in den befischten Gewässern entweder Jungfisch- bzw. Adulthabitate überwogen. In den meisten Gewässern waren jedoch viele Größenklassen und damit ganze Jahrgänge stark unterrepräsentiert, obwohl die entsprechenden Habitate vorhanden waren bzw. beprobt wurden (LANUV, 2017). Dafür können, unter anderem, zwischenjährliche Schwankungen im Reproduktionserfolg verantwortlich gemacht werden, welche klimatisch oder anthropogen beeinflusst sind. Eine eingeschränkte Eignung der Gewässer als Lebensraum, z.B. durch Verbau, Anstau und stoffliche Verschmutzung, führt dann dazu, dass lediglich Individuen ausreichend starker Jahrgänge überleben und Nachkommen schwacher Jahrgänge im Gewässer nicht mehr nachweisbar sind. In den Zuchtstämmen wurden entweder adulte Laichfische („ZS 2“, „ZS 4“) oder juvenile Äschen („ZS 1“, „ZS 3“) beprobt.

Um auszuschließen, dass die unterschiedliche Altersstruktur der analysierten Populationen Artefakte bezüglich der genetischen Zusammensetzung verursacht, weil bspw. alle gefangenen 0+ Fische einer beprobten Herkunft von einem Elternpaar stammen könnten, wurde der Anteil der 0+ Äschen an der Gesamtindividuenanzahl der Herkunft berechnet (Daten nicht gezeigt) und Korrelationsanalysen zur Haplotypendiversität (CR, ND1 & ND5/6) und Anzahl privater Allele durchgeführt. Dabei zeigt sich kein signifikanter, statistischer Zusammenhang (Rang-Korrelationskoeffizient nach SPEARMAN, $p > 0,05$), so dass 0+ Fische mit in die genetischen Analysen aufgenommen wurden.

Die angestrebte Anzahl von mindestens 30 Individuen pro Herkunft konnte in 7 der 12 Wildpopulationen und in allen 5 untersuchten Zuchtstämmen erreicht werden. In den übrigen Herkünften konnte diese Anzahl dem Auftragnehmer u.a. aufgrund der Bestandssituation der Äsche nicht zur Verfügung gestellt werden.

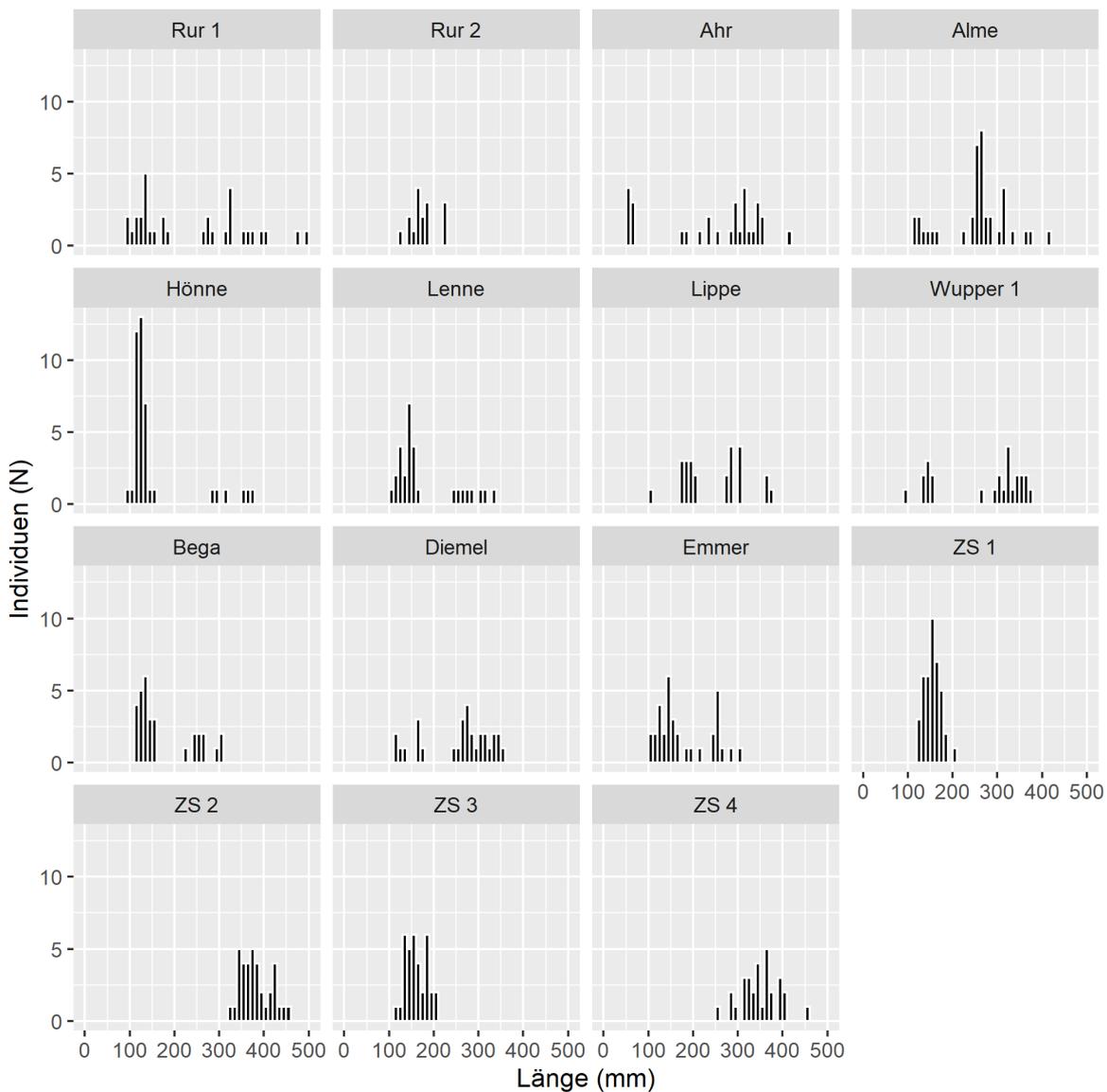


Abbildung 3: Anzahl der Individuen nach Größenklassen; in den Grafiken sind die Namen der Herkünfte sowie die Gesamtanzahl der Individuen pro Wildpopulation bzw. Zuchtstamm aufgeführt. Für die Herkünfte ‚Wupper 2‘ und ‚ZS 5‘ liegen keine Informationen zur Länge der Tiere vor. Die Herkunft ‚Rur 2‘ unterschied sich grundlegend hinsichtlich der Methodik der Befischung, sodass die vergleichende Aussagen hinsichtlich der Populationsstruktur nur sehr eingeschränkt möglich sind.

Die Gesamtheit aller gefangenen Äsche zeigte eine relativ homogene Verteilung in den Größenklassen (Abbildung 4) und spiegelt die typische Populationsstruktur mit

der höchsten Abundanz in den Juvenilstadien und sinkender Abundanz mit ansteigender Größenklasse wider. Generell werden bei der Elektrofischung jedoch die kleinen Größenklassen quantitativ unterschätzt, da die kleinen Fische weniger Feldlinien abgreifen und der Fangradius des Elektrofischfanggerätes gegenüber größeren Fischen wesentlich eingeschränkt ist. Deutlich erkennbar sind die Verluste

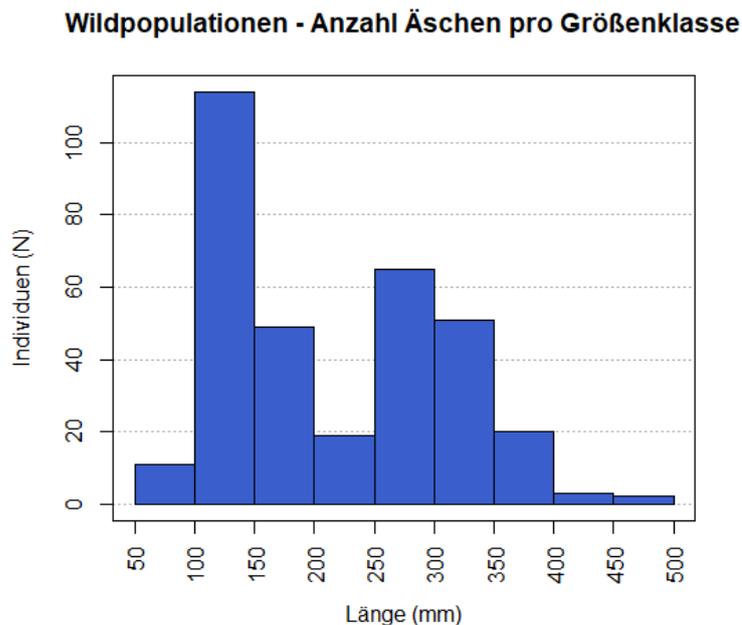


Abbildung 4: Anzahl von Individuen je Größenklasse aller vermessenen Äschen in Wildpopulationen.

des ersten Winters, welche sich im starken Abfall zwischen den Größenklassen <20 cm und >20 cm darstellen. Hier spielen zum einen natürliche Winterverluste eine Rolle. Andererseits ist der negative Einfluss des Kormorans auf die Äschenbestände auch für Nordrhein-Westfalen nachgewiesen (LANUV, 2013). Dieser Effekt sollte sich hauptsächlich auf die Größenklassen von 15-30 cm bemerkbar machen. Auf eine statistische Analyse der Gewicht-Längenverhältnisse wurde aufgrund der geringen Datenlage verzichtet (Tabelle 1). Allerdings sind Unterschiede in der Korpulenz der vermessenen und gewogenen Äschen zwischen den dahingehend analysierten Populationen sichtbar. Der mittlere Korpulenzfaktor der Äschen aus der Ahr liegt im bundesweiten Vergleich unter dem Durchschnitt, während die Äschen aus der Alme bundesweit den höchsten mittleren Korpulenzfaktor aufwiesen (Köbsch *et al.*, in Vorbereitung).

Generell ist der Vergleich der Korpulenz bei der Analyse von strukturierten Wildpopulation schwierig, da sich diese in den unterschiedlichen Größenklassen a) mathematisch-physikalisch unterscheidet, b) der Messfehler bei der Wiegung kleiner Individuen prozentual immer größer ist, und c) die Korpulenz jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt – Fettvorräte werden z.B. über den Winter aufgebraucht, weshalb in den gemäßigten Breiten Mitteleuropas Fische aus Frühjahrsfängen weniger korpulent als Fische aus Herbstfängen sind. Für den Vergleich der Korpulenz aus Wildfängen unterschiedlicher Herkunft müssten daher gleiche Altersstadien/Größenklassen analysiert werden, die zu ähnlichen terminlichen Zeitpunkten erhoben wurden.

5.2 Genetische Diversität der Äsche in den erfassten Herkünften

5.2.1 Forensische Abstriche zur DNA-Gewinnung

Die mit dem „QIAAMP®“ DNA MINI KIT (QUIAGEN) extrahierte DNA aus Abstrichen wies bei korrekter Entnahme und Lagerung der Proben eine vergleichbar gute Qualität mit der aus klassischer Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnenen DNA aus Muskelgewebe auf. Die ermittelten DNA Mengen lagen größtenteils bei 1-10µg Gesamt-DNA, was für die durchzuführenden PCR-Reaktionen innerhalb der vorliegenden Studie ausreichend war.

5.2.2 mtDNA Sequenz- und RFLP-Analyse

Für 189 Individuen aus 17 Herkünften wurde eine RFLP-Analyse der mitochondrialen ND1- & ND5/6-Region bzw. eine Sequenzanalyse der mitochondrialen Kontrollregion (CR) durchgeführt, um die mitochondriale Diversität zwischen und innerhalb der Äschen-Populationen in Deutschland abzuschätzen. Insgesamt konnten sowohl im RFLP-Datensatz als auch im CR-Sequenzdatensatz 13 Composite-Haplotypen bzw. Haplotypen identifiziert werden (siehe Abbildung 5 & Abbildung 6). Im Fall des RFLP-Datensatzes wurden dabei 4 Composite-Haplotypen bereits von Gum *et al.* (2005) beschrieben. Für den CR-Datensatz konnten 6 Haplotypen wiedergefunden werden, die bereits in früheren Studien beschrieben wurden (Weiss *et al.*, 2002; Gum *et al.*, 2005; Meraner & Gandolfi, 2012).

Die Haplotypendiversität (H_d) bezogen auf die untersuchten FGE unterscheidet sich zwischen den beiden verwendeten mitochondrialen Markersystemen. Während die FGE Maas bezüglich der RFLP-Analyse die höchste Haplotypendiversität aufweist

(0,526), wurde dort hinsichtlich der CR-Sequenzanalyse der niedrigste Wert ermittelt (0,1). Dagegen zeigt die FGE Rhein bezüglich der CR-Sequenzdaten die höchste Haplotypdiversität (0,478) und die FGE Weser bezüglich der RFLP-Daten den geringsten Wert (0,179, vgl. Abbildung 5 & Abbildung 6). Insgesamt ist die Haplotypdiversität pro FGE gesehen im Vergleich zu anderen Fischarten wie Barbe (Berendonk *et al.*, 2015), Bachforelle (Schmidt *et al.*, 2015) oder Quappe (Wetjen *et al.*, 2016) relativ niedrig. Die Haplotypdiversität in den untersuchten Wildpopulationen und Zuchtstämmen reichte für beide mitochondrialen Markersysteme von 0,00 bis 0,60, wobei die höchsten Werte jeweils in ZS 4 bzw. in ZS 3 und ZS 4 gefunden wurden.

Tabelle 5: Ergebnisse der genetischen Analysen der mitochondrialen DNA der analysierten 12 Wildpopulationen und 5 Zuchtstämme. Dargestellt ist jeweils für CR und ND1&ND5/6 die Haplotyp-Diversität (H_d), die Anzahl der Privaten Haplotypen (PH N) und die Nukleotid-Diversität der CR-Region (π) bzw. die mittlere Heterozygotie pro RFLP-Site (π_{RFLP}). Weiterhin dargestellt ist die Anzahl der haplotypisierten Individuen (DNA_{mt} N), der Populationscode in der AGRDEU-Datenbank sowie Informationen zum Besatz in der jeweiligen Population: A=aktueller Besatz, V=Besatz in Vergangenheit, N=kein Besatz, U=Besatzsituation konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Population	DNA_{mt} N	CR-Region			ND1&ND5/6			AGRDEU Code	Besatz
		H_d	PH N	π	H_d	PH N	π_{RFLP}		
Rur1	10	0,0000	0	0,0000	0,5556	0	0,0080	THY-012	N
Rur2	10	0,2000	0	0,0002	0,5556	0	0,0080	THY-013	N
Ahr	10	0,4667	1	0,0023	0,4667	1	0,0202	THY-014	N
Alme	15	0,1333	0	0,0009	0,1333	0	0,0218	THY-015	A
Hönne	11	0,4364	0	0,0004	0,0000	0	0,0000	THY-018	U
Lenne	10	0,3778	0	0,0015	0,2000	0	0,0356	THY-020	V
Lippe	11	0,3273	0	0,0022	0,3273	0	0,0535	THY-021	A
Wupper1	10	0,0000	0	0,0000	0,0000	0	0,0000	THY-024	U
Wupper2	10	0,5333	1	0,0026	0,5333	1	0,0256	THY-025	U
Bega	10	0,5333	0	0,0005	0,0000	0	0,0000	THY-026	V
Diemel	10	0,3778	0	0,0054	0,3556	0	0,0821	THY-027	A
Emmer	12	0,1667	0	0,0018	0,1667	0	0,0313	THY-028	A
ZS 1	15	0,0000	0	0,0000	0,0000	0	0,0000	-	-
ZS 2	15	0,5143	1	0,0063	0,5429	2	0,0723	-	-
ZS 3	10	0,6000	0	0,0038	0,5333	0	0,0795	-	-
ZS 4	10	0,6000	1	0,0064	0,6000	0	0,1003	-	-
ZS 5	10	0,0000	0	0,0000	0,0000	0	0,0000	-	-
Summe (N)	189		4			3			
Mittelwert		0,31	0,24	0,00	0,29	0,18	0,03		
CV%		70,4	180,3	106,6	79,8	216,0	103,0		

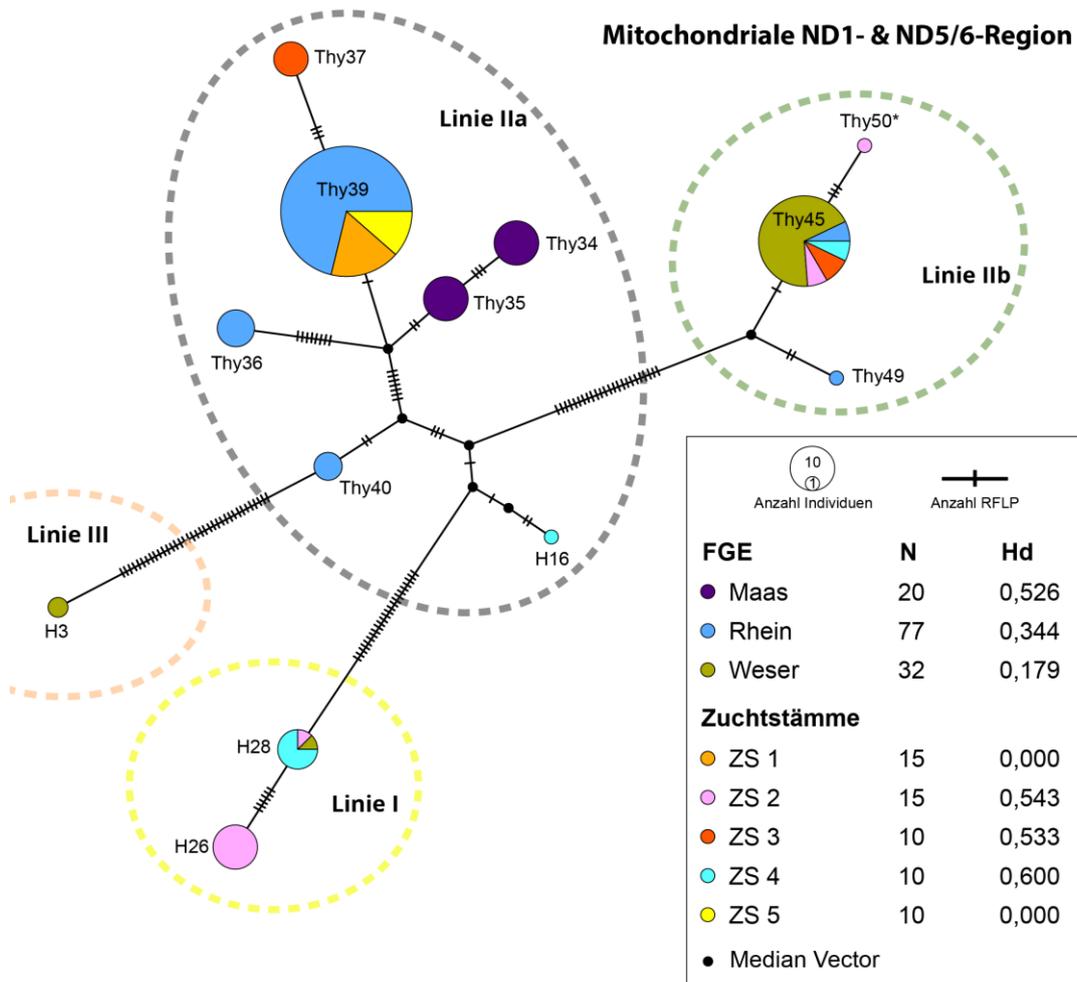


Abbildung 5: Median-Joining Haplotypen Netzwerk bestehend aus 13 Composite-Haplotypen der mitochondrialen ND1- & ND5/6-Region, welche in den 12 untersuchten Wildpopulationen aus 3 verschiedenen Flussgebietseinheiten (FGE) und den 5 untersuchten Zuchtstämmen der Äsche detektiert wurden. Diese gruppieren sich in 4 genetische Hauptlinien aus Gum et al. (2005) ein. Jeder Kreis repräsentiert einen individuellen Composite-Haplotyp, wobei die Größe des Kreises proportional zur Haplotyp-Frequenz ist. Die Kreise sind nach ihrer Zugehörigkeit zu einer FGE bzw. einem Zuchtstamm eingefärbt. Die Anzahl an Querlinien auf den Verbindungslinien zeigt die schrittweisen Unterschiede im RFLP-Muster zwischen den einzelnen Composite-Haplotypen an. In der Legende sind neben den FGEs bzw. Zuchtstämmen die Anzahl der jeweils analysierten Individuen (N) und die jeweilige Haplotypendiversität (H_d) angegeben. Der Haplotyp „Thy 50“ wurde im Rahmen dieser Untersuchung neu beschrieben.

