

**Analyse der genetischen Populationsstruktur
der Äschen (*Thymallus thymallus*) in der Wiese und
mit ihr verbundener Gewässer bei Basel**



Eine Studie im Auftrag des Amtes für Umwelt und Energie (AUE) Basel-Stadt

durchgeführt von

Barbara I. Berli, Yuri Kläfiger und Prof. Walter Salzburger

Basel, im September 2015

Universität Basel, Zoologisches Institut

Evolutionsbiologie

Vesalgasse 1

CH – 4051 Basel

AUSGANGSLAGE	3
MATERIAL UND METHODEN	5
<i>Probenahme und Probenset</i>	5
<i>Auswahl der Analysemethoden</i>	7
<i>DNA Extraktion und Amplifikation der Mikrosatelliten</i>	8
<i>D-Loop-Analysen</i>	8
<i>Softwareanalysen</i>	9
RESULTATE	11
<i>Mikrosatelliten-Marker-Analysen</i>	11
<i>D-Loop-Analysen</i>	13
DISKUSSION	16
<i>Populationsgenetische Struktur der Äschen der Wiese und des Riehenteich-Systems</i>	16
<i>Geographische Zuordnung der untersuchten Äschen</i>	17
<i>Vergleich mit der Situation in der Birs (D-Loop-Daten)</i>	18
ZUSAMMENFASSUNG	19
DANKSAGUNG	20
REFERENZEN	20
<i>Anhang</i>	22

Ausgangslage

Die europäische Äsche (*Thymallus thymallus*) gehört wie die Forellen zu den Salmoniden (Lachsartigen). Ihr natürliches Verbreitungsgebiet umfasst praktisch ganz Kontinental-Europa, Skandinavien, sowie England und das nördliche Schottland (Northcote, 2000). Die Äsche ist die sog. „Leitart“ der Äschenregion und impliziert auf diese Weise den Charakter des entsprechenden Gewässers (Huet, 1954). So gelten für die Äschenregion folgende Charakteristika: Mittlere bis starke Strömung (1-1.5m/s), hoher Sauerstoffgehalt (>80%) und Temperaturen, welche im Sommer 20°C nicht über längere Zeit überschreiten sollten (Persat, 1988). Zudem gilt sie als Indikatorart ökologisch intakter Flüsse (Kirchhofer et al., 2007). Ihre Populationen werden bisher – wenn nötig – weniger durch Besatzmassnahmen als durch Stützmassnahmen künstlich gestärkt (Kirchhofer et al. 2007). Da sich die natürlichen Bedingungen für die Äschen jedoch kontinuierlich verschlechtern (Übernutzung der Flüsse, Fehlen von Laichplätzen oder Veränderung der Wassertemperaturen) und dadurch viele Populationen eine abnehmende Tendenz zeigen, gelten sie in der Schweiz als „gefährdet“ (Rote Liste, Kategorie 3; Kirchhofer et al., 1994). Aufgrund dessen hat das Bundesamt für Umwelt (BAFU) 2002 eine Studie in Auftrag gegeben, welche zum Ziel hatte, Äschenpopulationen von nationaler Bedeutung zu identifizieren (Kirchhofer et al., 2002). Die Äschenpopulationen der Wiese und der Birs wurden dabei nicht miteingeschlossen, da sie die damaligen Kriterien nicht erfüllten; was heisst, dass sie weder als bedroht noch als besatzabhängig eingestuft wurden (Anhang, Suppl. 1). Um die regionalen Äschenpopulationen dennoch zu beschreiben, gab der Kantonale Fischereiverband Baselland (KFVBL) der Universität Basel zwei Studien in Auftrag, in welchen die Äschenpopulationen der Birs kantonsübergreifend vom Kanton Jura bis zur Redingbrücke bei Birsfelden (BL) populationsgenetisch untersucht werden sollten (Vonlanthen und Salzburger, 2011; Kläfiger und Salzburger, 2012). Die Studien identifizierten drei genetische Gruppen (Cluster) der in der Birs untersuchten Äschen: Der erste Cluster erstreckt sich von der Redingbrücke (Birsfelden) flussaufwärts bis zur Heiligholzbrücke (Münchenstein). Der zweite reicht von der Heiligholzbrücke bis nach Liesberg (Kantonsgrenze Baselland und Jura) und der dritte Cluster ist im Kanton Jura zu finden, getrennt von denjenigen im Kanton Baselland. Die Studien untersuchten zudem die geographische Abstammung der Tiere aus der Birs. Sie stellten fest, dass die Äschen ab Heiligholzbrücke flussaufwärts, einschliesslich der Äschen des Kantons Jura, dem Doubs-Haplotypen entsprachen. Lediglich bei der Redingbrücke in Birsfelden wurde der Rhein-Haplotyp identifiziert. An der flussaufwärts von der Redingbrücke gelegenen Heiligholzbrücke selber, fand man ein Gemisch aus Doubs- und Rheinhaplotypen.

