

TEXTE 48/01

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

- Ökosystemschatz, Biotopschutz -

Forschungsbericht 296 85 900

UBA-FB 000188

Veränderungen der genetischen Vielfalt:

Molekulare und populations-ökologische Charakterisierung autochthoner und durch Besatz beeinflusster Salmoniden-Populationen (Bachforelle, Alpen-Seesaibling) in Bayern

Kurzfassung des Schlußberichts

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

Um den Grad forellenbachspezifischer biotischer Integrität zu messen, wurde im Rahmen eines Teilprojekts ein „Index of Biotic Integrity“ (IBI) entwickelt. Dieser sollte im Gegensatz zu bereits existierenden Integritätsindices, v.a. Karr's IBI (1981), in der Lage sein, die kleinräumige und artenarme Biozönose bayerischer Mittelgebirgsbäche auf der Basis ihrer Fischartengemeinschaft zu bewerten. Auf der Grundlage von Literaturangaben und ersten Beobachtungen im Freiland wurden potentielle Kriterien für einen „Forellenbach-IBI“ zusammengestellt, wobei Kriterien, die die Struktur der Population der Leitart (Bachforellen) berücksichtigen, besonderes Gewicht erhielten. Um die Aussagekraft eines Forellenbach-IBI zu studieren, wurden 34 Mittelgebirgsbäche in Bayern befischt und beprobt und 10 Kriterien der Fischartengemeinschaft und Populationsstruktur der Bachforelle bestimmt. Zur

befischungsunabhängigen Bewertung der biotischen Integrität dieser Gewässer wurde von jeder Untersuchungsstelle zusätzlich der Saprobenindex, der Säurezustand und die chemische Belastung nach standartisierten Kriterien bestimmt. Mittels Korrelationsanalyse und qualitativer Bewertung wurde jedes der 10 potentiellen Kriterien eines Forellenbach-IBI auf seine Tauglichkeit, Habitatsverschlechterung anzuzeigen, überprüft. Aus 7 der ursprünglich 10 Kriterien, die einen positiven Zusammenhang mit der Gewässergüte erkennen ließen, wurden ein modifizierter Forellenbach-IBI konstruiert, der seinerseits mit der Gesamtgewässergüte, die sich aus den unabhängig gewonnenen Gewässerbewertungen errechnete, in Beziehung gesetzt wurde. Dieser überprüfte Forellenbach-IBI korrelierte mit 55,8% mit der Gesamtgewässergüte (Spearman's Korrelation $p<0,001$, $n = 31$). Diese Korrelation erhöhte sich auf signifikante 60,1%, wenn die IBI-Bewertungsklassen klassiert (4 Klassen) und nicht kontinuierlich in die Analyse eingingen. Er erhöhte sich auf 70,6%, wenn nur organisch-toxisch belastete Bäche berücksichtigt wurden. Damit konnte gezeigt werden, daß der Forellenbach-IBI auf anthropogen verursachte Gewässergüteverschlechterungen anspricht. Entsprechend wurden alle in die Untersuchung des Besatzeinflusses eingegangen Bäche mit diesem Evaluierungsinstrument bewertet. Um es jedoch als allgemein nutzbares Evaluationsinstrument zu etablieren, sollte in weiterer Forschung der Einfluß von Jahreszeit, Region und interannuellen Schwankungen abgeschätzt werden.

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

Populationen mit 5 diskreten Mikro-satellitenmarkern typisiert und die allelische Vielfalt beschrieben. Diese war erwartungsgemäß wesentlich größer als bei den mitochondrialen RFLP's. Neben verschiedenen anderen Analysen wurden individuelle Mikrosatellitengenotypen einer Selbstklassifikationsanalyse unterworfen, wobei Genotypen entsprechend einer für jede Population berechneten Wahrscheinlichkeit zu ihrer eigenen oder einer anderen Population zugeordnet werden. Der Grad, mit dem Individuen „korrekt“ zugeordnet wurden, konnte somit als ein Maß für die phylogeographische Integrität einer Population angesehen werden, das neben anderen genetischen Parametern mit Besatz-einfluß und Umweltparametern und geographischen Einflüssen in Bezug gesetzt werden konnte.