Private Haplotypen fanden sich bezogen auf CR- und ND1- & ND5/6-Region jeweils nur in den Wildpopulationen „Ahr“ und „Wupper 2“ (Tabelle 5). Generell zeigt sich auch hier ein Unterschied im Vergleich zu anderen Fischarten, bei denen teils deutlich mehr private Haplotypen gefunden wurden (Berendonk *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2015; Wetjen *et al.*, 2016). Eine Korrelationsanalyse (Rangkorrelationskoeffizienten

geschätzt über den PEARSONSchen Korrelationskoeffizienten der Ränge) ergab eine signifikante negative Korrelation zwischen Latitude und Haplotypendiversität über alle Populationen der bundesweiten Untersuchung (Köbsch *et al.*, in Vorbereitung; Rangkorrelationskoeffizient $r_s = -0,439$, $p < 0,01$). Die H_d der Äsche nimmt in Deutschland also grundsätzlich von Süden nach Norden ab. Dieses Muster lässt sich für verschiedene Fischarten feststellen und mit dem unterschiedlichen Grad der Vergletscherung im Pleistozän begründen (Bernatchez & Wilson, 1998). Auch für die Äsche konnte in Deutschland eine tendenziell geringere genetische Diversität in den nördlichen FGEs gegenüber der FGE Donau festgestellt werden (Gum *et al.*, 2003, 2005). Innerhalb von Nordrhein-Westfalen war dieser Gradient allerdings nicht nachzuweisen.

Basierend auf den in Abbildung 5 und Abbildung 6 dargestellten Haplotypennetzwerken der ND1- & ND5/6-Region sowie der Kontrollregion lässt sich jeweils eine deutliche phylogenetische Struktur in Form einer Aufspaltung von eindeutigen Linien erkennen. Für die RFLP-Daten (Abbildung 5) gruppieren sich die gefundenen Composite-Haplotypen in die von Gum *et al.* (2005) beschriebenen Hauptlinien I, IIa, IIb und III ein. Dabei ist eine deutliche Zuordnung der haplotypisierten Individuen zu den Hauptlinien gemäß ihrer FGE-Zugehörigkeit erkennbar. Individuen aus den FGEs Rhein und Maas gehören größtenteils bzw. durchweg zu Composite-Haplotypen der Linie IIa während Individuen der FGE Weser größtenteils zu Linie IIb und dort ausschließlich zum Composite-Haplotypen Thy45 gehören. Alle Individuen aus der FGE Maas gehören zu zwei eigenen Composite-Haplotypen innerhalb der Linie IIa.

Der Composite-Haplotyp Thy39 gehört zu Linie IIa, wobei dieser (auch deutschlandweit) ausschließlich in Populationen der FGE Rhein auftrat und dabei v.a. in den Einzugsgebieten der Ruhr, Lippe und Wupper identifiziert wurde. Thy36 und Thy 40 sind private Composite-Haplotypen die jeweils nur bei Individuen aus ‚Ahr‘ und ‚Wupper 2‘ gefunden wurden. Eine Vermischung zwischen den Linien IIa und IIb lässt sich auf niedrigem Niveau nachweisen und war in NRW vor allem im östlichen Teil der FGE Rhein zu beobachten (Abbildung 7). So kommt Composite-Haplotyp Thy49 (Linie IIb) auch in der Population der Lenne vor und Composite-Haplotyp Thy45 (Linie IIb) in den Populationen Alme und Lippe. Dies ist jedoch für die Grenzbereiche von genetischen Hauptlinien der Äsche nichts Ungewöhnliches und kann u.a. durch nacheiszeitliche Sekundärkontakte natürlich entstanden sein. So konnten Gum *et al.*

(2005) eine Vermischung der genetischen Hauptlinien in Populationen der Grenzbereiche zwischen den Hauptlinien IIa, IIb und III nachweisen.

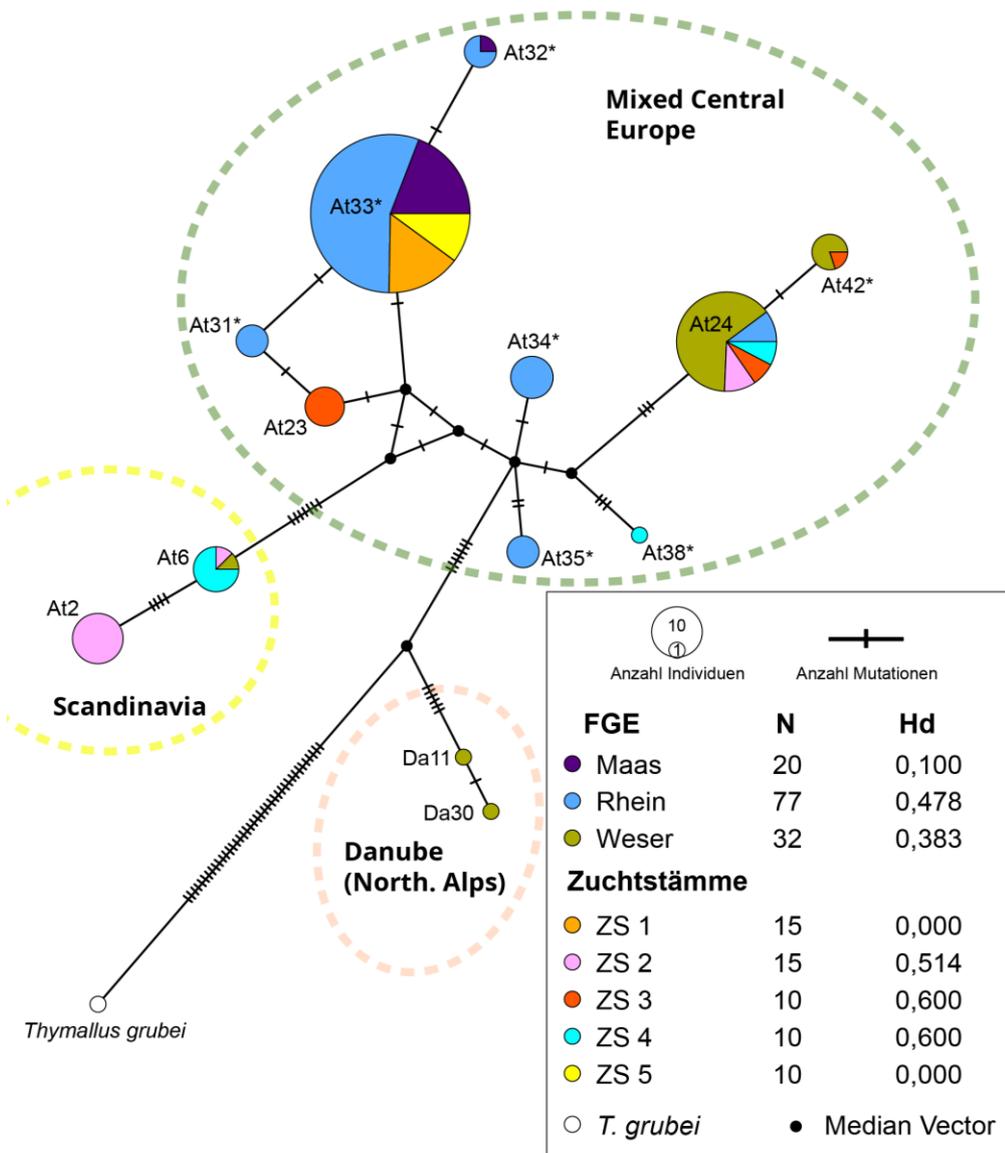


Abbildung 6: Median-Joining Haplotypen Netzwerk bestehend aus 13 Haplotypen der mitochondrialen Kontrollregion (CR), welche in den 12 untersuchten Wildpopulationen aus 3 verschiedenen Flussgebietseinheiten (FGE) und den 5 untersuchten Zuchtstämmen der Äsche detektiert wurden. Diese gruppieren sich in 3 genetische Hauptlinien ein (Weiss *et al.*, 2002). Jeder Kreis repräsentiert einen individuellen Haplotyp, wobei die Größe des Kreises proportional zur Haplotyp-Frequenz ist. Die Kreise sind nach ihrer Zugehörigkeit zu einer FGE bzw. einem Zuchtstamm eingefärbt. Die Anzahl an Querlinien auf den Verbindungslinien zeigt die Anzahl der Mutationen zwischen den einzelnen Haplotypen an. In der Legende sind neben den FGEs bzw. Zuchtstämmen die Anzahl der jeweils analysierten Individuen (N) und die jeweilige Haplotypendiversität (H_d) angegeben. Mit * markierte Haplotypen wurden im Rahmen dieser Untersuchung neu beschrieben.

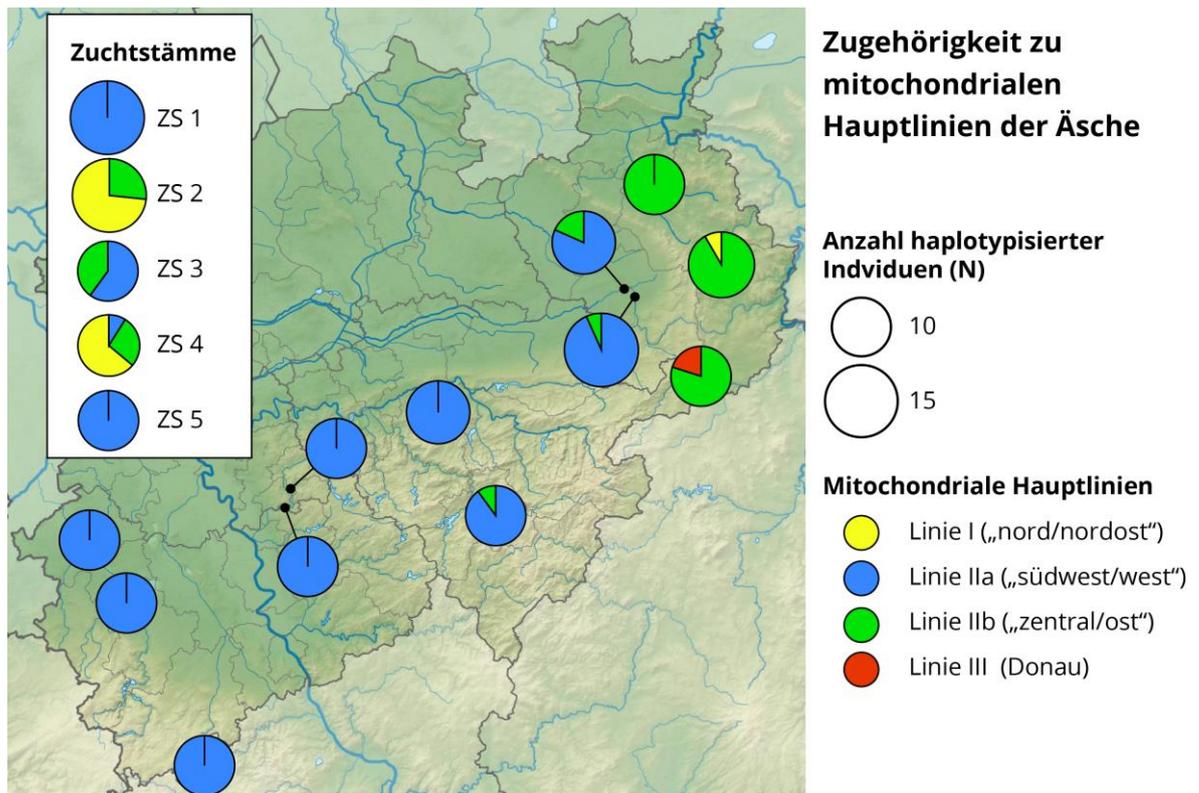


Abbildung 7: Mitochondriale Hauptlinien auf Basis der RFLP-Analyse der ND1- & ND5/6-Region in den untersuchten Wildpopulationen und Zuchtstämmen. Dargestellt sind die prozentualen Zugehörigkeiten der haplotypisierten Individuen zu den Hauptlinien nach Gum et al. (2005). (Karte verändert nach: //commons.wikimedia.org/wiki/File:North_Rhine-Westphalia_location_map_03.svg)

Tabelle 6: Paarweise ϕ_{ST} -Werte basierend auf den Sequenzdaten der mitochondrialen Kontrollregion (CR, unterhalb der Diagonalen) und paarweise F_{ST} -Werte der mitochondrialen RFLP-Analyse der ND1- & ND5/6-Region (oberhalb der Diagonalen) zwischen den Flussgebietseinheiten. Signifikante Werte sind fett dargestellt ($p < 0,001$).

	Maas	Rhein	Weser
Maas		0,4142	0,8574
Rhein	0,0569		0,8015
Weser	0,7799	0,6941	

Tabelle 7: Ergebnisse der hierarchischen AMOVA (Analysis of Molecular Variance) für die mitochondrialen RFLP-Daten (ND1 & ND5/6) gruppiert nach den untersuchten Äschen-Wildpopulationen und den entsprechenden fünf Flussgebietseinheiten (FGEs). Dargestellt sind die Freiheitsgrade (df), Summe der Quadrate (SSD), Varianzkomponenten (CV), Prozentanteil der Gesamtvarianz (% total), die Fixationsindices (FI) und deren Signifikanz (***: $p < 0,001$).

Genetische Variationen	Kontrollregion (CR)					ND1 & ND5/6				
	df	SSD	CV	% total	FI	df	SSD	CV	% total	FI
Zwischen FGEs	2	127,9	1,69	63,42	$\varphi_{CT} = 0,63423$ ***	2	715,1	9,72	76,47	$F_{CT} = 0,76473$ ***
Zwischen Pop. innerhalb der FGEs	9	27,8	0,22	8,08	$\varphi_{SC} = 0,22096$ ***	9	71,0	0,50	3,94	$F_{SC} = 0,16758$ ***
Innerhalb der Pop.	117	88,9	0,76	28,49	$\varphi_{ST} = 0,71505$ ***	117	291,1	2,49	19,58	$F_{ST} = 0,80416$ ***
Gesamt	128	244,6	2,67			128	1077,2	12,71		

Die Zugehörigkeit von zwei Individuen der Diemel-Population zu einem Composite-Haplotypen der Linie III muss ebenfalls nicht zwangsläufig ein Hinweis auf FGE-übergreifende Besitzmaßnahmen sein (Abbildung 7). Geringe Häufigkeiten von Haplotypen der Linie III in Populationen anderer FGEs als der Donau sind nicht ungewöhnlich und so konnte auch in anderen Studien ein vereinzelt, weiträumiges Auftreten der Linie III in Populationen der FGEs Weser, Rhein und Elbe beobachtet werden (Gum *et al.*, 2005; Kühn, 2011).

Überraschend ist jedoch das Auftreten von Composite-Haplotypen der nordöstlichen Linie I (H28, H26) in der Wildpopulation der Emmer und die Dominanz dieser Composite-Haplotypen in den Zuchtstämmen ZS 2 und ZS 4 (Abbildung 7). Das Auftreten von H28 in der Emmer (1 Individuum, Totallänge = 120mm) ist dabei mutmaßlich auf den Besitz mit Äschen aus ZS 2 zurückzuführen.

In Bezug auf die Haplotypenanalyse der mitochondrialen Kontrollregion (CR) zeigt sich insgesamt ein ähnliches Bild. Der Hauptunterschied ist dabei die geringere Abgrenzbarkeit zwischen Individuen aus den FGEs Weser und Rhein, die sich hauptsächlich in der gemeinsamen Linie „Mixed Central Europe“ (Weiss *et al.*, 2002) wiederfinden. Auch grenzen sich die Individuen aus den beiden Herkünften der FGE Maas nicht von denen der FGE Rhein ab und gehören zu gemeinsamen Haplotypen.

Die insgesamt deutliche Abgrenzung zwischen den FGEs zeigt sich auch in Hinblick auf das hohe Maß an genetischer Differenzierung (paarweisen Φ_{ST} - bzw. F_{ST} -Werte zwischen den FGE, Tabelle 9). Für beide mitochondriale Markersysteme zeigte dabei die FGE Maas gegenüber der FGE Weser die höchste Differenzierung, während die FGEs Maas und Rhein die niedrigsten Werte zeigen und nur hinsichtlich der mitochondrialen RFLP-Daten (ND1 & ND5/6) signifikant voneinander differenziert sind ($F_{ST} = 0,4142$,

Tabelle 6).

Für die Untersuchung der genetischen Varianz und Differenzierung innerhalb und zwischen den untersuchten Populationen und FGEs wurde eine Analyse der molekularen Varianz (AMOVA) durchgeführt. Die Ergebnisse der AMOVA zeigten auf allen hierarchischen Ebenen (zwischen FGEs, zwischen Populationen innerhalb der FGEs, und innerhalb der Populationen) eine signifikante genetische Differenzierung (Tabelle 7). Der Großteil der genetischen Variabilität wird danach durch die Varianz zwischen Flussgebietseinheiten (76,47% bzw. 63,42%) erklärt. Durch die Varianz zwischen den Populationen innerhalb der FGEs können dagegen nur 3,94% bzw. 8,08% der Gesamtvarianz erklärt werden. Die untersuchten Äschenpopulationen in Nordrhein-Westfalen zeigen somit eine relativ große genetische Variation auf überregionaler Ebene mit einer eingeschränkten Diversität zwischen Populationen innerhalb einer FGE. Die Differenzierung innerhalb der Populationen erklärt noch 19,58% bzw. 28,49% der beobachteten Gesamtvarianz. Zusammenfassend sind demnach etwa 80% bzw. 71% der detektierten mitochondrialen Varianz mit einer genetischen Differenzierung auf regionaler und überregionaler Ebene zu begründen, die dabei vorwiegend auf die Ebene der Flussgebietseinheiten zurückführbar ist. Dieses Maß an Differenzierung auf Ebene der FGEs und Populationen ist wesentlich höher als bei anderen Fischarten wie Bachforelle (Schmidt *et al.*, 2015) oder Barbe (Berendonk *et al.*, 2015) und liegt eher im Bereich dessen was für die Quappe beobachtet wurde (Wetjen *et al.*, 2016).

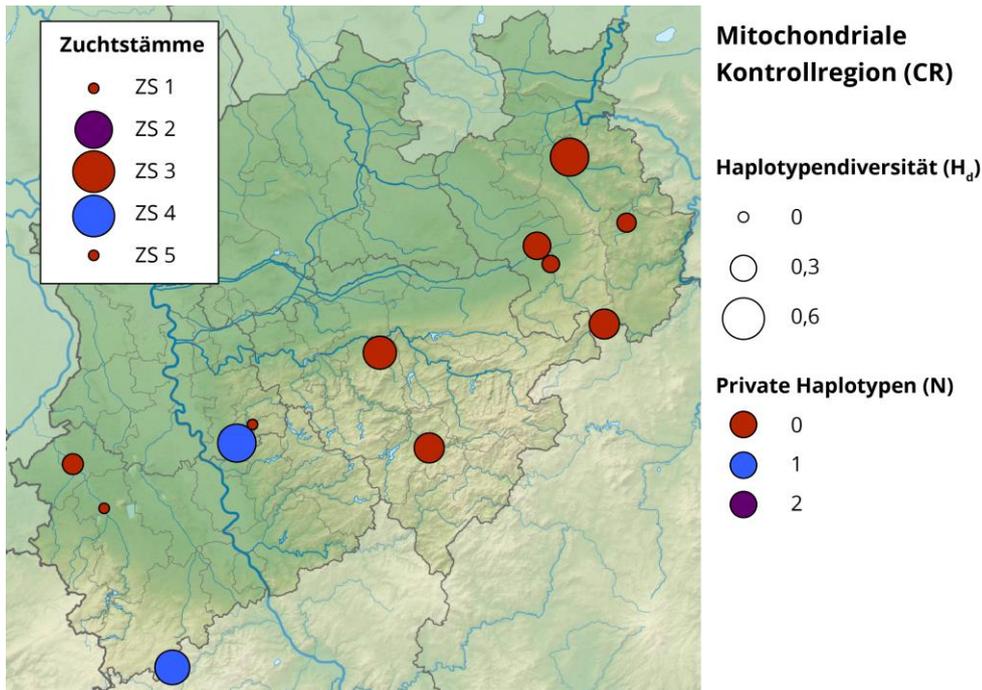


Abbildung 8: Kartografische Darstellung der Haplotyp-Diversität und der Anzahl der Privaten Haplotypen für die hinsichtlich der mitochondrialen Kontrollregion (CR) untersuchten Herkünfte (Wildpopulationen und Zuchtstämme). (Karte verändert nach: [//commons.wikimedia.org/wiki/File:North_Rhine-Westphalia_location_map_03.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:North_Rhine-Westphalia_location_map_03.svg))

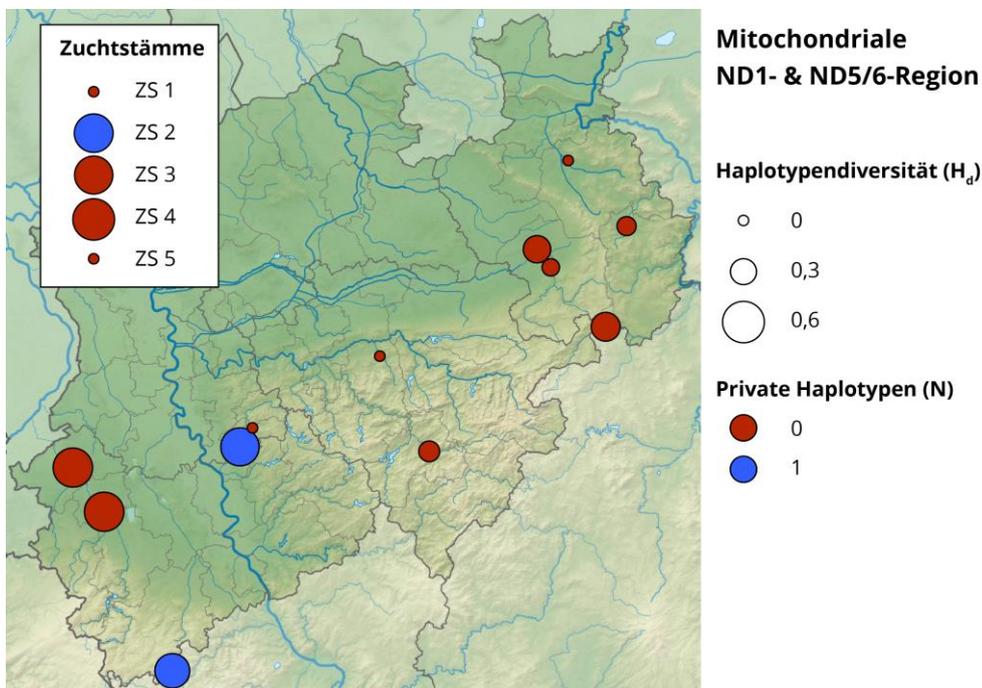


Abbildung 9: Kartografische Darstellung der Haplotyp-Diversität und der Anzahl der Privaten Haplotypen für die hinsichtlich der mitochondrialen ND1- & ND5/6-Region untersuchten Herkünfte (Wildpopulationen und Zuchtstämme). (Karte verändert nach: [//commons.wikimedia.org/wiki/File:North_Rhine-Westphalia_location_map_03.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:North_Rhine-Westphalia_location_map_03.svg))

5.2.3 Mikrosatellitenanalyse

Die höchste maximale Allelzahl pro Herkunft wurde für die Loci ‚BFRO010‘ und ‚Ogo2‘ mit 10 Allelen in ZS 4 gefunden; die kleinste maximale Allelzahl pro Herkunft wurde für den Locus ‚SSOSL311‘ mit 2 Allelen detektiert. Die mittleren Allelzahlen pro Locus schwankten damit zwischen 1,06 für Locus ‚SSOSL311‘ und 6,47 für Locus ‚Ogo2‘. Die maximale Anzahl von nur 3 privaten Allelen in nur einer Herkunft (‚ZS 4‘) lässt auf eine relativ geringe genetische Differenzierung zwischen den einzelnen Beständen schließen. So konnten in 10 der 17 untersuchten Herkünfte keine privaten Allele detektiert werden (Abbildung 10), wodurch die mittlere Anzahl privater Allele über alle Populationen hinweg mit 0,76 ebenfalls sehr gering ausfällt (Tabelle 8).

Die in der vorliegenden Studie ermittelte durchschnittliche Heterozygotierate ($\overline{H}_{EC} = 0,35$) über alle untersuchten Populationen hinweg ist im Vergleich zu anderen Mikrosatelliten-Studien an Wild- und Zuchtfischpopulationen in Deutschland als gering zu werten (Kohlmann, 2003; Berendonk *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2015; Wetjen *et al.*, 2016). Der Wert liegt aber nah an dem Wert, der bundesweit für die Populationen der Äsche ermittelt wurde (Köbsch *et al.*, in Vorbereitung). Der erwartete Heterozygotiegrad auf Ebene der Flussgebietseinheiten ist im Rhein mit $H_{EC} = 0,509$ am höchsten und in der Maas mit $H_{EC} = 0,363$ am niedrigsten. Auf Populationsebene liegt der erwartete Heterozygotiegrad zwischen 0,15 für Zuchtstamm ZS 5 und 0,55 für Zuchtstamm ZS 4. Die geringen Werte für H_{EC} können Anzeichen für geringe effektive Populationsgrößen und/oder für weit zurückliegende Bottlenecks sein. So fanden Meldgaard, Nielsen & Loeschcke (2003) und Swatdipong, Primmer & Vasemägi (2010) Hinweise für sehr starke, lang zurückliegende Bottlenecks bei der Äsche und gehen davon aus, dass die heutigen Populationsgrößen noch 0,03-3,3% der Populationsgrößen von vor ca. 7000-100.000 Jahren betragen. Auch wurden generell geringe effektive Populationsgrößen für die Äsche gefunden, die oftmals weniger als 50 Individuen betragen (Swatdipong *et al.*, 2010; Dawnay *et al.*, 2011). Die Situation in den untersuchten Gewässern (Bestandsgrößen, Habitate, Bewirtschaftung) lässt kleine Populationen vermuten, die durch Fragmentierung und Besatzmaßnahmen beeinträchtigt sind. Flaschenhalseffekte in zumindest einem Teil der Populationen wären daher zu erwarten. Ähnlich zur genetischen Untersuchung von Äschenpopulationen in Tirol und Südtirol (Weiss, Mattersdorfer & Börger, 2015) konnten allerdings auch im hier untersuchten Datensatz mithilfe des ‚Heterozygosity-Excess‘-Tests (Piry *et al.*, 1999) keine Hinweise auf genetische Flaschenhalseffekte gefunden werden (Tabelle 11).

Allerdings ist hierbei zu beachten, dass die angewendeten Tests sehr konservativ sind und in vielen Fällen vorhandene Flaschenhalseffekte nicht ausreichend detektieren (Peery *et al.*, 2012). Allein aufgrund der sehr geringen Populationsgrößen in Herkünften wie der ‚Ahr‘ und mehrerer flächendeckender Bestandseinbrüche innerhalb der letzten Jahrzehnte aufgrund von Gewässerverschmutzung, Habitatverlust und Kormoranprädation ist jedoch von der Existenz von rezenten Flaschenhals- oder Gründereffekten auszugehen.

Tabelle 8: Ergebnisse der genetischen Analysen auf Basis der Mikrosatelliten der 12 analysierten Wildpopulationen und 5 analysierten Zuchtstämme. Dargestellt ist die Anzahl der Individuen mit erfolgreicher Mikrosatelliten-Analyse (MS N), die maximale Allelzahl pro Mikrosatellit (A_{max} pro MS), die durchschnittliche Allelzahl ($\bar{\theta}$ A), die Anzahl Privater Allele (PA N), der beobachtete (H_o) und erwartete Heterozygotiegrad (H_{EC}), die niedrigste (F_{ST} min) und höchste genet. Differenzierung (F_{ST} max), der Inzuchtkoeffizient (F_{IS}), der Populationscode in der AGRDEU-Datenbank sowie Informationen zum Besatz in der jeweiligen Population: A=aktueller Besatz, V=Besatz in Vergangenheit, N=kein Besatz, U=Besatzsituation konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Population	MS N	A_{max} pro MS	$\bar{\theta}$ A	PA N	AR	H_o	H_{EC}	F_{IS}	F_{ST} min	F_{ST} max	AGRDEU Code	Besatz
Rur1	31	8	3,75	0	3,18	0,33	0,35	0,03	0,0360	0,4345	THY-012	N
Rur2	14	5	2,33	0	2,28	0,32	0,30	-0,09	0,0360	0,4638	THY-013	N
Ahr	30	7	2,50	1	2,05	0,27	0,24	-0,12	0,2667	0,5495	THY-014	N
Alme	36	7	3,00	0	2,41	0,26	0,25	-0,04	0,0019	0,4585	THY-015	A
Hönne	31	9	3,42	2	2,74	0,31	0,33	0,05	0,0410	0,4470	THY-018	U
Lenne	27	5	2,83	0	2,64	0,41	0,38	-0,09	0,1476	0,3884	THY-020	V
Lippe	25	6	2,75	1	2,42	0,27	0,27	0,01	0,0019	0,4543	THY-021	A
Wupper1	25	7	2,75	0	2,51	0,32	0,31	-0,03	0,0547	0,4582	THY-024	U
Wupper2	28	8	3,17	1	2,87	0,34	0,33	-0,03	0,0410	0,4244	THY-025	U
Bega	31	7	3,25	0	3,02	0,43	0,43	-0,01	0,1199	0,5562	THY-026	V
Diemel	30	7	3,83	0	3,14	0,40	0,42	0,04	0,1135	0,5819	THY-027	A
Emmer	32	9	4,25	3	3,42	0,42	0,42	0,01	0,0783	0,6084	THY-028	A
ZS 1	40	4	2,33	0	2,13	0,23	0,22	-0,03	0,0303	0,4905	-	-
ZS 2	30	7	3,92	0	3,30	0,55	0,47	-0,17	0,0783	0,5851	-	-
ZS 3	32	7	3,42	0	3,07	0,43	0,46	0,05	0,1434	0,4794	-	-
ZS 4	30	10	5,92	3	4,76	0,51	0,55	0,07	0,1135	0,4621	-	-
ZS 5	34	4	1,83	2	1,74	0,18	0,15	-0,20	0,3351	0,6084	-	-
Summe (N)	506			13								
Mittelwert		6,88	3,25	0,76	2,81	0,35	0,35	-0,03	0,096	0,497		
CV%		23,8	28,1	138,5	24,0	27,6	29,2	245,1	90,7	13,5		

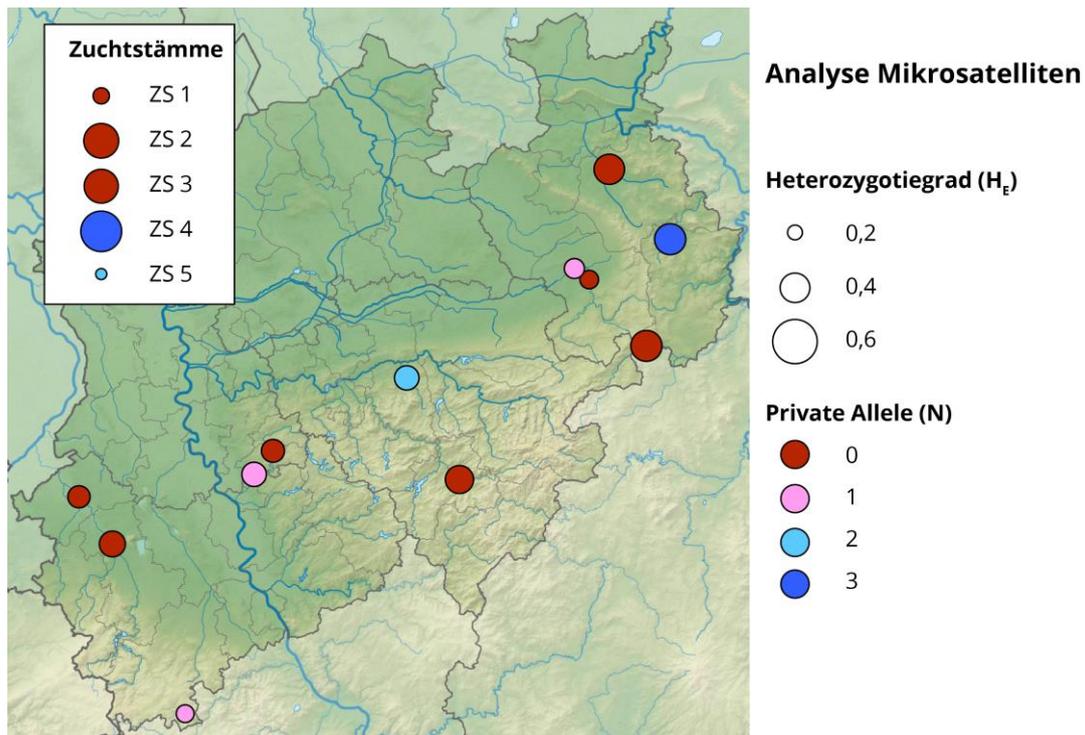


Abbildung 10: Kartografische Darstellung des Heterozygotiegrades sowie die Anzahl Privater Allele der Herkünfte, von denen Mikrosatelliten analysiert wurden. (Karte verändert nach: //commons.wikimedia.org/wiki/File:North_Rhine-Westphalia_location_map_03.svg)

Tabelle 9: Paarweise F_{ST} -Werte basierend auf den Mikrosatellitendaten zwischen den Flussgebietseinheiten. Alle F_{ST} -Werte sind signifikant ($p < 0,001$).

	Maas	Rhein	Weser
Maas			
Rhein	0,1185		
Weser	0,3466	0,3223	

Tabelle 10: Ergebnisse der hierarchischen AMOVA (Analysis of Molecular Variance) für die Mikrosatelliten-Daten der Wildpopulationen. Die Individuen wurden nach ihren Populationen und nach den drei Flussgebietseinheiten (FGEs) gruppiert. Dargestellt sind die Freiheitsgrade (df), Summe der Quadrate (SSD), Varianzkomponenten (CV), Prozentanteil der Gesamtvarianz (% total), die Fixationsindices (FI) und deren Signifikanz (***: $p < 0,001$).

Genetische Variationen	df	SSD	CV	% total	FI
Zwischen FGEs	2	380,368	0,84710	24,29	$F_{CT} = 0,24291^{***}$
Zwischen Populationen innerhalb der FGEs	9	272,465	0,49848	14,29	$F_{SC} = 0,18881^{***}$
Innerhalb der Populationen	668	1430,633	2,14167	61,41	$F_{ST} = 0,38586^{***}$
Gesamt	679	2083,466	3,48725		

Tabelle 11: Flaschenhalseffekt-Statistik der analysierten 12 Wildpopulationen und 5 Zuchtstämme auf Basis der Mikrosatelliten-Daten. Dargestellt sind die Anzahl der analysierten Individuen (N), die Signifikanz des Wilcoxon-Tests („Heterozygosity Excess Test“ unter dem zwei-Phasen-Model), der Mode-shift-Indikator.

Population	N	Flaschenhalseffekt-Statistik		
		p-Wert Test (TPM)	Wilcoxon-	Mode-shift-Indikator
Rur1	31	0,875 ^{NS}		L-shap.
Rur2	14	0,320 ^{NS}		L-shap.
Ahr	30	0,902 ^{NS}		L-shap.
Alme	36	0,918 ^{NS}		L-shap.
Hönne	31	0,998 ^{NS}		L-shap.
Lenne	27	0,213 ^{NS}		L-shap.
Lippe	25	0,903 ^{NS}		L-shap.
Wupper1	25	0,674 ^{NS}		L-shap.
Wupper2	28	0,820 ^{NS}		L-shap.
Bega	31	0,246 ^{NS}		shifted
Diemel	30	0,920 ^{NS}		L-shap.
Emmer	32	0,949 ^{NS}		L-shap.
ZS 1	40	0,752 ^{NS}		L-shap.
ZS 2	30	0,615 ^{NS}		L-shap.
ZS 3	32	0,246 ^{NS}		L-shap.
ZS 4	30	0,998 ^{NS}		L-shap.
ZS 5	34	0,344 ^{NS}		L-shap.

Die in dieser Studie festgestellte genetische Diversität der Äsche innerhalb der Populationen ($\theta_A = 3,25$ / $\theta_{HEC} = 0,35$) ist, verglichen mit anderen Fischarten im selben Untersuchungsgebiet, als gering einzuschätzen. So zeigen die Bachforelle ($\theta_A = 9,24$ / $\theta_{HEC} = 0,70$), die Barbe ($\theta_A = 6,4$ / $\theta_{HEC} = 0,66$) und die Quappe ($\theta_A = 9,27$ / $\theta_{HEC} = 0,73$) einen wesentlich höheren Grad an Diversität innerhalb von Populationen (Berendonk *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2015; Wetjen *et al.*, 2016). Geringe Diversitätsindices innerhalb von Äschenpopulationen wurden auch in anderen Studien festgestellt (Köbsch *et al.*, in Vorbereitung; Koskinen *et al.*, 2002; Gum *et al.*, 2005; Dawney *et al.*, 2011). Die dort gefundenen Werte liegen mit $\theta_A = 2,5 - 3,5$ und $\theta_{HEC} = 0,37 - 0,41$ sehr nah an denen dieser Studie bzw. entsprechen diesen. Diese geringe Diversität in den Populationen kann unter anderem mit der Lebensweise der Äsche als standorttreue, gesellige Fischart mit ausgeprägtem Homing-Verhalten erklärt werden. So stellten Heggenes *et al.* (2006) fest, dass die in norwegischen Flüssen untersuchten Äschen größtenteils standorttreu ($\pm 0,5$ km) waren und nur wenige Individuen Wanderungen über 100km Länge durchführen. Bedenkt man den Grad der Fragmentierung der Fließgewässersysteme und die im Vergleich zu anderen Salmoniden schwächeren Leistungen bei der Überwindung von Hindernissen

(Jungwirth, 1996; Ovidio & Philippart, 2002), ist von einem geringen Genfluss zwischen Populationen desselben Einzugsgebiets auszugehen. Dazu passend konnten wir eine signifikante Differenzierung zwischen fast allen Wildpopulation feststellen (vgl. Appendix 1), wie sie für die Äsche auch in anderen Teilen Deutschlands oder in Großbritannien gefunden wurde (Köbsch *et al.*, in Vorbereitung; Dawnay *et al.*, 2011). Trotz dieses geringen Genflusses und der eingeschränkten genetischen Diversität sind keine Inzuchteffekte zu erkennen (Tabelle 8). ‚ZS 5‘ und ‚Emmer‘ sind dabei im Datensatz die am stärksten differenzierten Herkünfte (siehe maximale F_{ST} -Werte in Appendix 1), wobei der Zuchtstamm ‚ZS 2‘ meist ähnliche hohe Werte aufzeigt wie die dazugehörige Wildpopulation ‚Emmer‘.

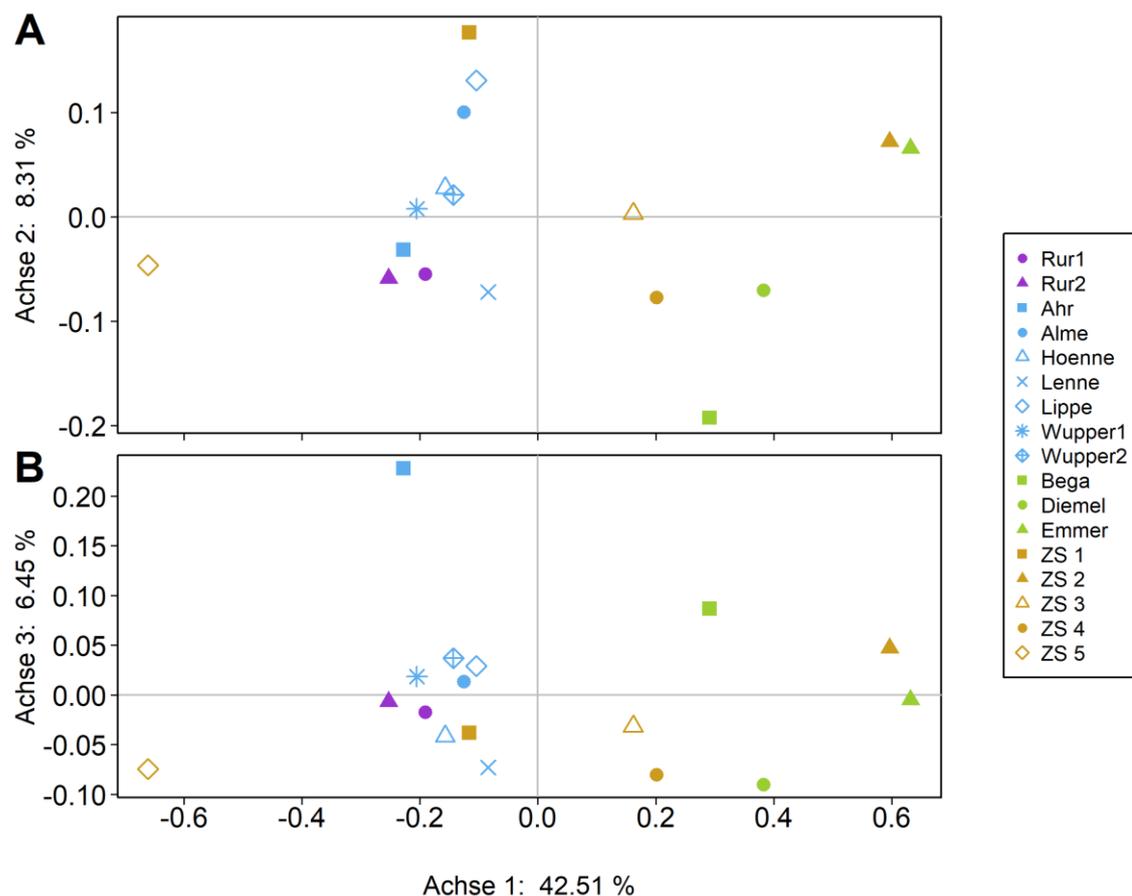


Abbildung 11: Hauptkoordinaten-Analyse der 12 Wildpopulationen aus den Flussgebietseinheiten Maas (lila), Rhein (blau) und Weser (grün) und 5 Zuchtstämmen (orange) auf Basis ihrer Nei-Distanzen unter Verwendung des Mikrosatelliten-Datensatzes. (A) Hauptkoordinate 1 gegen Hauptkoordinate 2, (B) Hauptkoordinate 1 gegen Hauptkoordinate 3. Diese drei Achsen erklären zusammen 57,3 % der Gesamtvariation im Datensatz.