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

Aus dem vergleichenden Teilprojekt zur Phylogeographie der Mühlkoppe in Mitteleuropa ergaben sich folgende Ergebnisse: In den bisher bekannten Arbeiten über die Phylogeographie der europäischen Süßwasserfische kann man generelle Muster erkennen. (1) Eine erste Besiedelung Europas aus dem Osten über das Schwarze bzw. Kaspische Meer. (2) Der Südosten Europas als wichtiges pleistozänes Refugium und eine hohe molekulare Diversität in dieser Region. (3) Die Wiederbesiedelung von Teilen Skandinaviens aus Zentraleuropa über die Ostsee. Die Mühlkoppen haben aber im Gegensatz zu allen anderen bisher untersuchten

Arten offensichtlich in großen Teilen Europas während des Pleistozäns überlebt, so auch in Mittel-europa und damit in Deutschland und Bayern. Sie unterscheiden sich darin von anderen Fisch-arten dieser Region, z.B. der Bachforelle, dem Döbel und dem Barsch. Entsprechend dieser vor langer Zeit begonnenen Differenzierungsprozesse ergibt sich für die Mühlkoppe nicht nur ein von anderen Fischen unterscheidbares Bild, sondern auch eines, daß sich durch eine wesentlich feiner gezeichnete Populationsstruktur auszeichnet. Zusammen mit der geringen Migrations-tendenz der Mühlkoppen stellt sich dieses Bild als feines Mosaik eigenständiger Linien dar, wobei sogar einzelne Bäche und Bachsysteme genetisch unterscheidbare Mühlkoppenpopula-tionen aufweisen können. Eine genauere kleinräumige Untersuchung von Populationen wäre allerdings interessant und nötig, um die Mechanismen der Populationsdifferenzierung und des Erhalts von Populationsgrenzen bei Mühlkoppe besser verstehen zu können. Erst eine solche Untersuchung würde es erlauben, „Evolutionary Significant Units“ (ESUs) für die Mühlkoppe genauer zu definieren. Wegen ihrer unerwartet unterschiedlichen Geschichte, war die Phylogeo-graphie der Mühlkoppe nicht als Analogie zur Phylogeographie der Bachforelle zu gebrauchen.

Im Rahmen des Teilprojekts zur Phylogeographie und Besatzeinfluß des alpinen Seesaiblings (*Salvelinus umbla*) wurden neun Populationen aus dem Donaueneinzugsbereich in Bayern und Österreich und eine aus dem Rheineinzug mit Mikrosatelliten und durch die Sequenzierung eines Bereichs der Kontrollregion der mitochondrialen DNA charakterisiert. Es zeigte sich in der Mikrosatellitenanalyse, daß alle Populationen des Donauraums jeweils deutlich voneinander verschieden sind, wobei aber in verschiedenen populationsgenetischen Analysen Populationen aus benachbarten Seen näher miteinander verwandt sind, als weit auseinanderliegende. Die Analyse der Kontrollregion ergab 17 Haplotypen, wobei einer sehr häufig ist und in acht von zehn Populationen präsent ist. Andere Haplotypen wurden in niedriger Frequenz jeweils in nur einem See, oder in sehr nahe benachbarten Seen gefunden. Die einzige und wichtige Aus-nahme betrifft auch die morphologisch aberrante Population des Ammersees, die ausschließlich durch 4 Haplotypen charakterisiert ist, die in keiner anderen Population gefunden werden konnten. Diese Eigenheiten sprechen dafür, daß diese Population eine eigene, bisher unbe-schriebenen Art darstellt, die für den bayerischen Ammersee endemisch ist. Die Ergebnisse aus der Analyse aller untersuchten Loci ergänzen sich und zeigen, daß die heutigen Populationen aus einer Ursprungspopulation stammen, es aber offensichtlich in den letzten 12000 Jahren zu einer deutlichen allopatrischen Differenzierung kam. Zur Analyse des Besatzeinflusses wurde die Ergebnisse der phylogeographischen Analyse mit einer Selbstklassifikationsanalyse aller Individuen auf der Basis der gefundenen Mikrosatellitenallelfrequenzen durchgeführt. Es zeigte, sich, daß das Einbringen von allochthonem Besatzmaterial in große intakte Seenpopulationen nur geringen und mit den aufgewandten Mitteln nicht eindeutig identifizierbare Spuren hinter-lassen hat. Auf der anderen Seite konnte für die zwischenzeitlich durch Umweltverschlechter-ungen stark beinträchtigte Population des Starnberger Sees wahrscheinlich gemacht werden, daß die Kombination von starker Umweltverschlechterung (die sich auf die absolute Popula-tionsgröße des Seesaibling auswirkt) und starkem Besatz mit allochthonem Material zu einer drastischen Verfälschung des autochthonen Bestandes führte. Weitergehende Untersuchungen mit mehr Populationen und teilweise mehr Individuen sind aber nötig, um Besatzeffekte auf lakustrine Populationen eindeutig nachzuweisen.