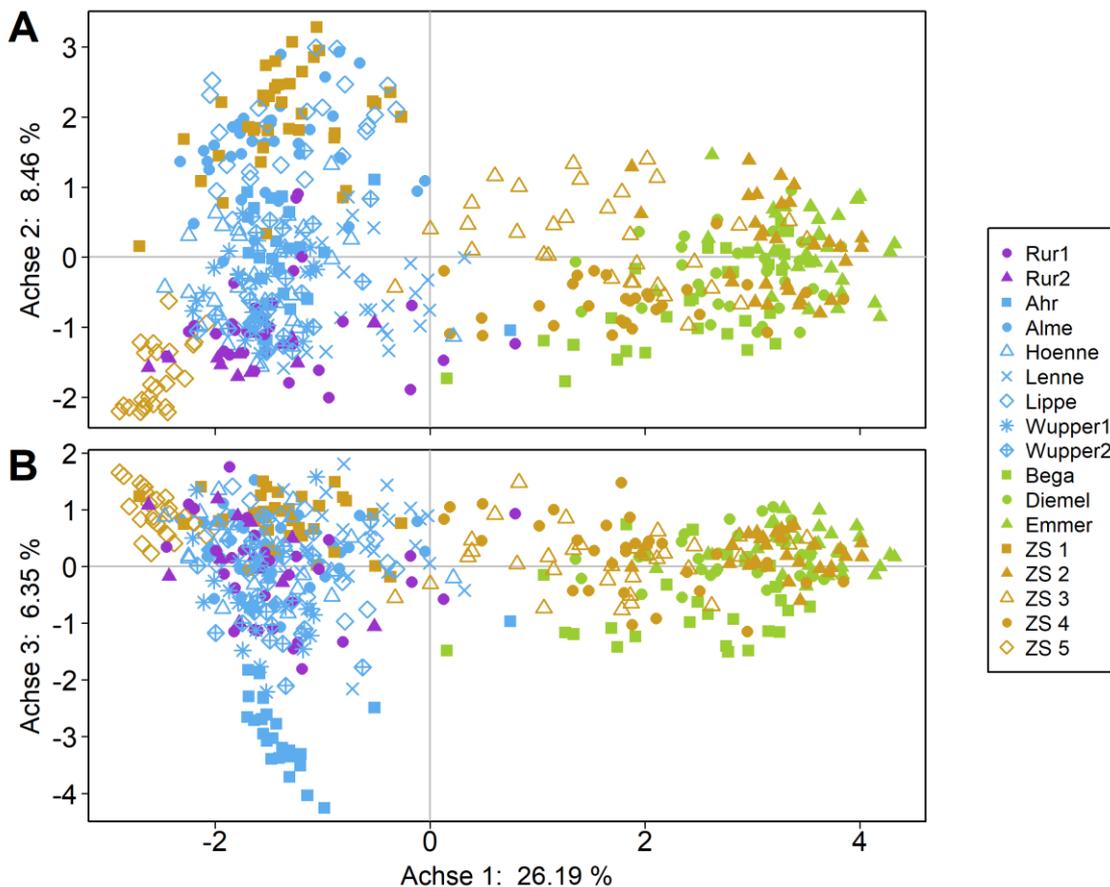


Abbildung 12: Individuenbasierte Hauptkoordinaten-Analyse der 12 Wildpopulationen aus den Flussgebietseinheiten Maas (lila), Rhein (blau) und Weser (grün) und 5 Zuchtstämme (orange) auf Basis ihrer binären Distanzen. (A) Hauptkoordinate 1 gegen Hauptkoordinate 2, (B) Hauptkoordinate 1 gegen Hauptkoordinate 3. Diese drei Achsen erklären zusammen 41 % der Gesamtvariation im Datensatz.

Die Hauptkoordinatenanalyse zur räumlichen Darstellung der genetischen Ähnlichkeiten und Beziehungen der Populationen (Abbildung 11) und Individuen (Abbildung 12) zueinander zeigt auf Populationsebene ein Bild ähnlich dem Haplotypennetzwerk der ND1- & ND5/6-Region mit einer klaren Abgrenzung zwischen der FGE Weser und einem gemeinsamen Cluster der FGEs Rhein/Maas. Diese Trennung ist in erster Linie entlang der jeweils ersten Hauptkoordinate (Achse) mit dem höchsten Erklärungsanteil an der Gesamtvarianz zu erkennen (Abbildung 11, Abbildung 12). Die Populationen der FGEs Rhein und Maas sind sowohl auf Individuen- als auch auf Populationsebene nicht voneinander abgegrenzt. Zu erkennen ist weiterhin, dass sich in der Hauptkoordinatenanalyse der Populationen (Abbildung 11) der Zuchtstamm ‚ZS 5‘ entlang der ersten Achse von den anderen Herkünften abgrenzt, während diese Herkunft hinsichtlich der individuenbasierten

Hauptkoordinatenanalyse am Rande des Rhein/Maas-Clusters befindet (Abbildung 12). Die Zuchtstämme ‚ZS 3‘ und ‚ZS 4‘ befinden sich in der Darstellung der ersten drei Hauptkoordinaten jeweils im Übergangsbereich Weser- und Rhein/Maas-Cluster. In beiden Hauptkoordinatenanalysen grenzen sich die Herkünfte ‚Alme‘, ‚Lippe‘ und ‚ZS 1‘ jeweils entlang der zweiten und die Herkunft ‚Ahr‘ jeweils entlang der dritten Hauptkoordinatenachsen von den übrigen Herkünften der FGEs Rhein und Maas ab.

Insgesamt ist zu beachten, dass der Erklärungsanteil der dargestellten ersten drei Achsen relativ gering ist. Das hohe Maß an Differenzierung der Populationen innerhalb der FGEs, wie es durch die signifikante Differenzierung auf Basis der F_{ST} -Werte gezeigt wird, kann von der Hauptkoordinatenanalyse basierend auf den ersten drei Achsen daher nur unzureichend dargestellt werden. Die Differenzierung erfolgt also auf den anderen Achsen bzw. Eigenvektoren.

Die ‚Structure‘ Analyse zur Abschätzung der Populationsstruktur und Ermittlung der Anzahl der sich genetisch unterscheidenden Gruppen (K) ergab basierend auf der Evanno Methode (Evanno et al., 2005) eine Anzahl von 4 bzw. 8 Clustern, welche die genetischen Muster der Äschenpopulationen im untersuchten Datensatz am besten erklären. Dabei ist zu beachten, dass diese Analyse zusätzlich zum Datensatz dieser Studie auch alle im Rahmen der bundesweiten Untersuchung zur genetischen Diversität der Äsche analysierten Populationen Deutschlands (Köbsch *et al.*, in Vorbereitung) umfasst.

Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, gibt es basierend auf der ‚Structure‘-Analyse unter Verwendung des ‚Admixture Modells‘ (mit $K = 4$ bzw. $K = 8$) keine Herkunft, die nur einer einzelnen Gruppe zugeordnet werden kann. Insgesamt lassen sich jedoch relativ klare Muster im Sinne einer Abgrenzung der FGEs voneinander erkennen: Im Fall von 4 Clustern ($K = 4$) sind die Herkünfte des Wesereinzugsgebiets und der Zuchtstamm ‚ZS 2‘ vorwiegend Genotypcluster 4 (Grün, Abbildung 13) zugeordnet, während die Individuen des Maas- und Rheineinzugsgebiets sowie die Zuchtstämme ‚ZS 1‘ und ‚ZS 5‘ eine überwiegende Zuordnung zu Genotypcluster 3 (Blau, Abbildung 13) zeigen. Die Individuen des Zuchtstamm ‚ZS 3‘ können überwiegend dem Cluster 4 zugeordnet werden, zeigen aber ähnlich denen der Herkunft ‚Bega‘ eine Durchmischung von ca. 5-60% mit Genotypen des Clusters 3. Ein hohes Maß an Durchmischung von Genotypen der Cluster 1, 2 und 4 (Rot, Orange, Grün, Abbildung 13) konnte für die Individuen des Zuchtstamms ‚ZS 4‘ detektiert werden. Die Genotypcluster 1 und 2 (Rot und Orange) konnten überwiegend Individuen des

Donau- (Cluster 1) bzw. Elbeeinzugsgebiets (Cluster 2) zugeordnet werden (Köbsch *et al.*, in Vorbereitung). Insgesamt zeigen viele Individuen in Abhängigkeit der Populationszugehörigkeit zusätzlich zu den jeweils dominierenden Clustern eine Durchmischung von etwa 10-50% mit anderen Clustern, welches auf einen gewissen Genfluss zwischen Populationen aus unterschiedlichen genetischen Clustern hindeutet. Dabei ist zu beachten, dass laut Gum *et al.* (2009) das natürliche Auftreten von klar getrennten genetischen Linien zwischen Populationen und Einzugsgebieten „eher die Ausnahme als die Regel“ sein dürfte.

Die Ergebnisse für 8 potentielle Genotypcluster ($K = 8$) zeigen prinzipiell ein ähnliches Muster (Abbildung 13). Die Herkünfte ‚Bega‘ und ‚Diemel‘ der FGE Weser zeigen eine Durchmischung unterschiedlichen Grades zwischen den Clustern 4 und 7 (Grün und Gelb) und grenzen sich damit von den Individuen der FGEs Rhein und Maas ab. Mit ihrer hauptsächlichen Zugehörigkeit zu Cluster 5 (Lila) trennen sich die Herkünfte der FGE Maas (‚Rur 1‘, ‚Rur 2‘), sowie die Individuen der Herkünfte ‚ZS 5‘ und ‚Lenne‘ sowie einige Individuen der Herkünfte ‚Hönne‘ und ‚Wupper 2‘ von den übrigen Individuen des Rheineinzugsgebiets ab. Darüber hinaus konnte für die Herkünfte ‚Emmer‘ (FGE Weser) und ‚ZS 2‘ eine überwiegende Zugehörigkeit zu Cluster 8 (Pink) und für ‚Alme‘ und ‚Lippe‘ (FGE Rhein) eine Durchmischung von Cluster 3 und 8 festgestellt werden. Die Individuen des Zuchtstamms ‚ZS 4‘ zeigen eine starke Durchmischung mehrerer Genotypcluster.

Die Analyse der molekularen Varianz (AMOVA) der Wildpopulationen zeigte auf jeder getesteten hierarchischen Ebene (zwischen FGEs, zwischen Populationen innerhalb der FGEs, innerhalb der Populationen) eine höchst signifikante Differenzierung beruhend auf der Berechnung der F-Statistik (Tabelle 10). Im Kontrast zu den Ergebnissen der AMOVA auf Basis der mitochondrialen Marker (vgl. Tabelle 7), finden wir für die Mikrosatelliten-Marker allerdings einen Großteil der genetischen Variation innerhalb der Populationen (61,4%). Die Vergleiche der genetischen Unterschiede zwischen den Populationen innerhalb der FGEs (14,3%) und zwischen den FGEs (24,3%) erklären dagegen geringere Anteile an der Gesamtvarianz. Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Varianzanteile der betrachteten hierarchischen Ebenen wurden auch in anderen Studien zur Äsche gefunden (Koskinen *et al.*, 2002; Gum *et al.*, 2003, 2005). Obwohl bei anderen Fischarten wesentlich höhere Varianzanteile innerhalb der Populationen festgestellt wurden (z.B. >90% bei Lachs und Bachforelle, siehe King *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2015), steht dieses Ergebnis für die Äsche zum Teil im Widerspruch zu der beobachteten starken genetischen Differenzierung

zwischen den Populationen und FGEs (Tabelle 9, F-Statistik in Tabelle 7, Appendix 1) und zur deutlich erkennbaren Populationsstruktur mit Zuordnung der unterschiedlichen Genotypen zu den FGEs (vgl. Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13). Dies ist wahrscheinlich zum Teil auch auf grundlegende Prozesse der Populationsbiologie zurückzuführen. Ein solcher Prozess ist z.B. ein Gründereffekt während der postglazialen Wiederbesiedlung, welcher aufgrund der geringeren Mutationsrate mitochondrialer Gene gegenüber der höheren Mutationsrate der Mikrosatelliten Marker noch zu erkennen ist. Dadurch zeigt sich z.B. in den RFLP-Daten neben teilweise geringen Haplotypdiversitäten auch ein erhöhter Anteil der genetischen Varianz mit gleichzeitiger Differenzierung auf FGE-Ebene. Aufgrund der lange zurückliegenden Besiedlung erfolgte jedoch auch eine starke Durchmischung der Mikrosatelliten-Allele innerhalb der Populationen. Im Zusammenhang mit der erhöhten Mutationsrate der Mikrosatelliten-Loci bei gleichzeitig geringem Genfluss zwischen den Populationen kann dies sowohl zu einer erhöhten genetischen Variation innerhalb der Populationen als auch zu einer genetischen Differenzierung zwischen den Populationen führen. Folglich ist die detektierte deutliche Trennung der Flussgebietseinheiten mit gleichzeitig relativ hoher genetischer Varianz innerhalb und Differenzierung zwischen den Populationen auf die artspezifische postglaziale Wiederbesiedlung und Lebensweise der Äsche zurückzuführen.

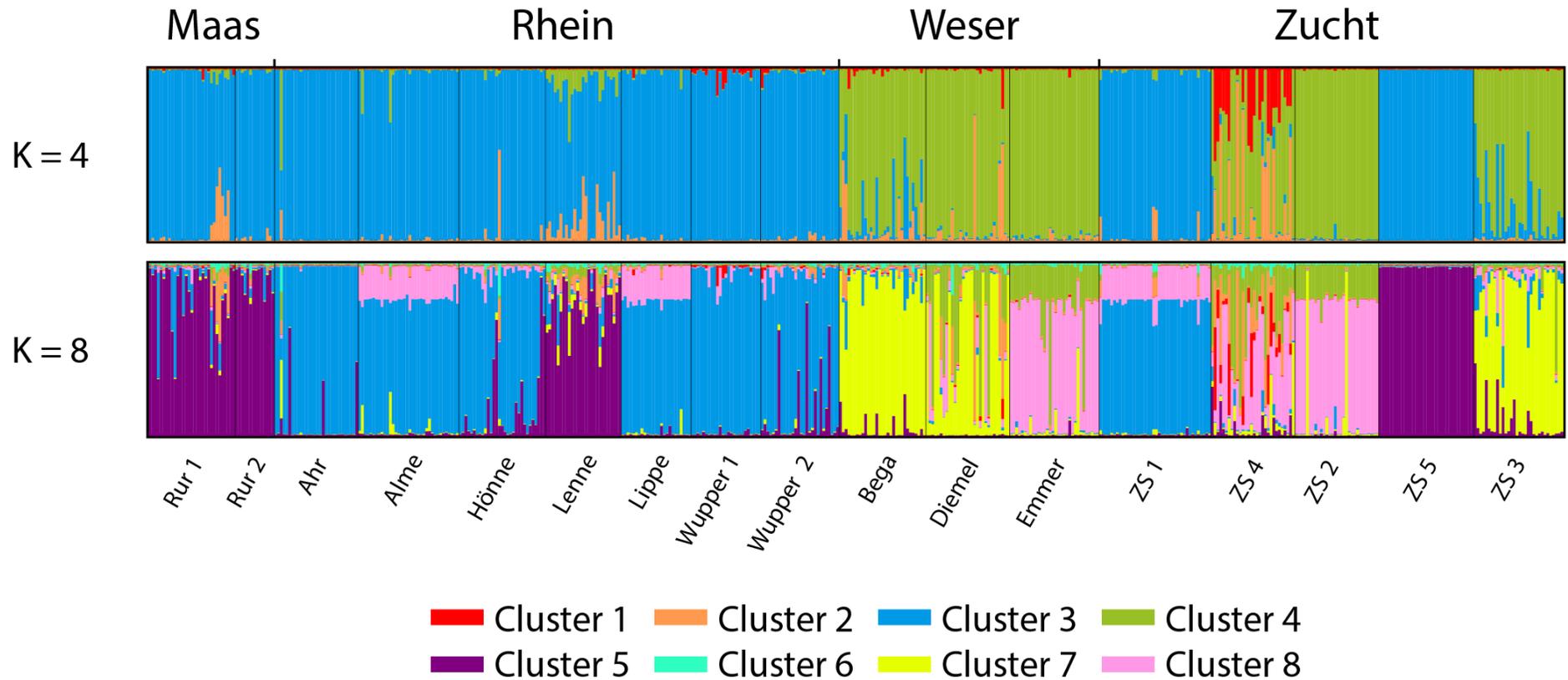


Abbildung 13: Graphische Darstellung der STRUCTURE-Analyse unter Annahme eines Admixture Modells und unabhängiger Allelfrequenzen. Die Zuordnung der 506 untersuchten Individuen der Äsche aus 17 Herkünften erfolgte zu 4 & 8 hypothetischen Clustern (K) bzw. genetischen Linien (siehe Farbcodes). Jedes Individuum ist mit der entsprechenden Zuordnungswahrscheinlichkeit zu einer Gruppe als senkrechter Balken dargestellt. Die Individuen sind nach Herkunftspopulation (unterhalb der Abbildung) und Flussgebietseinheiten bzw. Zuchtstatus (oberhalb der Abbildung) geordnet.

6 VORAUSSICHTLICHE NUTZUNG UND VERWERTBARKEIT DER ERGEBNISSE

6.1 Bewertung der untersuchten Populationen und Bestände der Äsche

Die erhobenen Daten zeigen, dass die Mikrosatelliten und die verwendeten mitochondrialen Marker (Sequenzen der Kontrollregion, RFLP-Analyse der ND1- & ND5/6-Region) adäquat sind, um die genetische Diversität der Äschenbestände in Deutschland zu analysieren. Prinzipiell bleibt jedoch zu diskutieren, ob RFLP-Analysen, abgesehen vom Aspekt der Vergleichbarkeit mit früheren Studien, noch eine zeitgemäße Methode darstellen.

Trotz der festgestellten grundsätzlichen Ähnlichkeiten im Aufbau der Median-Joining-Haplotypennetzwerke, sind die Ergebnisse aus den Analysen der mitochondrialen Kontrollregion und der ND1- & ND5/6-Region nicht deckungsgleich. Erstere weist zwar im Allgemeinen eine höhere Mutationsrate auf, jedoch betrug die analysierte Länge der CR-Sequenz auch nur ca. 25% der kombinierten ND1- & ND5/6-Region. So existiert hinsichtlich der Haplotypendiversität der beiden Markersysteme keine signifikante Korrelation (siehe Appendix 2). Hinsichtlich der genetischen Differenzierung zwischen Populationen sind beide Markersysteme signifikant positiv miteinander korreliert (Appendix 2).

Das Gebiet von Deutschland betreffend bietet die ND1- & ND5/6-Region den Vorteil, dass die hier aufeinandertreffenden FGEs anhand dieser Marker besser voneinander abgegrenzt werden können (

Tabelle 6, Abbildung 5, Abbildung 6). Auch liegen für dieses Gebiet mehrere Vergleichsstudien vor (Köbsch *et al.*, in Vorbereitung; Gum *et al.*, 2005; Kühn, 2011), sodass auch Veränderungen über die Zeit analysiert werden können. Die Analyse der mitochondrialen Kontrollregion bietet dagegen den Vorteil einer besseren europaweiten Vergleichbarkeit (u.a. Weiss *et al.*, 2002, 2013, 2015; Dawnay *et al.*, 2011; Marić *et al.*, 2012; Meraner & Gandolfi, 2012; Persat *et al.*, 2016). Je nach Fragestellung und untersuchter geografischer Region haben also beide

Markersysteme ihre Stärken. Eine klare Empfehlung zur Verwendung eines der beiden mitochondrialen Markersysteme kann daher nicht gegeben werden.

Der Vergleich zwischen den mtDNA- und Mikrosatelliten-Daten ergab, dass die mitochondrialen Daten und die Mikrosatelliten bezüglich der genetischen Differenzierung (F_{ST} -Werte) relativ gut korrelieren (nur für RFLP-Daten getestet, siehe Appendix 2). Das bedeutet, dass zumindest für die Äsche reduzierte Datensätze basierend nur auf mitochondrialer Information genutzt werden könnten, um auch die nukleäre Differenzierung der Äsche grob abzuschätzen. Die Korrelation basierend auf der Haplotypendiversität der RFLP-Analyse und der erwarteten Heterozygotie ist jedoch wesentlich schlechter (siehe Appendix 2) und entsprechend können mitochondriale Datensätze nicht genutzt werden, um auch die nukleäre Diversität abzuschätzen.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die verwendeten Markersysteme eine ausreichende Auflösung gezeigt haben, um Populationen mit hoher bzw. niedriger genetischer Diversität zu identifizieren, bzw. die genetischen Differenzierungen der Populationen zu analysieren.

Genetische Diversität in den untersuchten Herkünften

Insgesamt ist die beobachtete mittlere Haplotypendiversität $\emptyset H_d(CR) = 0,31$ bzw. $\emptyset H_d(RFLP) = 0,29$ im Vergleich zu anderen großräumig untersuchten Fischarten wie Bachforelle ($\emptyset H_d = 0,48$, Schmidt *et al.* 2015), Barbe ($\emptyset H_d = 0,68$, Berendonk *et al.* 2015) oder Quappe ($\emptyset H_d = 0,57$, Wetjen *et al.* 2016) vergleichsweise niedrig. Darüber hinaus besitzen nur wenige Populationen lediglich einen und der Großteil der Populationen keine privaten Haplotypen. Auf der Basis der Haplotypennetzwerke (Abbildung 5, Abbildung 6) lässt sich jedoch eine eindeutige Aufspaltung genetischer Hauptlinien in einzelne FGEs bzw. Gruppen von FGEs erkennen. In Hinblick auf die RFLP-Analyse der ND1- & ND5/6-Region entsprechen diese den drei in Deutschland aneinander grenzenden Hauptlinien IIa, IIb und III (Gum *et al.*, 2003, 2005, 2009), während für die Kontrollregion die mitochondrialen Hauptlinien nach Weiss *et al.* (2002) nachgewiesen werden konnten. Die Populationen mit der geringsten mitochondrialen genetischen Diversität ($H_d=0$) sind 'Wupper 1' ($H_d=0$ für beide Markersysteme), 'Rur 1' und 'Bega' ($H_d=0$ für jeweils 1 Markersystem), was grundsätzlich entweder auf Flaschenhals- oder Gründereffekte (Besiedlung/Initialbesatz durch/mit wenigen weiblichen Individuen) zurückzuführen ist. In genetisch verarmten Populationen wie der 'Wupper 1' besteht prinzipiell ein erhöhtes Aussterbepotential durch stochastische demographische,

ökologische und genetische Ereignisse. Die untersuchten Zuchtstämme zeigen starke Unterschiede hinsichtlich ihrer mitochondrialen Diversität, wobei beide Markersysteme hier sehr ähnliche Ergebnisse zeigen.

Die insgesamt sehr niedrige erwartete Heterozygotie (H_{EC} - korrigiert für die Stichprobenzahl) schwankt innerhalb der untersuchten Äschen-Herkünfte ebenfalls sehr stark, wobei die untersuchten Zuchtstämme sowohl die höchsten als auch die niedrigsten Werte aufweisen. Dabei wurden in den Zuchtstämmen 'ZS 1' und 'ZS 5' die niedrigsten und in den Zuchtstämmen 'ZS 2', 'ZS 3' und 'ZS 4' die höchsten Werte festgestellt. Dieses Muster der Heterozygotie-Werte wird dabei von der ebenfalls beobachteten hohen bzw. niedrigen Haplotypendiversität gespiegelt. Auch Wildpopulationen zeigen teilweise sehr geringe Werte hinsichtlich der nukleären Diversität; dies sind insbesondere die Populationen 'Ahr', 'Alme' und 'Lippe'. Analog zu den Schlussfolgerungen in Bezug auf die mitochondriale Diversität, sind diese Populationen daher als potentiell gefährdet einzustufen, da im Falle einer derartig geringen genetischen Diversität auch ein erhöhtes Aussterbepotential besteht.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse für die untersuchten Wildpopulationen und Zuchtstämme jeweils kurz diskutiert werden.

Die Herkünfte **'Rur 1'** und **'Rur 2'** gehören als einzige im Datensatz der FGE Maas an. Hinsichtlich ihrer mitochondrialen CR-Sequenzen bzw. RFLP-Haplotypen zeigen die dort beprobten Individuen eine Zugehörigkeit zur zentraleuropäischen Linie (Weiss *et al.*, 2002) bzw. eine Zugehörigkeit zur westlichen mitochondrialen Hauptlinie IIa (Gum *et al.*, 2005). Interessant ist hierbei, dass zwei Composite Haplotypen (Thy34, Thy35, siehe Abbildung 5) ausschließlich von Individuen der beiden Herkünfte der Rur gebildet werden, während auf Basis der mitochondrialen Kontrollregion keine solche Abgrenzung sichtbar wird. Würde man diese beiden sehr nahe benachbarten Herkünfte zusammen betrachten, könnte man dementsprechend von 2 privaten Composite-Haplotypen sprechen, denen alle haplotypisierten Individuen der FGE Maas angehören. Entsprechend wichtig ist nicht nur der Anteil dieser Herkünfte an der Gesamtvariation der Äsche, sondern auch deren Schutzwürdigkeit unter dem Aspekt einer nachhaltigen Bewirtschaftung zur Erhaltung des evolutionären Potentials der Äschen in Deutschland. Ebenfalls von Bedeutung ist dabei der Umstand, dass es in diesen Bereichen nach Aussagen von H.-J. Jochims (IG Untere Rur e.V.) in der Vergangenheit keine Besatzmaßnahmen mit Äschen gegeben hat.

Die Befischungsstrecke der **Ahr** (ca. 1500 m) gehört zum Fischgewässertyp (FiGT) 02 „unterer Forellentyp Mittelgebirge“. Die dort beprobte Äschenpopulation ist durch ein nicht-durchgängiges Querbauwerk vom unteren Bereich der Ahr getrennt und besteht aufgrund der wenigen geeigneten Habitate vermutlich aus sehr wenigen Individuen. Ein Aufsteigen von Äschen aus weiter abwärts gelegenen Abschnitten, in denen Besatzmaßnahmen durchgeführt werden, kann nach Aussagen der Pächter weitestgehend ausgeschlossen werden. Gleichzeitig gibt es keine Hinweise darauf, dass in diesem isolierten Oberlauf in der Vergangenheit Besatzmaßnahmen mit Äschen durchgeführt worden sind. Die Ergebnisse der genetischen Analysen spiegeln diese Verhältnisse wieder. So konnten extrem geringe Werte für Heterozygotie und Allelreichtum ermittelt werden, was auf geringe Populationsgrößen, zurückliegende Flaschenhals- und/oder Gründereffekte zurückzuführen ist. Solche konnten allerdings mit den verwendeten Teststatistiken nicht detektiert werden. Die sehr geringe genetische Diversität in dieser Population erhöht das Aussterbepotenzial aufgrund stochastischer demographischer, ökologischer und genetischer Ereignisse. Zusätzlich ist von einer besonderen Gefährdung im Hinblick auf eine Überprägung durch Besatzmaßnahmen auszugehen, da hier eine geringe Diversität, eine hohe Differenzierung (vgl. Appendix 1) und das Vorkommen eines privater Haplotypen/Allele kombiniert auftritt.

Die Herkünfte **„Alme“** und **„Lippe“** stellen im Rahmen der Untersuchung die einzigen Herkünfte aus dem Einzugsgebiet der Lippe dar. Die befischten Bereiche liegen dabei sehr nah beieinander, sodass ein Austausch zwischen Individuen trotz existierender Querbauwerke nicht ausgeschlossen ist. Passend dazu bilden diese Herkünfte den einzigen Fall im gesamten Datensatz, in dem keine signifikante Differenzierung (F_{ST} -Wert) auf Basis der Mikrosatelliten festgestellt werden konnte. Trotz eines Defizits an adulten Tieren kann der Äschenbestand der Lippe im untersuchten Bereich als gut hinsichtlich des Anteils der Äsche an der Gesamtfischfauna bezeichnet werden (LANUV, 2017). Da die Alme nicht Teil des Äschenhilfsprogramms war, liegt eine solche Einschätzung nicht vor, die Längenverteilung der vermessenen Individuen zeigt aber zumindest das Auftreten mehrerer Jahrgänge inkl. 0+ Individuen. Auch in den Herkünften **„Alme“** und **„Lippe“** konnte im Rahmen der Analysen eine geringe genetische Diversität festgestellt werden. Kühn (2011) ermittelte ähnlich niedrige Werte für Heterozygotie und Allelreichtum in nah benachbarten Abschnitten der Afte, Alme und des Boker Kanals. Die zugrunde liegenden Flaschenhals- oder Gründereffekte in diesem Gewässersystem liegen also wahrscheinlich schon länger

zurück, konnten aber mit der verwendeten Teststatistik nicht nachgewiesen werden. Der Zuchtstamm **„ZS 1“** zeigt ebenfalls ein hohes Maß an Ähnlichkeit zu beiden Herkünften des Lippe-Einzugsgebiets. Besonders deutlich wird dies durch die hohe Übereinstimmung der Individuen bezüglich ihrer Zugehörigkeit zu den in der Structure-Analyse dargestellten K=8 Genotypclustern. Der Zuchtstamm **„ZS 1“** wurde 2013 mit Wildfischen aus der Alme aufgebaut und seither regelmäßig mit Wildfischen „aufgefrischt“ (pers. Mitt. Carsten Nolting, Fischereiverband Westfalen und Lippe e.V.). Seit 2016 fanden regelmäßig Besatzmaßnahmen mit Nachkommen aus diesem Zuchtstamm statt, sodass zumindest für die Wildpopulation **„Alme“** nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein Teil der juvenilen bzw. subadulten Äschen auf diese Besatzmaßnahmen zurückgeht.

Ähnliches gilt für die Herkunft **„Emmer“** und den Zuchtstamm **„ZS 2“**. Auch hier wurden im Vorfeld der Befischung der Wildpopulation mindestens einmal Besatzmaßnahmen mit juvenilen Äschen aus dem Zuchtstamm **„ZS 2“** durchgeführt, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass v.a. einige in der Emmer beprobte Individuen der 0+-Gruppe aus **„ZS 2“** stammen. So zeigten die dortigen 0+-Individuen in Bezug auf die gemessenen Totallängen eine relative große Spannweite von 110mm - 220mm, was ein Hinweis auf das gleichzeitige Vorhandensein von natürlichem Aufkommen und Besatz sein kann. Besonders die Zugehörigkeit der Individuen zwischen 190mm - 220mm zur 0+ oder 1+ Gruppe ist nicht klar aufzulösen. Hinsichtlich der nukleären Diversität zeigen beide Herkünfte relativ hohe Werte, wobei gleichzeitig in mehreren Analysen auf Basis der Mikrosatelliten eine relativ hohes Maß an genetischer Ähnlichkeit zueinander festgestellt werden konnte (Structure-Analyse Abbildung 13, Hauptkoordinatenanalysen Abbildung 11 & Abbildung 12, paarweise F_{ST} -Werte Appendix 1). Dies unterstützt die Aussagen der für den Zuchtstamm **„ZS 2“** verantwortlichen Hegegemeinschaft, dass dieser ca. 2012 mit Äschen aus der Emmer aufgebaut wurde (pers. Mitt. Carsten Nolting, Landesfischereiverband Westfalen und Lippe e.V.). Im Widerspruch zum relativ hohen Maß an genetischer Ähnlichkeit hinsichtlich der nukleären Marker, zeigen die mitochondrialen Marker übereinstimmend eine jeweils überwiegende Zuordnung zu divergenten genetischen Linien. Während die haplotypisierten Wildfische aus der Emmer überwiegend der zentraleuropäischen Clade (CR) bzw. Hauptlinie IIb (ND1 & ND5/6) zugeordnet werden konnten, gehören die haplotypisierten Individuen aus **„ZS 2“** abweichend davon überwiegend zur skandinavischen Clade (CR) bzw. Hauptlinie I (ND1 & ND5/6). Ein Individuum der Herkunft **„Emmer“** zeigt ebenfalls einen dieser

skandinavischen (Composite-)Haplotypen und geht daher wahrscheinlich auf Besatzmaßnahmen mit Äschen aus ‚ZS 2‘ zurück.

Eine natürlicherweise auftretende Dominanz dieser (Composite-)Haplotypen im Wesersystem ist als sehr unwahrscheinlich einzuschätzen und sollte sich eher mit einer Verwendung von gebietsfremdem Äschen zum Aufbau des Zuchtstamms erklären lassen. Bezeichnenderweise fand auch Kühn (2011) eine Dominanz von Composite-Haplotypen der Linie I in einem Zuchtstamm aus dem Wesereinzugsgebiet vor; leider ohne Angabe der Bezeichnung dieser Haplotypen nach Gum *et al.* (2005). Diese war allerdings nicht Teil der hier vorliegenden Untersuchung und Informationen zur weiteren Bewirtschaftung/Verwendung im Nachgang der Studie von Kühn (2011) sind nicht vorhanden. Die bei den Individuen des Zuchtstamms ‚ZS 2‘ gefundenen skandinavischen CR-Haplotypen ‚At2‘ und ‚At6‘ (erstmalig beschrieben bei finnischen Populationen von Weiss *et al.*, 2002) wurden von Weiss *et al.* (2015) auch in Zuchtstämmen in Tirol gefunden. Es ist daher davon auszugehen, dass diese Haplotypen europaweit durch kommerzielle Händler verbreitet werden. Von einer weiteren Verwendung des Zuchtstamms ‚ZS 2‘ für weitere Besatzmaßnahmen in der Emmer sollte daher unbedingt Abstand genommen werden.

Die genotypische Ähnlichkeit gegenüber den Individuen des Zuchtstamms ‚ZS 2‘ ist in der Wildpopulation ‚Emmer‘ über alle Altersklassen feststellbar. Inwieweit das hohe Maß an genetischer Ähnlichkeit hinsichtlich der nukleären Markern auf eine bereits länger erfolgte Einkreuzung von gebietsfremden Genotypen in die Wildpopulation der Emmer hinweist ist auf Basis der hier verfügbaren Informationen schwer zu beurteilen. Aufschluss darüber geben könnte ein Vergleich mit den Mikrosatelliten-Allelfrequenzen der Emmer Wildfische aus der Studie von Kühn (2011), die allerdings zum Zeitpunkt der Berichtslegung nicht zur Verfügung standen.

Ebenfalls Gegenstand der Untersuchung von Kühn (2011) war die Herkunft der ‚Bega‘. Hier konnte sowohl die damalige als auch die hier vorliegende Untersuchung eine Zuordnung aller haplotypisierten Individuen zur mitochondrialen Hauptlinie IIb nachweisen. Die Structure-Analyse (K=4) lässt hier in Hinblick auf die ca. 10-50% Durchmischung vieler Individuen mit dem vorwiegend in der FGE auftretenden Genotypclusters 3 jedoch auch auf einen gewissen Genfluss zwischen den FGEs Weser und Rhein schließen. Inwieweit dabei potenzielle Initialbesatzmaßnahmen nach dem Aussterben der Äsche im Begasystem um ca. 1950 (Hoffmann, 2010) eine Rolle spielten, kann aufgrund fehlender Informationen zu Besatzmaßnahmen in der

Vergangenheit und Gegenwart nicht geklärt werden. Die Abweichung von einer ‚L-shaped‘ Verteilung der Allelfrequenzen deutet jedoch auf die Existenz eines Flaschenhalseffekt hin (Tabelle 11).

Die Äschenbestände in den Herkünften **‚Hönne‘** und **‚Wupper 1‘** sind hinsichtlich des Anteils der Art an der Gesamtfischfauna als ‚gut‘ zu bezeichnen, weisen jedoch eine gestörte Längenhäufigkeitsverteilung in Form kaum auftretender subadulter und adulter Individuen auf (LANUV, 2017). Es wird daher von einer hohen Reproduktionsleistung auf der Basis relativ weniger Laicher ausgegangen. Passend dazu konnten wir in beiden Fällen eine geringe bzw. sehr geringe Haplotypendiversität nachweisen (Wupper 1: $H_d=0$ für beide Markersysteme). Im Gegensatz dazu zeigte die wenige Kilometer flussabwärts lokalisierten Herkunft **‚Wupper 2‘** eine hohe Eigenständigkeit in Form von privaten Haplotypen und einem privatem Allel gefunden werden. 2 private Allele konnten auch in der Herkunft ‚Hönne‘ nachgewiesen werden. Hinsichtlich der paarweisen nukleären Differenzierung weisen beide Wupper-Herkünfte einen relativ, geringen, aber trotzdem signifikanten Wert auf. Hierbei spielen möglicherweise mehrere Wasserkraftanlagen und weitere Querbauwerke eine Rolle, die beide Gewässerstrecken voneinander trennen. Zu Besatzmaßnahmen in den untersuchten Abschnitten der Wupper und der Hönne liegen keine Informationen vor, jedoch konnte eine relativ geringe Differenzierung und hohe Ähnlichkeit in der Zugehörigkeit zu hypothetischen Genotypclustern im Rahmen der Structure-Analyse sowie in der Hauptkoordinatenanalyse beobachtet werden (besonders zwischen ‚Wupper 2‘ und ‚Hönne‘). Dies könnten Hinweise für solche Besatzmaßnahmen zwischen den Wupperabschnitten und der ‚Hönne‘, da ein Genfluss über diese Distanzen (> 200km mit diversen Querbauwerken/Ruhrseen) zumindest unwahrscheinlich ist.

Unter den Gewässern im Rahmen des Pilotmonitorings des Äschenhilfsprojekts (LANUV, 2017) zählt die **Lenne** zur Äschenschutzkulisse zweiter Priorität (nur abschnittsweise gute Äschenbestände (LANUV, 2017). Dabei lassen die Befischungsergebnisse auf geringe Äschenbestände und eine eingeschränkte Reproduktion im untersuchten Abschnitt schließen. Größtenteils gehören die haplotypisierten Individuen dieser Herkunft dem am häufigsten detektierten Haplotypen Thy39 in Linie IIa an. Ein Individuum konnte abweichend davon der Linie IIb zugeordnet werden. Bedenkt man den Ursprung des Gewässers an der Wasserscheide der FGEs Rhein und Weser ist eine Durchmischung mit der dominierenden Linie der benachbarten Einzugsgebiete nichts Ungewöhnliches (Gum

et al., 2003, 2009). Informationen zu Besatzmaßnahmen in der untersuchten Strecke liegen nicht vor. In einer etwas stromab gelegenen Gewässerstrecke bei Plettenberg wurden in den 1970er Jahren Initialbesatzmaßnahmen mit Äschen unbekannter Herkunft durchgeführt, die mutmaßlich für den daraufhin beobachteten Bestandsanstieg ausschlaggebend waren (Völker *et al.*, 2010).

Im Rahmen der Äschenhilfsprojekts wurde die **Diemel** als Gewässer 1. Priorität mit „rückläufigen Äschenbeständen“ untersucht. Insgesamt wurden auch hier geringe Bestände festgestellt, u.a. durch die geringe Habitatsignung bzw. starke anthropogene Veränderung der Gewässerstruktur. Im Nachgang der Probenahmen für die Genetik konnte 2016 ein starkes Aufkommen an juvenilen Äschen in einigen strukturell geeigneten Abschnitten festgestellt werden (LANUV, 2017). Während der Großteil der haplotypisierten Individuen der Linie IIb zugehörig war, konnten 2 Individuen hinsichtlich ihres Composite-Haplotypen der Linie III (Donau) zugeordnet werden. Dabei konnten auch andere Studien ein vereinzelt, weiträumiges Auftreten der Linie III in Populationen der FGEs Weser, Rhein und Elbe beobachten (Gum *et al.*, 2005; Kühn, 2011), sodass dies nicht zwangsläufig ein Indiz für Besatzmaßnahmen mit gebietsfremdem Besatz sein muss.

Die Zuchtstämme **,ZS 3'** und **,ZS 4'** zeigen sowohl hinsichtlich der mitochondrialen als auch der nukleären Marker eine sehr hohe Diversität. Zusätzlich wurden für **,ZS 4'** auch ein privater Haplotyp und 3 private Allele festgestellt. Der Zuchtstamm **,ZS 3'** hat seinen Ursprung im Main-Einzugsgebiet nahe der Wasserscheide zum Wesereinzugsgebiet. Dementsprechend zeigen die haplotypisierten Individuen hinsichtlich der mitochondrialen ND1- & ND5/6-Region Composite-Haplotypen der Linien IIa und IIb. Diese Vermischung wird auch durch die Hauptkoordinatenanalysen verdeutlicht, bei denen die Population bzw. die Individuen aus **,ZS 3'** zwischen dem Weser- und dem Rhein/Maas-Cluster liegen. Für Besatzmaßnahmen in den im Rahmen dieser Studie untersuchten Gewässern kann **,ZS 3'** daher eher nicht empfohlen werden, da keine der Wildpopulationen eine derartig gemischte Zugehörigkeit zu den mitochondrialen Hauptlinien IIa und IIb aufzeigte. Der Zuchtstamm **,ZS 4'** wurde nach Angaben des Aquakulturbetriebs mit Äschen aus der Diemel gegründet und war ebenfalls bereits Gegenstand der Untersuchung von Kühn (2011). Damals konnten ein Großteil der Individuen der mitochondrialen Hauptlinie IIb und eine Minderheit der Hauptlinie III zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu wurden in der hier vorliegenden Untersuchung nur noch 3 von 10 Individuen Linie IIb zugeordnet während alle anderen zu 2 Composite-Haplotypen der Linie I

(Nordosteuropa) zugehörig waren. Ähnlich wie im Fall von ‚ZS 2‘, muss daher von Verwendung des Zuchtstamms ‚ZS 4‘ für Besatzmaßnahmen im untersuchten Gebiet abgeraten werden.

Im Gegensatz zur hohen genetischen Diversität in den Zuchtstämmen ‚ZS 2‘, ‚ZS 3‘ und ‚ZS 4‘ zeigt der Zuchtstamm **‚ZS 5‘** ein hohes Maß an genetischer Verarmung. Der Zuchtstamm geht nach Aussagen des Aquakulturbetriebs auf Äschen aus dem Mosel-Einzugsgebiet zurück. Aufgrund der geringen genetischen Diversität und hohen Differenzierung auf Basis paarweiser F_{ST} -Werte gegenüber allen im Rahmen dieser Studie untersuchten Wildpopulationen kann dieser Zuchtstamm ebenfalls nicht für Besatzmaßnahmen in den untersuchten Herkünften empfohlen werden.