In der Diskussion wurden

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

(1) Es wird herausgestellt, daß für die Bachforelle der obere Donauraum eine sekundäre natürliche Kontaktzone zweier unterschiedlicher phylogenetischer Linien, der atlantischen und der danubischen, darstellt. Es konnte ein hoher Anteil atlantischer Linien im Donauraum festgestellt werden, der entsprechend unserer Analysen teilweise natürlichen Ursprungs sein muss. Dieses Ergebnis wurde dadurch bestätigt, daß atlantische Linien in wahrscheinlich unbesetzten Bächen im Einzugsbereich der Ilz detektiert werden konnten, die bisher nicht woanders gefunden wurden. Obwohl eine phylogeographische Struktur für die Bachforelle klar zu belegen ist, kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, daß ein Großteil der feiner aufzulösenden phylogeographischen Integrität durch Besatz bereits verloren gegangen ist. Wie groß dieser Verlust gemessen an der regional unterschiedlichen Einzigartigkeit regionaler Populationen zu bemessen ist, mußte allerdings in den meisten Fällen verborgen bleiben. Die Ergebnisse aus den intakten Vergleichsgebieten und aus dem Literaturvergleich lassen aber vermuten, daß regionale Eigenheiten, wie sie für die Ilz, die Wiesent und die Rodach in unserer Studie belegt werden können, durchgehend existiert haben, aber inzwischen flächendeckend verschwunden sind. Aus den oben dargestellten Zusammenhängen läßt sich folgern, daß die Konsequenzen negativen Besatzeinflusses auf die regionale phylogeographische Identität nur anhand der noch existierenden Reste dieser phylogeographischen Integrität abgeschätzt werden können. Dies ist solange möglich, solange im gleichen Bach oder Flussystem noch kaum beeinflußte Populationen existieren, die den regionalen ursprünglichen Zustand mit hoher Wahrscheinlichkeit repräsentieren. Allgemeine populationsgenetische Charakteristika einzelner Populationen außerhalb ihres phylogeographischen Kontexts, z. B. die Anzahl der Allele pro Population oder Abschätzungen des Heterozygotendefizits, lassen wegen der unterschiedlichen Faktoren, die diese Variablen beeinflussen können, keine direkten Rückschlüsse auf den Besatzeinfluß zu. Um diese Daten zu interpretieren, müssen Vergleichsdaten vorliegen. Über den Verlust phylogeografischer Identität hinaus lassen sich auch mit unseren Daten keine konkreten Verlustabschätzungen vornehmen. Potentiell auftretende ökonomische Verluste lassen sich zum Beispiel deswegen nicht benennen, weil der ökonomische Wert regionaler genetischer Diversität nicht zu quantifizieren ist.