6.2 Ableitung von Managementmaßnahmen

Ausgehend von den Erkenntnissen zur Populationsgenetik und Phylogeographie der Äsche, sowie zu den Folgen von Besatzmaterial mit allochthonen Genotypen wurden von verschiedenen Autoren Managementempfehlungen abgeleitet. Gum *et al.* (2005, 2009) definieren für das Gebiet von Deutschland die Flussgebietseinheiten als evolutionarily significant units (ESUs), die sich jeweils noch in teilweise mehrere management units (MUs) unterteilen lassen (z.B. Populationen der Main-Zuflüsse vs. Hochrheinpopulationen innerhalb der FGE Rhein). V.a. für die Vermischungszonen zwischen Flussgebietseinheiten (z.B. im Fichtelgebirge) empfehlen die Autoren eine Fluss-spezifische Bewirtschaftung zur Erhaltung lokaler Formen (Gum *et al.*, 2009). Die Übertragbarkeit solcher Einstufungen bzw. Empfehlungen für die Äsche über die Grenzen des untersuchten Gebiets hinaus, ist jedoch anzuzweifeln. So empfehlen Weiss, Kopun & Sušnik Bajec (2013) für Österreich eine Fluss-spezifische Bewirtschaftung (jede Population als eigene Bewirtschaftungseinheit) und zweifeln die grundsätzliche naturschutzfachliche Eignung des ESU-/MU-Konzepts für die Äsche an. Für die Äschenpopulationen im Vereinigten Königreich empfehlen Dawnay *et al.* (2011) getrennte Bewirtschaftung jeder einzelnen Population.

Gemäß der „Guten fachlichen Praxis fischereilicher Besatzmaßnahmen“ (Baer *et al.*, 2007) und des dort verwendeten Konzepts der ‚Genetischen Managementeinheiten‘ (GME), ist die Äsche als „Evolutionäre Großraumgruppe“ einzustufen. Arten der „Evolutionäre Großraumgruppe“ sind dabei grundsätzlich getrennt nach Flussgebietseinheiten (FGEs) zu bewirtschaften und sollten auch nur in begründeten Ausnahmefällen über Einzugsgebietsgrenzen innerhalb der FGEs besetzt werden. Für die Äsche wird jedoch gegenüber anderen Arten der „Evolutionären

Großraumgruppe“ eine kleinräumigere Bewirtschaftung empfohlen. Köbsch *et al.* (in Vorbereitung) kommen in einer bundesweiten Untersuchung aufgrund der hohen Differenzierung zwischen Populationen auch innerhalb der Einzugsgebiete zu dem Schluss, dass die Äsche im Gegensatz zur Einstufung von Baer *et al.* (2007) als „Evolutionäre Kleinraumgruppe“ zu bewirtschaften ist.

Auf der Basis dieser Einstufung sind Habitat-verbessernde Maßnahmen und die Wiederherstellung der Durchgängigkeit in Kombination mit intensiven Vergrämungsmaßnahmen gegen den Kormoran (oder andere Prädatoren) prinzipiell gegenüber Besatzmaßnahmen vorzuziehen. Das Beispiel der Isar im Bereich Garching zeigt das Potenzial solcher Vergrämungsmaßnahmen zur Wiederherstellung individuenstarker, selbstreproduzierender Bestände, sofern gute Äschenhabitate vorhanden sind. Dort konnte im Vergleich von zwei strukturell vergleichbaren Gewässerabschnitten gezeigt werden, dass eine dauerhafte und intensive Vergrämung des Kormorans in der einen Strecke einen starken Anstieg der Äschenabundanz zu Folge hatte. Diese Erholung blieb in der nicht bejagten Kontrollstrecke aus, in der die Abundanz der Äsche auf extrem niedrigem Niveau verblieb (pers. Mitteilung T. Ruff, Fischereifachberatung Oberbayern). Auch im Rahmen des Äschenhilfsprogramms konnten in vielen Gewässern NRW Hinweise auf ein hohes reproduktives Potenzial der dortigen Äschenpopulationen gefunden werden. Dadurch sind die Erfolgsaussichten auf eine langfristige Erholung und Sicherung der Bestände ohne Besatzmaßnahmen wesentlich erhöht.

Prinzipiell ist davon auszugehen, dass die Individuen der Wildpopulationen sich an die spezifischen Bedingungen ihrer Gewässer in verschiedener Weise angepasst haben (sog. ‚Lokaladaptation‘ u.a. in Bezug auf chemisch-physikalische Bedingungen, Hydrologie, Prädatoren, klimatische Bedingungen). Auch für die Äsche wurden solche Anpassungen bereits bestätigt (Heinrich, 2000 [zitiert in Kühn & Gum, 2007]; Haugen & Vollestad, 2000; Thomassen *et al.*, 2011). Die in dieser Studie vorgenommene Abschätzung der Verwandtschaftsverhältnisse auf Basis neutraler Marker dient dabei als Proxy für solche genetisch fixierten lokalen Anpassungen, da durch die verwendeten Mikrosatelliten-Marker keine selektiven Prozesse abgebildet werden.

Sollten Besatzprogramme nötig sein, sind diese grundsätzlich mit Nachkommen möglichst vieler Elternindividuen aus dem jeweiligen Flusssystem selbst durchzuführen. In begründeten Ausnahmefällen und unter Berücksichtigung von

Haplotyp-/Genotypinformationen der Elterntiere sind auch Besatzmaßnahmen aus benachbarten Flüssen desselben Einzugsgebiets möglich.

Generell sollten selbst bei passender Herkunft und adäquatem genetischen Hintergrund der Elterntiere die Bewirtschaftung in Form einer geschlossenen Laichtierhaltung (Etablierung eines „domestizierten“ Zuchtstamms) unbedingt vermieden werden, da diese nur unzureichend an die Bedingungen in natürlichen Gewässern angepasst sind. Aber auch die Nutzung von Wildfischen als Elterntiere und die anschließende Aufzucht der juvenilen Tiere in der Zucht birgt diverse Nachteile, da die Anpassung an die Bedingungen der Zucht und die daraus resultierende geringere Fitness der Nachkommen über sehr kurze Zeiträume bzw. sogar innerhalb einer Generation wirksam werden (u.a. Araki, Cooper & Blouin, 2007; Christie *et al.*, 2012). Daher sollten nach Möglichkeit alternative Methoden angewendet werden. Einen dahingehend guten Überblick in deutscher Sprache bieten Holzer, Unfer & Hinterhofer (2004). Ein aufwändiges, aber vielversprechendes Verfahren stellt dabei das sogenannte ‚Cocooning‘ (Entwicklung der befruchteten Eier in speziellen Substratkörben in Kiesbänken des Zielgewässers) dar. Dabei gewährleistet man sowohl eine bestmögliche Anpassung an die chemisch-physikalischen Gegebenheiten des entsprechenden Zielgewässers als auch die Prägung des Homing-Verhalten der Äsche (Holzer, Unfer & Hinterhofer, 2006). Die natürliche Polygynandrie der Äsche (Haddeland *et al.*, 2015) sollte in künstlichen Verpaarungsverfahren z.B. in Form sogenannte ‚split-batch‘-Verfahren berücksichtigt werden, um eine möglichst hohe effektive Populationsgröße zu erhalten. Dabei werden die Eier jedes Weibchens in mehrere Portionen aufgeteilt und mit dem Sperma jeweils verschiedener Männchen befruchtet (Weiss *et al.*, 2015).

Für einen Besatz in ‚Alme‘ und ‚Lippe‘ ist der Zuchtstamm ‚ZS 1‘ aus genetischer Sicht grundsätzlich geeignet. Die geringe genetische Diversität in ‚ZS 1‘ (es wurden hier ausschließlich 0+-Fische beprobt) zeigt, dass hier Veränderungen in der praktischen Bewirtschaftung nötig sind. Neben einem ausreichend hohen Laichfischbestand (Weiss *et al.*, 2015 empfehlen 100-200 Tiere), ist z.B. besagtes ‚split-batch‘-Verfahren zur Erhaltung bzw. Entwicklung der genetischen Vielfalt innerhalb des Zuchtstamms geeignet.

Damit in den o.g. Ausnahmefällen Fluss-übergreifende Besatzmaßnahmen mit dem adäquaten genetischen Hintergrund durchgeführt werden können ist es notwendig, die genetische Struktur der jeweiligen Population zu kennen. Entsprechend liefern die

Ergebnisse der vorliegenden Studie die Grundlage für eine Suche nach geeigneten Nachbarpopulationen. Darüber hinaus zeigen die Daten dieser Studie auf, welche Populationen bereits eine verringerte genetische Diversität besitzen und deshalb besonders anfällig für ein Aussterben bzw. eine mögliche Überprägung wären. Die in dieser Studie identifizierten Populationen mit hoher Eigenständigkeit in Kombination mit einer starken genetischen Verarmung (v.a. ‚Ahr‘) sollten hinsichtlich der Bestandsentwicklung und der genetischen Diversität einem regelmäßigen Monitoring (ca. alle 3 Jahre) unterzogen werden.

Aus ökologischer, wissenschaftlicher und wirtschaftlicher Sicht wäre die dauerhafte Erhaltung der genetischen Diversität der Äschenbestände wünschenswert. Dafür sind auch regionale Analysen der genetischen Variabilität und Bewertung der Populationen unumgänglich. Dieses Ziel konnte mit den vorliegenden Daten erreicht und zudem Empfehlungen für das Bestandsmanagement der Äsche formuliert werden.

7 ZUSAMMENFASSUNG

7.1 Deutsche Kurzfassung

Aufgrund stark zurückgehender Bestände der Äsche in ganz Deutschland und den damit einhergehenden Forderungen nach Kompensation dieser Verluste durch Besatzmaßnahmen sind Informationen zur genetischen Diversität dringend erforderlich, um zukünftig geeignete Schutz- und Bewirtschaftungsmaßnahmen konzipieren zu können. Entsprechend wurde in dem vorliegenden Projekt die genetische Variabilität von Wildpopulationen und Zuchtstämmen der Äsche (*Thymallus thymallus*) in Nordrhein-Westfalen (NRW) erfasst. Insgesamt konnten in den Jahren 2016-2018 zwölf Wildpopulationen aus den drei Flussgebietseinheiten (FGEs) Maas, Rhein und Weser sowie fünf Zuchtstämme mit einer potenziellen Bedeutung als Besatzquelle analysiert werden. Zudem konnte ein nichtinvasives Verfahren mittels forensischer Abstriche zur DNA-Gewinnung für die Äsche etabliert werden. Die genetische Analyse der Populationen erfolgte über Sequenz- und RFLP-Analyse mitochondrialer DNA sowie Mikrosatellitenmarker. Von insgesamt 535 Proben konnten für 506 Individuen aus 17 Herkünften die genetischen Daten erfasst werden. Die Analyse der mitochondrialen DNA ergab, dass der Großteil der beobachteten Varianz (63-76% in Abhängigkeit vom Markersystem) durch die genetische Variation zwischen Flussgebietseinheiten erklärt wird. Die Resultate der Mikrosatelliten-Analysen zeigten eine vergleichsweise geringe Diversität der Populationen bei gleichzeitig hoher genetischer Differenzierung. Die geschätzte genetische Differenzierung zwischen den untersuchten Populationen erklärt etwa 39% der beobachteten genetischen Varianz, während die meiste Variation (ca. 61%) durch Unterschiede zwischen Individuen innerhalb der Populationen erklärt wird. Trotzdem können die Populationen zwischen den untersuchten Flussgebieten mit Hilfe der genutzten mitochondrialen und nukleären Marker gut voneinander abgegrenzt werden. Auch innerhalb derselben Flussgebietseinheiten und selbst zwischen nah benachbarten Populationen konnte eine signifikante genetische Differenzierung auf der Basis paarweiser F_{ST} -Werte beobachtet werden. Aus diesem Grund empfiehlt sich eine kleinräumige Bewirtschaftung auf Fließgewässerebene. Besatzprogramme sollten mit möglichst vielen Individuen aus dem zu stützenden Bestand selbst aufgelegt werden und nur in begründeten Ausnahmefällen und nach Prüfung der genetischen Struktur der Populationen auf benachbarte Gewässer desselben Einzugsgebiets zurückgreifen.

Nur einer der untersuchten Zuchtstämme eignet sich hinsichtlich seiner genetischen Struktur für Besatzmaßnahmen in untersuchten Wildpopulationen.

7.2 Abstract

Genetic variability of the European grayling (*Thymallus thymallus*) in North Rhine-Westphalia, Germany: Implications for management and conservation strategies.

Christoph Köbsch, Sascha Krenek, Thomas Schiller and Thomas U. Berendonk

Information on the genetic diversity for the European grayling (*Thymallus thymallus*) is essential for the future genetic management and stocking strategy of the grayling and for the protection of its genetic diversity. Accordingly, this project endeavoured to close this gap of knowledge and has analysed several populations from different river catchments in North Rhine-Westphalia (NRW), Germany.

Throughout the years 2016-2018, a total of 12 origins from three river catchments were analysed: Meuse (n=2), Rhine (n=7) and Weser (n=3). Additionally, individuals from 5 hatchery stocks were included in the analysis to assess their suitability as sources for stocking measures to support the wild populations. Furthermore, it was possible to develop a non-invasive approach to analyse forensically sampled DNA of grayling individuals. The genetic diversity of this species in NRW river catchments was assessed using mitochondrial and nuclear microsatellite markers. In total 535 Individuals were sampled and 506 individuals from 17 origins were successfully genotyped by the use of 12 microsatellite loci. In addition, the mitochondrial control region (CR), NADH Dehydrogenase subunits 1 (ND1) and 5/6 (ND5/6) were analysed for 189 individuals from 17 origins using sequence and RFLP-analysis for phylogeographic and population genetic inference.

The analysis of the mtDNA has shown that the main part of the observed genetic variance (approx. 63-76%, respectively) was explained by the genetic variation between river basin districts. For the analysed wild populations, the results of the microsatellite analysis revealed heterozygosity rates between 0.24 and 0.43. Heterozygosity rates in hatchery stocks ranged from 0.15 to 0.55. These comparatively low values could be indicative for low effective population sizes and could reflect the phylogeography as well as life history traits of European grayling

such as its strong homing and weak dispersal behaviour, the formation of family cohorts and its spawning behaviour.

The genetic differentiation based on F_{ST} -values between the investigated populations shows significant differentiations between the populations according to all hierarchical levels tested by AMOVA and pairwise comparisons. Most of the observed genetic variation was explained by differences between individuals within populations (61.41%). Only one hatchery stock proved to be suitable for stocking measures in some of the analysed wild populations.

In summary, the analysed grayling populations show a comparatively low level of genetic variability with high levels of differentiation. If necessary, stocking management should therefore endeavour to use several individuals from the local population as parental generation for supportive breeding.

Acknowledgements: The study was financed by the Government District Düsseldorf, North Rhine-Westphalia, Germany.

8 GEGENÜBERSTELLUNG DER GEPLANTEN ZU DEN TATSÄCHLICH ERREICHTEN ZIELEN

In der vorliegenden Studie sollten mindestens 10 Herkünfte der Äsche aus mindestens 10 relevanten Haupteinzugsgebieten erfasst werden. Es konnte in insgesamt **12 Wildpopulationen** aus den **drei Flussgebietseinheiten (FGEs) Maas, Rhein und Weser** und **5 Zuchtstämmen** genetisches Material von Äschen für molekulargenetische Analysen gewonnen werden. Die Zielgröße von mindestens 30 Individuen pro Herkunft konnte nicht für alle Herkünfte erreicht werden. In **12 Herkünften wurden ≥ 30** und in **5 Herkünften 14-28** Individuen gefangen. Die in den Gewässern vorgefundenen Abundanzen der Äsche waren teilweise so gering, dass dem Auftragnehmer die angestrebten 30 Individuen pro Herkunft in einigen Fällen nicht übergeben werden konnten. Bis auf zwei Herkünfte wurden alle Individuen vermessen, ebenso wurde versucht, alle Individuen zu wiegen. Dies war jedoch nicht immer möglich.

Insgesamt spiegelt die Verteilung der erfassten Herkünfte (Abbildung 2) recht gut die Verbreitung der Äsche in Nordrhein-Westfalen wider und orientiert sich an der Äschenschutzkulisse (LANUV, 2017). Die Ergebnisse basieren damit auf einer Datenlage, welche die wesentlichen genetischen Großgruppen der Äsche beinhaltet. Doch auch kleinskalige genetische Variabilitäten sollten in dieser Studie exemplarisch untersucht werden, um z.B. den Effekt von Fließgewässerbarrieren (Wehre, Wasserkraftanlagen, usw.) auf die Durchwanderbarkeit für die Äsche und somit die Vernetzung von Teilpopulationen zu beurteilen. Zu diesem Zweck wurden aus einigen Gewässern (Lippe/Alme, Rur, Wupper) mehrere Herkünfte analysiert, die eine räumliche Trennung von 10-30 km Gewässerfließstrecke aufwiesen.

Von den insgesamt **539 Gewebs- und Abstrichproben** konnte aus **515 Proben** erfolgreich **DNA** gewonnen und für die weiteren genetischen Analysen verwendet werden. Damit wurde die Zielgröße von 450 genetisch zu analysierenden Individuen sogar überschritten. Von 515 Proben, die aus 17 verschiedenen Herkünften stammen, konnten Mikrosatelliten analysiert werden, wobei nach der ersten Analyse nur 312 Proben ein vollständiges Marker-Set aufwiesen. Anschließend wurden für die ausgefallenen Individuen entweder komplette Multiplex-Sets wiederholt analysiert oder in den vorwiegenden Einzel-Loci Ausfällen sog. Simplex-PCRs durchgeführt.

Dadurch konnte für insgesamt **506 Individuen aus 17 Populationen** ein vollständiges Markerset von 12 Loci erstellt werden.

Die Besatzsituation in den jeweiligen Herkünften ließ sich nicht durchweg aufklären. Soweit möglich wurden die Bewirtschafter und Fischereiverbände dazu befragt, doch bereits hier zeigte sich, dass zwar die aktuelle Besatzsituation dargestellt werden kann, jedoch die Informationen der vergangenen Jahre oder gar Jahrzehnte in vielen Fällen nicht genau bekannt sind. Oft sind die darin beteiligten Personen nicht mehr greifbar oder es existieren keine Aufzeichnungen über Besatzaktionen mehr. Außerdem ist die Aussagekraft einzelner Besatzaktionen für die in einigen Fällen sehr langen Flussabschnitte mit Äschen-Fischgewässertypen als kritisch zu betrachten, wenn man bedenkt, dass viele der Gewässer in wenige km lange fischereilich genutzte Abschnitte geteilt und verpachtet sind. Das hätte in den meisten Fällen die Befragung dutzender potentieller Besatz-Akteure im Einzugsgebiet einer Herkunft nötig gemacht, was im Rahmen dieser Studie nicht möglich war. Deshalb wurden Aussagen, die nachvollziehbar, glaubwürdig und repräsentativ für das jeweilige Gewässer waren, in die Herkunftsbeschreibung mit aufgenommen; wohingegen bei unklarer Datenlage die Besatzsituation als ‚unbekannt‘ eingestuft wurde.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Araki H., Cooper B. & Blouin M.S. (2007). Genetic Effects of Captive Breeding Cause a Rapid, Cumulative Fitness Decline in the Wild. *Science* **318**, 100–103. <https://doi.org/10.1126/science.1145621>
- Arlinghaus R., Cyrus E.-M., Eschbach E., Fujitani M., Hühn D., Johnston F., *et al.* (2015). Hand in Hand für eine nachhaltige Angelfischerei - Ergebnisse und Empfehlungen aus fünf Jahren praxisorientierter Forschung zu Fischbesatz und seinen Alternativen. *Berichte des IGB* **28**, 204
- Baer J., George V., Hanfland S., Lemcke R., Meyer L. & Zahn S. (2007). Gute fachliche Praxis fischereilicher Besatzmaßnahmen. *Schriftenreihe des Verbandes Deutscher Fischereiverwaltungsbeamter und Fischereiwissenschaftler e.V.* **14**, 1–151
- Berendonk T.U., Krenek S., Schiller T., Mogck U., Wehnert D. & Köbsch C. (2015). *Erfassung und Dokumentation der genetischen Variabilität von Wildpopulationen der Barbe (Barbus barbus) aus verschiedenen Flussgebietseinheiten in Deutschland. Abschlussbericht an die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung.* Institut für Hydrobiologie: TU Dresden, Dresden, Deutschland.
- Bernatchez L. & Wilson C.C. (1998). Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Molecular Ecology* **7**, 431–452. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00319.x>
- BfN (2013). Maßnahmenkonzepte zur Verbesserung des Erhaltungszustands von Natura 2000-Schutzgütern - Äsche (*Thymallus thymallus*)
- BfN (2009). *Rote Liste gefährdeter Tiere, Pflanzen und Pilze Deutschlands.* (Ed. Bundesamt für Naturschutz), Bundesamt für Naturschutz, Bonn-Bad Godesberg.
- Breacker C., Barber I., Norton W.H.J., McDearmid J.R. & Tilley C.A. (2017). A Low-Cost Method of Skin Swabbing for the Collection of DNA Samples from Small Laboratory Fish. *Zebrafish* **14**, 35–41. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1348>
- Campanella J.J. & Smalley J.V. (2006). A minimally invasive method of piscine tissue collection and an analysis of long-term field-storage conditions for samples. *BMC Genetics* **7**. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-7-32>
- Christie M.R., Marine M.L., French R.A. & Blouin M.S. (2012). Genetic adaptation to captivity can occur in a single generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 238–242. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111073109>
- Colussi S., Campia V., Righetti M., Scanzio T., Riina M.V., Burioli E.A.V., *et al.* (2017). Buccal swab: A tissue sampling method for refinement of experimental procedures involving rainbow trout. *Journal of Applied Ichthyology* **33**, 515–519. <https://doi.org/10.1111/jai.13324>
- Condrey M.J. & Bentzen P. (1998). Characterization of coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) microsatellites and their conservation in other salmonids. *Molecular Ecology* **7**, 787–789
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R. & Posada D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9**, 772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

- Dawnay N., Dawnay L., Hughes R.N., Cove R. & Taylor M.I. (2011). Substantial genetic structure among stocked and native populations of the European grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae) in the United Kingdom. *Conservation Genetics* **12**, 731–744. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0179-4>
- Duftner N., Koblmüller S., Weiss S., Medgyesy N. & Sturmbauer C. (2005). The impact of stocking on the genetic structure of European grayling *Thymallus thymallus*, Salmonidae) in two alpine rivers. *Hydrobiologia* **542**, 121–129. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-4951-7>
- Earl D.A. & vonHoldt B.M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**, 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier L. & Lischer H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**, 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Falush D., Stephens M. & Pritchard J.K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* **7**, 574–578. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>
- Falush D., Stephens M. & Pritchard J.K. (2003). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* **164**, 1567–1587
- Freyhof J. & Brooks E. (2011). *European red list of freshwater fishes*. Publications Office of the European Union ; IUCN, Luxembourg : [Gland, Switzerland].
- Goudet J. (2001). *FSTAT a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3.*
- Goudet J. & Jombart T. (2015). *hierfstat: Estimation and Tests of Hierarchical F-Statistics. R package version 0.04-22.*
- Gross R., Kuhn R., Baars M., Schroder W., Stein H. & Rottmann O. (2001). Genetic differentiation of European grayling populations across the Main, Danube and Elbe drainages in Bavaria. *Journal of Fish Biology* **58**, 264–280. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00513.x>
- Gum B., Gross R. & Geist J. (2009). Conservation genetics and management implications for European grayling, *Thymallus thymallus*: synthesis of phylogeography and population genetics. *Fisheries Management and Ecology* **16**, 37–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2400.2008.00641.x>
- Gum B., Gross R. & Kuehn R. (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**, 115–135. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01264.x>
- Gum B., Gross R. & Kuehn R. (2005). Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of European grayling (*Thymallus thymallus*): evidence for secondary contact

- zones in central Europe. *Molecular Ecology* **14**, 1707–1725. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02520.x>
- Gum B., Gross R., Rottmann O., Schröder W. & Kühn R. (2003). Microsatellite variation in Bavarian populations of European grayling (*Thymallus thymallus*): Implications for conservation. *Conservation Genetics* **4**, 659–672. <https://doi.org/10.1023/B:COGE.0000006106.64243.e6>
- Haddeland P.J., Junge C., Serbezov D. & Vøllestad L.A. (2015). Genetic Parentage Analysis Confirms a Polygynandrous Breeding System in the European Grayling (*Thymallus thymallus*). *PLOS ONE* **10**, e0122032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122032>
- Haugen T.O. & Vollestad L.A. (2000). Population differences in early life-history traits in grayling. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 897–905. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2000.00242.x>
- Heggenes J., Qvenild T., Stamford M.D. & Taylor E.B. (2006). Genetic structure in relation to movements in wild European grayling (*Thymallus thymallus*) in three Norwegian rivers. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **63**, 1309–1319. <https://doi.org/10.1139/f06-028>
- Heincke F. (1908). Bericht über die Untersuchungen der Biologischen Anstalt auf Helgoland zur Naturgeschichte der Nutzfische. *Die Beteiligung Deutschlands an der Internationalen Meeresforschung*, 67–155
- Heinrich R. (2000). *Untersuchungen zum Reproduktionserfolg der Äsche (Thymallus thymallus L.) und ihren Aufzuchtbedingungen im Rahmen des Artenhilfsprogramm Äsche*. LMU München, München.
- Hindar K., Ryman N. & Utter F. (1991). Genetic Effects of Cultured Fish on Natural Fish Populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **48**, 945–957. <https://doi.org/10.1139/f91-111>
- Hoffmann A. (2010). *Historisches Vorkommen von ausgewählten Fischarten in Nordrhein-Westfalen*. LFV Westfalen und Lippe e.V., Münster, Deutschland.
- Holzer G., Unfer G. & Hinterhofer M. (2004). Gedanken und Vorschläge zu einer Neuorientierung der fischereilichen Bewirtschaftung österreichischer Salmonidengewässer. *Österreichs Fischerei* **57**, 232–248. <https://doi.org/10.13140/rg.2.1.3640.2723>
- Holzer G., Unfer G. & Hinterhofer M. (2006). *Projekt Möll/Äschen-Cocooning im Revier Gradnitzer 2005 & 2006*. Wien.
- Hubisz M.J., Falush D., Stephens M. & Pritchard J.K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* **9**, 1322–1332. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x>
- Hübner D. (2003). *Die Abblanch- und Interstitialphase der Äsche (Thymallus thymallus L.) - Grundlagen und Auswirkungen anthropogener Belastungen*. Universitätsbibliothek Marburg.
- Jakobsson M. & Rosenberg N.A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**, 1801–1806. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>

- Jepsen N., Ravn H.D. & Pedersen S. (2018). Change of foraging behavior of cormorants and the effect on river fish. *Hydrobiologia* **820**, 189–199. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3656-2>
- Jombart T. (2008). *adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. R package version 2.1.1.*
- Junge C., Museth J., Hindar K., Kraabøl M. & Vøllestad L.A. (2014). Assessing the consequences of habitat fragmentation for two migratory salmonid fishes. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **24**, 297–311. <https://doi.org/10.1002/aqc.2391>
- Jungwirth M. (1996). Bypass channels at weirs as appropriate aids for fish migration in Rhithral rivers. *Regulated Rivers: Research & Management* **12**, 483–492
- Kamvar Z.N., Tabima J.F. & Grünwald N.J. (2014). *Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. R package version 2.7.1.*
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., et al. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- King T.L., Kalinowski S.T., Schill W.B., Spidle A.P. & Lubinski B.A. (2001). Population structure of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a range-wide perspective from microsatellite DNA variation. *Molecular Ecology* **10**, 807–821. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01231.x>
- Köbsch C., Krenek S., Schiller T. & Berendonk T.U. (in Vorbereitung). *Erfassung und Dokumentation der genetischen Vielfalt der Äsche (Thymallus thymallus) in Deutschland. Abschlussbericht erstellt im Auftrag der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung.* Institut für Hydrobiologie: TU Dresden.
- Kohlmann K. (2003). Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Aquatic Living Resources* **16**, 421–431. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(03\)00082-2](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(03)00082-2)
- Kolbinger A. (2002). *Fischbiologische Kartierung der Durchgängigkeit niederbayerischer Fließgewässer.* TU München.
- Koskinen M.T., Nilsson J., Veselov A.J., Potutkin A.G., Ranta E. & Primmer C.R. (2002). Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus thymallus*, Salmonidae. *Heredity* **88**, 391–401. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800072>
- Koskinen M.T., Ranta E., Piironen J., Veselov A., Titov S. & Haugen T.O. (2000). Genetic lineages and postglacial colonization of grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae) in Europe, as revealed by mitochondrial DNA analyses. *Molecular Ecology* **9**, 1609–1624
- Kottelat M. & Freyhof J. (2007). *Handbook of European freshwater fishes.* Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany.
- Kühn R. (2011). *Entwicklung von Erhaltungsstrategien für die Äsche im Auftrag der Bezirksregierung Detmold.* TU München.
- Kühn R. & Gum B. (2007). *Entwicklung von Erhaltungsstrategien für die Äsche im Auftrag des Landesfischereiverbanes Bayern e.V.* TU München.

- LANUV (2017). *Abschlussbericht des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen - Das Äschenhilfsprogramm in Nordrhein-Westfalen.*
- LANUV (2013). *Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen - Bericht für AK Kormoran.* Kirchhundem-Albaum.
- LANUV (2011). *Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen - Rote Liste der gefährdeten Pflanzen, Pilze und Tiere in Nordrhein-Westfalen.* Recklinghausen.
- Le Vin A.L., Adam A., Tedder A., Arnold K.E. & Mable B.K. (2011). Validation of swabs as a non-destructive and relatively non-invasive DNA sampling method in fish. *Molecular Ecology Resources* **11**, 107–109. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02909.x>
- Leigh J.W. & Bryant D. (2015). popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* **6**, 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Li H. & Durbin R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**, 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Marić S., Askeyev I.V., Askeyev O.V., Monakhov S.P., Bravničar J. & Snoj A. (2014). Phylogenetic and population genetic analysis of *Thymallus thymallus* (Actinopterygii, Salmonidae) from the middle Volga and upper Ural drainages. *Hydrobiologia* **740**, 167–176. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-1951-0>
- Marić S., Kalamujić B., Snoj A., Razpet A., Lukić-Bilela L., Pojskić N., *et al.* (2012). Genetic variation of European grayling (*Thymallus thymallus*) populations in the Western Balkans. *Hydrobiologia* **691**, 225–237. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1076-2>
- Marić S., Razpet A., Nikolić V. & Simonović P. (2011). Genetic differentiation of European grayling (*Thymallus thymallus*) populations in Serbia, based on mitochondrial and nuclear DNA analyses. *Genetics Selection Evolution* **43**, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-43-2>
- McKenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernytsky A., *et al.* (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research* **20**, 1297–1303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>
- Meldgaard T., Nielsen E.E. & Loeschcke V. (2003). Fragmentation by weirs in a riverine system: A study of genetic variation in time and space among populations of European grayling (*Thymallus thymallus*) in a Danish river system. *Conservation Genetics* **4**, 735–747. <https://doi.org/10.1023/B:COGE.0000006115.14106.de>
- Meraner A., Cornetti L. & Gandolfi A. (2014). Defining conservation units in a stocking-induced genetic melting pot: unraveling native and multiple exotic genetic imprints of recent and historical secondary contact in Adriatic grayling. *Ecology and Evolution* **4**, 1313–1327. <https://doi.org/10.1002/ece3.931>
- Meraner A. & Gandolfi A. (2012). Phylogeography of European grayling, *Thymallus thymallus* (Actinopterygii, Salmonidae), within the Northern Adriatic basin: evidence for native and exotic mitochondrial DNA lineages. *Hydrobiologia* **693**, 205–221. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1109-x>

- Meraner A., Unfer G. & Gandolfi A. (2013). Good news for conservation: mitochondrial and microsatellite DNA data detect limited genetic signatures of inter-basin fish transfer in *Thymallus thymallus* (Salmonidae) from the Upper Drava River. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 1–17. <https://doi.org/10.1051/kmae/2013046>
- Mueller M., Pander J. & Geist J. (2018). Comprehensive analysis of >30 years of data on stream fish population trends and conservation status in Bavaria, Germany. *Biological Conservation* **226**, 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.08.006>
- Nei M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**, 583–590
- Nei M. (1972). Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist* **106**, 283–292
- Nielsen E.E., Hansen M.M. & Mensberg K.-L.D. (1998). Improved primer sequences for the mitochondrial ND1, ND3/4 and ND5/6 segments in salmonid fishes: application to RFLP analysis of Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* **53**, 216–220. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb00122.x>
- Olsen J.B., Bentzen P. & Seeb J.E. (1998). Characterization of seven microsatellite loci derived from pink salmon. *Molecular Ecology* **7**, 1087–1089
- Ovidio M. & Philippart J.-C. (2002). The impact of small physical obstacles on upstream movements of six species of fish. *Hydrobiologia* **483**, 55–69. <https://doi.org/10.1023/A:1021398605520>
- Pagès H., Aboyoun P., Gentleman R. & DebRoy S. (2016). *Biostrings: String objects representing biological sequences, and matching algorithms. R package version 2.42.1.*
- Paradis E. & Schliep K. (2018). *ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. R package version 5.3.*
- Peery M.Z., Kirby R., Reid B.N., Stoelting R., Doucet-Bëer E., Robinson S., et al. (2012). Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines: RELIABILITY OF GENETIC BOTTLENECK TESTS. *Molecular Ecology* **21**, 3403–3418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05635.x>
- Persat H., Mattersdorfer K., Charlat S., Schenekar T. & Weiss S. (2016). Genetic integrity of European grayling (*Thymallus thymallus* L. 1758) within the Vienne River drainage basin after five decades of stockings. *Cybium* **40**, 7–20. <https://doi.org/10.3389/conf.FMARS.2015.03.00149>
- Piry S., Luikart G. & Cornuet J.M. (1999). BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of Heredity* **90**, 502–503. <https://doi.org/10.1093/jhered/90.4.502>
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959
- R Core Team (2018). *R: A language and environment for statistical computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Radinger J., Essl F., Hölker F., Horký P., Slavík O. & Wolter C. (2017). The future distribution of river fish: The complex interplay of climate and land use changes, species dispersal and movement barriers. *Global Change Biology* **23**, 4970–4986. <https://doi.org/10.1111/gcb.13760>

- Reid S.M., Kidd A. & Wilson C.C. (2012). Validation of buccal swabs for noninvasive DNA sampling of small-bodied imperiled fishes: Noninvasive buccal swabs for DNA sampling of small-bodied fishes. *Journal of Applied Ichthyology* **28**, 290–292. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01889.x>
- Roselius L., Shevchuk O., Steinert M., Jahn D. & Münch R. (2011). *Digestion: Digest genomes. R package version 1.0.*
- Rosenberg N.A. (2003). distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* **4**, 137–138. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x>
- Rümmler F., Schreckenbach K. & Pfeiffer M. (1998). Auswirkungen der Elektrofischerei auf Fische. *Fischer & Teichwirt*, 88–92
- Sánchez J.A., Clabby C., Ramos D., Blanco G., Flavin F., Vázquez E., et al. (1996). Protein and microsatellite single locus variability in *Salmo salar* L. (Atlantic salmon). *Heredity* **77**, 423–432. <https://doi.org/10.1038/hdy.1996.162>
- Schmidt T., Schrimpf A., Wetjen M. & Schulz R. (2015). *Erfassung und Dokumentation der genetischen Variabilität von Wildpopulationen der Bachforelle (Salmo trutta fario) aus verschiedenen Flussgebietseinheiten in Deutschland. Abschlussbericht an die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung.* Institut für Umweltwissenschaften: Universität Koblenz-Landau, Landau, Deutschland.
- Schröder W., Kohl F. & Hanfland S. (2007). Kormoran- und Fischbestand - Kritische Analyse und Forderungen des Landesfischereiverbandes Bayern e.V.
- Scribner K.T., Gust J.R. & Fields R.L. (1996). Isolation and characterization of novel salmon microsatellite loci: cross-species amplification and population genetic applications. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**, 9
- Slettan A., Olsaker I. & Lie Ø. (1995). Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL311, SSOSL417 loci. *Animal Genetics* **26**, 281–282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1995.tb03262.x>
- Smalley J.V. & Campanella J.J. (2005). Buccal swabbing and extraction of high quality sunfish (*Lepomis*) DNA for use in PCR analysis. *BioTechniques* **38**, 189–190. <https://doi.org/10.2144/05382BM03>
- Snoj A., Susnik S., Pohar J. & Dovc P. (1999). The first microsatellite marker (BFRO 004) for grayling, informative for its Adriatic population. *Animal Genetics* **30**, 74–75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.1999.00323-13.x>
- Sušnik S., Snoj A. & Dovč P. (1999). Microsatellites in grayling (*Thymallus thymallus*): comparison of two geographically remote populations from the Danubian and Adriatic river basin in Slovenia. *Molecular Ecology* **8**, 1756–1758. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00723-2.x>
- Sušnik S., Snoj A., Jesenšek D. & Dovč P. (2000). Rapid communication: microsatellite DNA markers (BFRO010 and BFRO011) for grayling. *Journal of Animal Science* **78**, 488. <https://doi.org/10.2527/2000.782488x>
- Swatdipong A., Primmer C.R. & Vasemägi A. (2010). Historical and recent genetic bottlenecks in European grayling, *Thymallus thymallus*. *Conservation Genetics* **11**, 279–292. <https://doi.org/10.1007/s10592-009-0031-x>
- Tamura K. & Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees.

- Molecular Biology and Evolution* **10**, 512–526.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Thomassen G., Barson N.J., Haugen T.O. & Vøllestad L.A. (2011). Contemporary divergence in early life history in grayling (*Thymallus thymallus*). *BMC Evolutionary Biology* **11**, 360. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-360>
- Völker J., Coring E., Eligehausen J. & Borchardt D. (2010). *Gewässerökologische Untersuchungen und Bewertung der pflanzlichen Komponenten (Diatomeen und Phytobenthos) in Bezug auf die defizitären Zustände der Fischfauna in der Lenne (NRW) - Abschlussbericht*. Bezirksregierung Arnsberg.
- Vonlanthen P. & Hefti D. (2016). Genetik und Fischerei - Zusammenfassung der genetischen Studien und Empfehlungen für die Bewirtschaftung. *Umwelt-Wissen* **1637**, 90
- Vonlanthen P. & Schlunke D. (2015). *Erfolgskontrolle Besatzmaßnahmen und populationsgenetische Untersuchung der Äschen im Kanton Aargau*. Departement Bau, Verkehr und Umwelt, Sektion Jagd und Fischerei, Kanton Aargau.
- Weiss S., Mattersdorfer K. & Börger C. (2015). *Genotypisierung, nachhaltige Sicherung und Bewirtschaftung regionaler Äschenbestände in anthropogen veränderten Gewässersystemen (AlpÄsch). Genetische Charakterisierung*. Karl-Franzens Universität Graz, Graz.
- Weiss S., Persat H., Eppe R., Schlötterer C. & Uiblein F. (2002). Complex patterns of colonization and refugia revealed for European grayling *Thymallus thymallus*, based on complete sequencing of the mitochondrial DNA control region. *Molecular Ecology* **11**, 1393–1407
- Weiss S.J., Kopun T. & Sušnik Bajec S. (2013). Assessing natural and disturbed population structure in European grayling *Thymallus thymallus*: melding phylogeographic, population genetic and jurisdictional perspectives for conservation planning. *Journal of Fish Biology* **82**, 505–521. <https://doi.org/10.1111/jfb.12007>
- Wetjen M., Schmidt T., Schrimpf A. & Schulz R. (2016). *Erfassung und Dokumentation der genetischen Variabilität von Wildpopulationen der Quappe (*Lota lota*) aus verschiedenen Flussgebietseinheiten in Deutschland. Abschlussbericht an die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung*. Institut für Umweltwissenschaften: Universität Koblenz-Landau, Landau, Deutschland.