(2) Entsprechend der Annahme, daß lokal adaptierte Populationen existieren, ließ sich die Folgerung formulieren, daß autochthone Populationen gegenüber allochthonem Besatzmaterial eine höhere Fitness aufweisen sollten, solange die Bedingungen, unter denen die erblichen lokalen Anpassungen evolviert sind, persistieren und nicht z.B. durch anthropogene Einflüsse verloren gegangen sind. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde im Rahmen des vorliegenden Projekts eigens ein für Bachforellengewässer geeigneter „Index of Biotic Integrity“ („Forellens-IBI“) entwickelt und evaluiert, der zur Quantifizierung der „forellenspezifischen“ Gewässerqualität aller beprobten Gewässer dienen sollte. In verschiedenen

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

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

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

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

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

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

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

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

Konkret bedeutet dies für die Bachforelle und den Seesaibling, daß

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

Weiterhin bedeutet dies für die untersuchten Organismen, daß

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

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

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

Summary

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

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

To investigate the evaluative power of a potential troutstream-IBI on the basis of 10 preselected criteria, we sampled fishes from 34 mountain streams in Bavaria using electrofishing-gear. In order to evaluate the 34 locations independently, we determined for each stream the commonly used "Index of Saproby", the "state of acidity" as well the "negative chemical load" by using standardised criteria. A correlation-analysis as well as a qualitative evaluation was then used to analyse the power of each of the 10 preselected criteria to detect environmental degradation in troutstreams. This procedure resulted in the selection of 7 out of 10 criteria, which correlated positively with the waterbody-quality. These 7 criteria where therefore used to construct a modified troutstream-IBI, which again was evaluated by correlation analysis with "overall water body quality", which was independently calculated from the non-fish data. This modified troutstream-IBI correlated with 55,8% with the "overall water body quality" (Spearman's Korrelation $p<0,001$, $n =31$). The correlation increased to significant 60,1%, if we coded the IBI-classes into to 4 classes and not continuously. The correlation further increased to 70,6%, if only organic-toxically loaded streams were analysed. We therefore showed that the troutstream-IBI detects anthropogenically caused degradation of overall water body quality, and therefore used the troutstream-IBI to classify all troutstreams, which were sampled during the populationgenetic survey. However, to establish our newly developed IBI as a general tool for the evalution of environmental degradation of small streams, further research is needed to understand the effects of season, region and the effect of interannual fluctuations on the troutstream-IBI.

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

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

The stocking impact on the mitochondrial DNA-diversity was analyzed together with the second set of genetic markers, the microsatellites. Most of the individuals which were analysed for mt-DNA diversity were typed for 5 different microsatellites. As expected, the microsatellite-diversity was much higher than for the mt-DNA-lineages. Besides several other analyses we subjected the individual microsatellite-genotypes to a "self-assignment analysis", where each individual genotype is assigned to one of the 50 populations according to the independently calculated likelihood that the individual genotype is present in one of these populations. The percentage of "correct" assignation of individuals to their own population or meta-population may therefore be used as a measurement of phylogenetic integrity for a given population. This, however, only if the effect of other genetic parameters, stocking history, geographic and environmental parameters partialled out.