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Herkunftsgewässer der Äsche, in denen Proben für die Analyse der genetischen Variabilität gewonnen wurden..	10
Tabelle 2: Verwendete Primer für die mitochondrialen Loci ND1, ND5/6 und Kontrollregion (CR) in <i>Thymallus thymallus</i> , T_m = Schmelztemperatur	27
Tabelle 3: Detailinformation zu den verwendeten Mikrosatellitenmarkersystemen...	30
Tabelle 4: Mikrosatelliten-PCR Bedingungen für die 3 verwendeten Multiplex-Sets...	31
Tabelle 5: Ergebnisse der genetischen Analysen der mitochondrialen DNA der analysierten 12 Wildpopulationen und 5 Zuchtstämme.....	41
Tabelle 6: Paarweise ϕ_{ST} -Werte basierend auf den Sequenzdaten der mitochondrialen Kontrollregion (CR, unterhalb der Diagonalen) und paarweise F_{ST} -Werte der mitochondrialen RFLP-Analyse der ND1- & ND5/6-Region (oberhalb der Diagonalen).....	45
Tabelle 7: Ergebnisse der hierarchischen AMOVA (Analysis of Molecular Variance) für die mitochondrialen RFLP-Daten (ND1 & ND5/6).	46
Tabelle 8: Ergebnisse der genetischen Analysen auf Basis der Mikrosatelliten der 12 analysierten Wildpopulationen und 5 analysierten Zuchtstämme.	50
Tabelle 9: Paarweise F_{ST} -Werte basierend auf den Mikrosatellitendaten zwischen den Flussgebietseinheiten.....	51
Tabelle 10: Ergebnisse der hierarchischen AMOVA (Analysis of Molecular Variance) für die Mikrosatelliten-Daten der Wildpopulationen..	51
Tabelle 11: Flaschenhalseffekt-Statistik der analysierten 12 Wildpopulationen und 5 Zuchtstämme auf Basis der Mikrosatelliten-Daten.	52

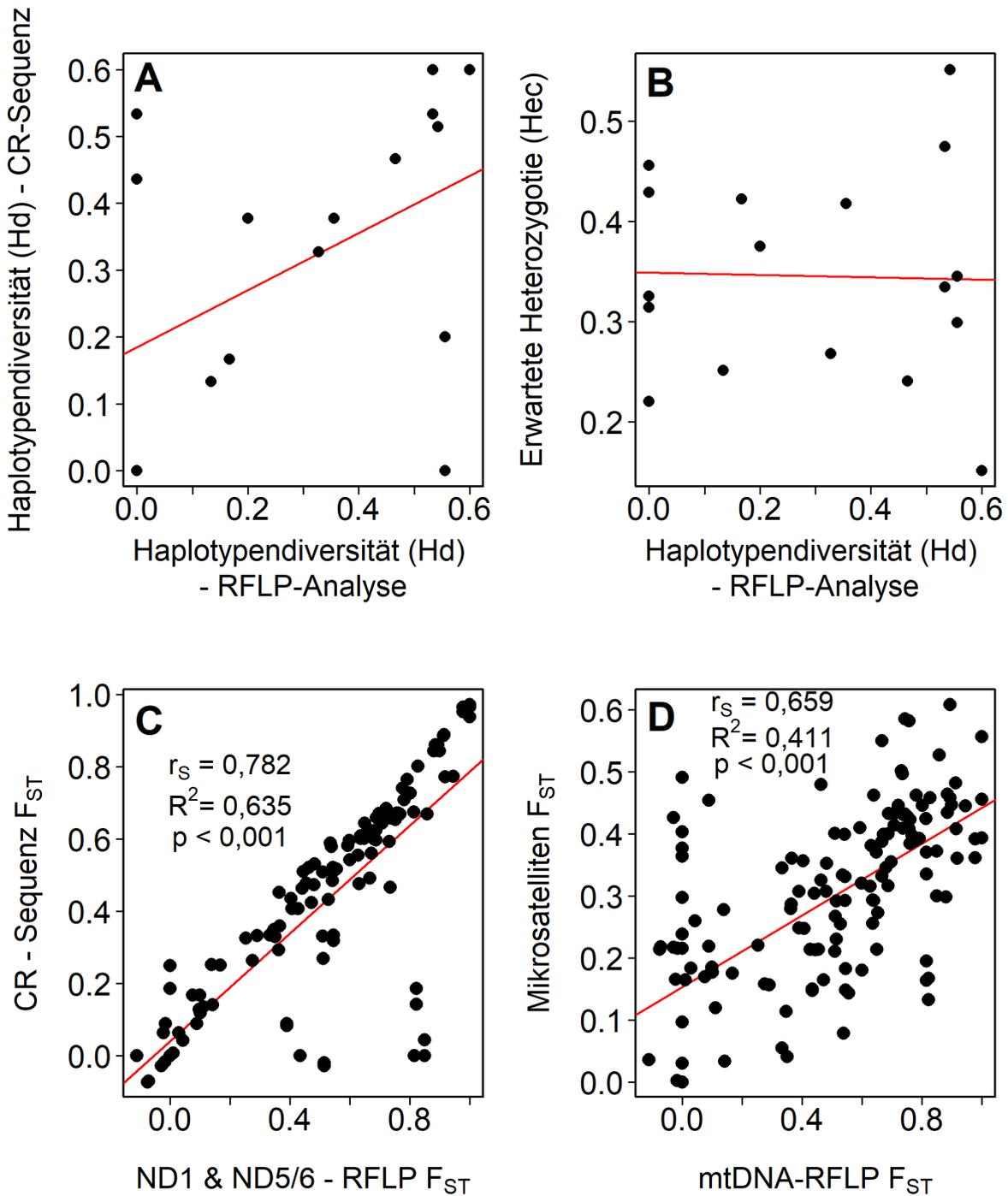
11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Arbeits- und Zeitplan aufgeschlüsselt nach Arbeitspaketen (AP 1-6) des Dienstleistungsangebots.....	8
Abbildung 2: Kartografische Darstellung der Herkunftsgewässer der Äschen, von welchen Material für die genetischen Analysen gewonnen wurde.....	9
Abbildung 3: Anzahl der Individuen nach Größenklassen.....	38
Abbildung 4: Anzahl von Individuen je Größenklasse aller vermessenen Äschen in Wildpopulationen.....	39
Abbildung 5: Median-Joining Haplotypen Netzwerk bestehend aus 13 Composite-Haplotypen der mitochondrialen ND1- & ND5/6-Region	42
Abbildung 6: Median-Joining Haplotypen Netzwerk bestehend aus 13 Haplotypen der mitochondrialen Kontrollregion (CR)	44
Abbildung 7: Mitochondriale Hauptlinien auf Basis der RFLP-Analyse der ND1- & ND5/6-Region in den untersuchten Wildpopulationen und Zuchtstämmen.....	45
Abbildung 8: Kartografische Darstellung der Haplotyp-Diversität und der Anzahl der Privaten Haplotypen für die hinsichtlich der mitochondrialen Kontrollregion (CR) untersuchten Herkünfte (Wildpopulationen und Zuchtstämme).....	48
Abbildung 9: Kartografische Darstellung der Haplotyp-Diversität und der Anzahl der Privaten Haplotypen für die hinsichtlich der mitochondrialen ND1- & ND5/6-Region untersuchten Herkünfte (Wildpopulationen und Zuchtstämme).....	48
Abbildung 10: Kartografische Darstellung des Heterozygotiegrades sowie die Anzahl Privater Allele der Herkünfte	51
Abbildung 11: Hauptkoordinaten-Analyse der 12 Wildpopulationen aus den Flussgebietseinheiten Maas (lila), Rhein (blau) und Weser (grün) und 5 Zuchtstämmen (orange) auf Basis ihrer Nei-Distanzen unter Verwendung des Mikrosatelliten-Datensatzes.....	53
Abbildung 12: Individuenbasierte Hauptkoordinaten-Analyse der 12 Wildpopulationen aus den Flussgebietseinheiten Maas (lila), Rhein (blau) und Weser (grün) und 5 Zuchtstämme (orange) auf Basis ihrer binären Distanzen.....	54
Abbildung 13: Graphische Darstellung der STRUCTURE-Analyse unter Annahme eines Admixture Models und unabhängiger Allelfrequenzen.....	58

APPENDIX

Appendix 1: Auflistung der paarweisen F_{ST} -Werte zwischen den untersuchten Herkünften der Äsche basierend auf Mikrosatelliten-Daten. Paarweise F_{ST} -Werte innerhalb von Flussgebietseinheit sind grau hinterlegt. Die minimalen F_{ST} -Werte sind rot markiert, die maximalen blau. Nicht-signifikante Werte sind fett dargestellt, wobei die einzige nicht-signifikante Differenzierung zwischen den Herkünften ‚Alme‘ und ‚Lippe‘ gefunden wurde.

POP	Rur 1	Rur 2	Ahr	Alme	Hönne	Lenne	Lippe	Wupper 1	Wupper 2	Bega	Diemel	Emmer	ZS 1	ZS 2	ZS 3	ZS 4	ZS 5
Rur 1		0,0360	0,3159	0,2301	0,1323	0,1476	0,2480	0,1634	0,1480	0,3616	0,3840	0,4345	0,3001	0,4085	0,2925	0,2553	0,3351
Rur 2	0,0360		0,4001	0,2915	0,1669	0,1497	0,3076	0,1952	0,1825	0,3918	0,4231	0,4638	0,3720	0,4313	0,3314	0,2930	0,3700
Ahr	0,3159	0,4001		0,3523	0,3462	0,3561	0,3605	0,3321	0,2667	0,4451	0,4964	0,5272	0,4458	0,5019	0,4004	0,3810	0,5495
Alme	0,2301	0,2915	0,3523		0,1654	0,2136	0,0019	0,2173	0,1752	0,4080	0,4141	0,4585	0,0303	0,4334	0,2869	0,3202	0,4261
Hönne	0,1323	0,1669	0,3462	0,1654		0,1649	0,1770	0,0969	0,0410	0,3930	0,3974	0,4470	0,2157	0,4276	0,3071	0,2729	0,3641
Lenne	0,1476	0,1497	0,3561	0,2136	0,1649		0,2177	0,2387	0,1853	0,2986	0,3152	0,3884	0,2596	0,3702	0,2206	0,2109	0,3766
Lippe	0,2480	0,3076	0,3605	0,0019	0,1770	0,2177		0,2185	0,1771	0,3922	0,3992	0,4330	0,0333	0,4098	0,2775	0,3039	0,4543
Wupper 1	0,1634	0,1952	0,3321	0,2173	0,0969	0,2387	0,2185		0,0547	0,3931	0,4084	0,4582	0,2977	0,4318	0,3255	0,2924	0,4030
Wupper 2	0,1480	0,1825	0,2667	0,1752	0,0410	0,1853	0,1771	0,0547		0,3603	0,3876	0,4244	0,2475	0,3989	0,2794	0,2545	0,3453
Bega	0,3616	0,3918	0,4451	0,4080	0,3930	0,2986	0,3922	0,3931	0,3603		0,1199	0,2153	0,4553	0,2138	0,1434	0,1798	0,5562
Diemel	0,3840	0,4231	0,4964	0,4141	0,3974	0,3152	0,3992	0,4084	0,3876	0,1199		0,1838	0,4461	0,2128	0,1582	0,1135	0,5819
Emmer	0,4345	0,4638	0,5272	0,4585	0,4470	0,3884	0,4330	0,4582	0,4244	0,2153	0,1838		0,4817	0,0783	0,2140	0,1648	0,6084
ZS 1	0,3001	0,3720	0,4458	0,0303	0,2157	0,2596	0,0333	0,2977	0,2475	0,4553	0,4461	0,4817		0,4625	0,3331	0,3546	0,4905
ZS 2	0,4085	0,4313	0,5019	0,4334	0,4276	0,3702	0,4098	0,4318	0,3989	0,2138	0,2128	0,0783	0,4625		0,2137	0,1695	0,5851
ZS 3	0,2925	0,3314	0,4004	0,2869	0,3071	0,2206	0,2775	0,3255	0,2794	0,1434	0,1582	0,2140	0,3331	0,2137		0,1568	0,4794
ZS 4	0,2553	0,2930	0,3810	0,3202	0,2729	0,2109	0,3039	0,2924	0,2545	0,1798	0,1135	0,1648	0,3546	0,1695	0,1568		0,4621
ZS 5	0,3351	0,3700	0,5495	0,4261	0,3641	0,3766	0,4543	0,4030	0,3453	0,5562	0,5819	0,6084	0,4905	0,5851	0,4794	0,4621	



Appendix 2: Korrelation zwischen den mtDNA- und Mikrosatelliten-Daten. (A) Haplotype diversity RFLP-Analyse der ND1- & ND5/6-Region vs. Haplotype diversity Sequenz-Analyse der Kontrollregion, (B) Haplotype diversity RFLP-Analyse der ND1- & ND5/6-Region vs. erwarteter Heterozygotie, (C) Korrelation der genetischen Differenzierungen über F_{ST} -Werte zwischen beiden mitochondrialen Markersystemen, (D) Korrelation der genetischen Differenzierungen über F_{ST} -Werte zwischen mitochondrialer RFLP-Analyse der ND1- & ND5/6-Region und Mikrosatelliten.

Appendix 3: Referenzsequenzen der mitochondrialen Kontrollregion (CR), welche in die Haplotypenanalyse eingingen.

Published in	GenBank Accession Number	Haplo-type	Sequence length	Sample origin			Clade acc. to Maric et al. 2014; Meraner & Gandolfi 2012
				basin	country	water body	
Duftner <i>et al.</i> , 2005	AY594182	Da42	1083	Danube basin	Austria		Danube drainage Northern Alps
Duftner <i>et al.</i> 2005	AY594181	Da41	1083	Danube basin	Austria		Mixed Central Europe
Gum <i>et al.</i> 2005	AY841356	At23	1100	Atlantic basin	Germany		Mixed Central Europe
Gum <i>et al.</i> 2005	AY841357	At24	1100	Atlantic basin	Germany	Elbe basin	Mixed Central Europe
Gum <i>et al.</i> 2005	AY841360	At25	1100	Atlantic basin	Germany	Lutter River	Mixed Central Europe
Gum <i>et al.</i> 2005	AY841355	At22	1100	Atlantic basin	Sweden	Ratan	Scandinavia
Maric <i>et al.</i> 2012	JX099344	Ad7cs	1086	Adriatic basin	Slovenia	Tolminka River	Adriatic
Maric <i>et al.</i> 2012	JX099336	Da23cs	1086	Danube basin	Slovenia	Sava River	Balkan
Maric <i>et al.</i> 2012	JX099337	Da25cs	1086	Danube basin	Slovenia	Sava River	Balkan
Maric <i>et al.</i> 2012	JX099338	Da26cs	1086	Danube basin	Bosnia-Herzegovina	Sana River	Balkan
Maric <i>et al.</i> 2012	JX099339	Da27cs	1086	Danube basin	Serbia	Ibar River	Balkan
Maric <i>et al.</i> 2012	JX099340	Da28cs	1086	Danube basin	Bosnia-Herzegovina	Krusnica River	Balkan
Maric <i>et al.</i> 2012	JX099341	Da29cs	1086	Danube basin	Bosnia-Herzegovina	Drina River	Balkan
Maric <i>et al.</i> 2012	JX099342	Da30cs	1086	Danube basin	Bosnia-Herzegovina	Vrbas River	Balkan
Maric <i>et al.</i> 2012	JX099343	Da31cs	1086	Danube basin	Bosnia-Herzegovina	Una River	Balkan
Maric <i>et al.</i> 2012	JX099345	Da32cs	1086	Danube basin	Bosnia-Herzegovina	Bosna River	Balkan
Maric <i>et al.</i> 2012	JX099346	Da33sc	1086	Danube basin	Bosnia-Herzegovina	Drina River	Danube drainage Northern Alps
Maric <i>et al.</i> 2014	JX144730	Ca1	1087	Caspian basin	Russia	Karamalka River	Caspian
Maric <i>et al.</i> 2014	JX144731	Ca2	1087	Caspian basin	Russia	Shaytanka River	Caspian
Maric <i>et al.</i> 2014	JX144732	Ca3	1087	Caspian basin	Russia		Caspian
Maric <i>et al.</i> 2014	KF280207	Ca4	1087	Caspian basin	Russia		Caspian
Maric <i>et al.</i> 2014	KF280208	Ca5	1087	Caspian basin	Russia		Caspian
Meraner & Gandolfi 2012	JN796423	Ad10	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic

Fortsetzung Appendix 3

Published in	GenBank Accession Number	Haplo-type	Sequence length	Sample origin			Clade acc. to Maric et al. 2014; Meraner & Gandolfi 2012
				basin	country	water body	
Meraner & Gandolfi 2012	JN796424	Ad11	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Meraner & Gandolfi 2012	JN796425	Ad12	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Meraner & Gandolfi 2012	JN796426	Ad13	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Meraner & Gandolfi 2012	JN796427	Ad14	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Meraner & Gandolfi 2012	JN796428	Ad15	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Meraner & Gandolfi 2012	JN796429	Ad16	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Meraner & Gandolfi 2012	JN796430	Ad17	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Meraner & Gandolfi 2012	JN796431	Ad18	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Meraner & Gandolfi 2012	JN796432	Ad19	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Meraner & Gandolfi 2012	JN796433	Ad20	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Meraner & Gandolfi 2012	JN796434	Ad21	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Meraner & Gandolfi 2012	JN796435	Ad22	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Meraner & Gandolfi 2012	JN796420	Ad7	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Meraner & Gandolfi 2012	JN796421	Ad8	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Meraner & Gandolfi 2012	JN796422	Ad9	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Meraner & Gandolfi 2012	JN796442	Da34	1098	Danube basin			Balkan
Meraner & Gandolfi 2012	JN796438	Da30	1098	Danube basin	Austria	Inn River	Danube drainage Northern Alps

Fortsetzung Appendix 3

Published in	GenBank Accession Number	Haplo-type	Sequence length	Sample origin			Clade acc. to Maric et al. 2014; Meraner & Gandolfi 2012
				basin	country	water body	
Meraner & Gandolfi 2012	JN796441	Da33	1098	Danube basin	Germany		Danube drainage Northern Alps
Meraner & Gandolfi 2012	JN796443	Da35	1098	Danube basin	Austria	Inn River	Danube drainage Northern Alps
Meraner & Gandolfi 2012	JN796440	Da32	1098	Danube basin			Danube drainage Southern Alps
Meraner & Gandolfi 2012	JN796436	At27	1098	Atlantic basin			Mixed Central Europe
Meraner & Gandolfi 2012	JN796437	At28	1098	Atlantic basin			Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522419	Ad1	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Weiss et al. 2002	AF522420	Ad2	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Weiss et al. 2002	AF522421	Ad3	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Weiss et al. 2002	AF522422	Ad4	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Weiss et al. 2002	AF522423	Ad5	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Weiss et al. 2002	AF522424	Ad6	1098	Adriatic basin	Italy		Adriatic
Weiss et al. 2002	AF522416	Da22	1098	Danube basin	Slovenia		Balkan
Weiss et al. 2002	AF522417	Da23	1098	Danube basin	Slovenia		Balkan
Weiss et al. 2002	AF522418	Da24	1098	Danube basin	Austria		Balkan
Weiss et al. 2002	AF522395	Da1	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Northern Alps
Weiss et al. 2002	AF522405	Da11	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Northern Alps
Weiss et al. 2002	AF522408	Da14	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Northern Alps
Weiss et al. 2002	AF522411	Da17	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Northern Alps
Weiss et al. 2002	AF522412	Da18	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Northern Alps
Weiss et al. 2002	AF522413	Da19	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Northern Alps

Fortsetzung Appendix 3

Published in	GenBank Accession Number	Haplo-type	Sequence length	Sample origin			Clade acc. to Maric et al. 2014; Meraner & Gandolfi 2012
				basin	country	water body	
Weiss et al. 2002	AF522396	Da2	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Northern Alps
Weiss et al. 2002	AF522414	Da20	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Northern Alps
Weiss et al. 2002	AF522415	Da21	1098	Rhone basin	France	Doubs river	Danube drainage Northern Alps
Weiss et al. 2002	AF522397	Da3	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Northern Alps
Weiss et al. 2002	AF522398	Da4	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Northern Alps
Weiss et al. 2002	AF522406	Da12	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Southern Alps
Weiss et al. 2002	AF522407	Da13	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Southern Alps
Weiss et al. 2002	AF522409	Da15	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Southern Alps
Weiss et al. 2002	AF522399	Da5	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Southern Alps
Weiss et al. 2002	AF522400	Da6	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Southern Alps
Weiss et al. 2002	AF522401	Da7	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Southern Alps
Weiss et al. 2002	AF522402	Da8	1098	Danube basin	Austria		Danube drainage Southern Alps
Weiss et al. 2002	AF522425	At1	1098	Atlantic basin	France	Loire River	Loire
Weiss et al. 2002	AF522434	At10	1098	Atlantic basin	Switzerland		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522435	At11	1098	Atlantic basin	Switzerland		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522436	At12	1098	Atlantic basin	Switzerland		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522437	At13	1098	Atlantic basin	Switzerland		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522438	At14	1098	Atlantic basin	Switzerland		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522439	At15	1098	Atlantic basin	Switzerland		Mixed Central Europe

Fortsetzung Appendix 3

Published in	GenBank Accession Number	Haplo-type	Sequence length	Sample origin			Clade acc. to Maric et al. 2014; Meraner & Gandolfi 2012
				basin	country	water body	
Weiss et al. 2002	AF522440	At16	1098	Atlantic basin	France		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522441	At17	1098	Atlantic basin	Switzerland		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522442	At18	1098	Atlantic basin	Switzerland		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522443	At19	1098	Atlantic basin	Switzerland		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522444	At20	1098	Atlantic basin	Switzerland		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522445	At21	1098	Atlantic basin	France		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522433	At9	1098	Atlantic basin	Denmark		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522404	Da10	1098	Danube basin	Austria		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522403	Da9	1098	Danube basin	Austria		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522446	Rh1	1098	Atlantic basin	France		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522447	Rh2	1098	Atlantic basin	France		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522448	Rh3	1098	Atlantic basin	France		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522449	Rh4	1098	Atlantic basin	France		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522450	Rh5	1098	Atlantic basin	Switzerland		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522451	Rh6	1098	Atlantic basin	Switzerland		Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522452	Rh7	1098	Atlantic basin	Switzerland	Dessoubre River	Mixed Central Europe
Weiss et al. 2002	AF522426	At2	1098	Atlantic basin	Norway		Scandinavia
Weiss et al. 2002	AF522427	At3	1098	Atlantic basin	Norway		Scandinavia
Weiss et al. 2002	AF522428	At4	1098	Atlantic basin	Norway		Scandinavia
Weiss et al. 2002	AF522429	At5	1098	Barents Sea	Finland		Scandinavia
Weiss et al. 2002	AF522430	At6	1098	Barents Sea	Finland		Scandinavia
Weiss et al. 2002	AF522431	At7	1098	Baltic basin	Finland		Scandinavia
Weiss et al. 2002	AF522432	At8	1098	Barents Sea	Finland		Scandinavia
Weiss et al. 2002	AF522454	<i>T. grubei</i>	1097	Pacific		Amur	