To account simultaneously for a diversity of effects on the genetic and phylogeographic identity, we used Canonical Correspondence Analysis (CCA) to analyse which of the afromentioned parameters affected genetic diversity of a given population. The results show, that the drainage pattern affected the genetic variance independent of stocking history and environmental parameters. It defined geographically defined population-units, which are clearly discernable for bavarian brown trouts and therefore may be used for the definition of ESU's (*evolutionary significant units*). This, because they correspond to the definition ESU's in the way that they describe populations or groups of populations, which are reproductively isolated from other conspecific populations, and because they represent an important part of the evolutionary history of brown trout populations in Bavaria. The bavarian ESU's refer to populations of the following drainages: On the level of the three major drainages Elbe, Danube and Rhein-Main all are differentiated significantly. Within these major drainages the upper and lower Danube are differentiated significantly as well as the Ilz-drainage in the danubian realm of the Bavarian Forest, the Wiesent

drainage in the Main, as well as the Rodach-drainage, both in the Main-drainage of Oberfranken. Whether the phylogeographic identity of populations in other regions is nowadays destroyed due to stocking, or whether it was never existing, is not discernable with our data set. However, we consider the probability of a widespread destruction as being high. This, because it is suggested by the analysis of stocking impact using CCA. The results show significantly that already medium and especially strong stocking (as measured as stocking impact probability) independent of geographic or environmental parameters contributes significantly to the destruction of the phylogeographic identity of populations. This result is evident from the results of the self-classification analysis, which showed that in unstocked or almost unstocked streams most individuals (between 70 and 95%) were classified correctly to their own population or to a neighbouring one from the same subdrainage. However, in medium and strongly stocked populations the self-classification rate dropped to low values, which even went down to 0 %. This result was confirmed by several independent analyses of the complete data set. Astonishing was the fact, that the low self-classification rates were detected, although the stocking impact on the overall genetic variance in terms of e.g. allelic diversity accounted for only 8 %. We conclude from this result that already a relatively low degree of introgression can lead to a drastic destruction of phylogeographic integrity.

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

A second comparative part of the project investigated the phylogeography and stocking impact of the alpine charr, where 9 populations of the danubian drainage in Bavaria and Austria and one from the rhenanian drainage (Bodensee) were molecularly characterised using micro-satellites and mt-DNA sequencing of the D-loop-region. The population-genetic analysis of the microsatellite-data showed, that all populations of the danubian realm were differentiated significantly from each

other, and neighbouring lakes from the same subdrainage were more similar to each other than to those from other subdrainages. The analysis of the D-Loop-region resulted in the recognition of 17 mt-haplotypes, where one of these was very common and eight other were detected in 8 out of 10 populations. All other haplotypes were detected only in very low frequencies in single lakes or in a set of lakes in close neighbourhood. The only and important exception concerns the aberrant population of the Ammersee, which differs morphologically from the other investigated populations. This population was characterised exclusively by 4 "endemic" haplotypes, which were not found in any other population. This result accounts for the assumption that this population represents a yet undescribed species, which is endemic for the bavarian Ammersee. The results from the analysis of the microsatellite loci confirm and extend the results of the mitochondrial analysis and show, that the extant populations derive from one original founder population, which diversified allopatrically during the last 12000 years. To analyse the stocking impact, the results of the phylogeographic analysis were compared with a self-assignment analysis on the basis of microsatellite allele-frequencies. This analysis showed, that stocking with allochthonous material into large intact lacustrine populations affected these populations only marginally. On the other hand we rendered it likely for the population of the Starnberger See, that the temporary deterioration of the lake's environment combined with strong stocking during that period may have fostered an increased rate of introgression into the remnants of the autochthonous charr population. Again for this side-project, more research on more populations and more individuals are needed, in order to confirm our preliminary results.

In the discussion we elaborate

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

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

(i.e. out of their phylogeographic context; e.g. number of alleles per population, deficit of heterozygosity etc.) do not allow conclusions about the stocking impact. This, because too many factors may influence these characteristics independently, and to interpret these data, comparative data are needed.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Concerning the handling and stocking of transgenic salmonids, we suggest in analogy to the stocking with allochthonous but conspecific wild-type salmonids to follow the principle of caution. A way to follow this principle is use exclusively infertile stocks for stocking, and for handling and breeding, to use exclusively hatcheries,

which are absolutely safe in terms of possibilities of uncontrolled escapes. The respective stocks or hatcheries should be developed quickly.