Nun stellt sich die Frage, wieviele Äschenpopulationen, resp. genetische Cluster, im anderen regional wichtigen Fluss, nämlich in der Wiese und im mit ihr verbundenen Riehenteich-System (bestehend aus Riehenteich, Neuer Teich und „Yysweiher“) existieren und welche Haplotypen dort identifiziert werden können. Die Wiese entspringt auf dem Feldberg auf 1200m Höhe, fließt durch den Schwarzwald und das Wiesental, bevor sie in der Schweiz nach rund 55km bei Basel in den Rhein mündet. Im schweizerischen Teil der Wiese herrschen periodenweise Wassertemperaturen, welche die für Äschen bekannten maximalen Wassertemperaturen oft überschreiten (Anhang Suppl. 2). Dies scheint die Äschenpopulation der Wiese jedoch nicht zu beeinträchtigen, da während diesen Hitzeperioden keine zusätzlichen Äschenabgänge registriert wurden (persönl. Mitteilung, H-P. Jermann, Fischereiaufseher Basel-Stadt). Der Riehenteich („Riechedych“) ist ein künstlich angelegtes Gewässersystem, welches parallel zur Wiese fließt und an einigen Stellen (z.B. Schliesse) mit ihr verbunden ist. Die Schliesse in der Wiese ist nicht wanderbar und könnte somit ein Hindernis für den genetischen Austausch sein. Um das zu untersuchende Gebiet geographisch einzubetten, organisierten wir zusätzlich Proben aus dem Rhein oberhalb und unterhalb der Rhein-Mündung der Wiese (Oberhalb: Aus dem Kanton Aargau, entnommen bei Rheinfeldern und Mumpf; unterhalb: Aus der Thur im Elsass, entnommen bei Staffelsheim, Pulversheim, Ensisheim und Cernay). Die Thur fließt bei Ensisheim in den Ill, welcher wiederum bei Strasbourg in den Rhein mündet. Als Flusssystem-fremde Referenzen bezogen wir Proben aus der Limmat bei Obersiggenthal und aus der kantonalen Äschenzucht in Schaffhausen in die Analysen mit ein. Die kantonale Fischzucht in Schaffhausen integrierten wir, da wir aus Vorgesprächen erfahren hatten, dass in den 1990er Jahren bis zur Jahrtausendwende pro Jahr rund 1000 Äschen entlang der Wiese eingesetzt worden waren. Dabei stammten die eingesetzten Tiere aus drei verschiedenen Zuchten: Aus der Fischzucht in Ermatingen (TG), der Fischzucht Riegger in Ettenheim (Baden-Württemberg) und der kantonalen Fischzucht in Schaffhausen (persönl. Mitteilung H. Koffel, damaliger „Obmann Gewässer“ des Kantonalen Fischereiverbands Basel-Stadt).

Die Hauptziele der vorliegenden Studie sind:

1. Die Äschen der Wiese und des mit ihr verbundenen Riehenteich-Systems populationsgenetisch (Identifikation von Populationen und Bestimmung der Herkunftslinien) erstmalig zu charakterisieren
2. Die Resultate mit bereits vorliegenden Daten der Äschen der Birs zu vergleichen
3. Den Einfluss der Schliesse in der Wiese auf populationsgenetischer Ebene einzuschätzen

Material und Methoden

Probenahme und Probenset

In der Zeit zwischen Januar und März 2015 erhielten wir von den Fischereiverantwortlichen des Elsass, des Kanton Aargau, sowie von Fischern des Kantonalen Fischereiverbands Basel-Stadt (KFVBS), vermittelt durch Hans-Peter Jermann, dem Fischereiaufseher von Basel-Stadt, insgesamt 143 Gewebeproben. Davon stammten 5 Proben von Äschen, welche in der Wiese oberhalb und 32 Proben von Äschen, welche unterhalb der Schliesse (S) gefischt worden waren (Abb. 1, oberhalb der Schliesse: Strecken A und unterhalb der Schliesse: Strecken B). Weitere 24 Gewebeproben bekamen wir vom Riehenteich-System (Riehenteich, Neuer Teich und „Yysweiher“, Abb. 1, Strecken C).

Aufgrund ungünstiger Wetterbedingungen und der beginnenden Laichzeit der Äschen (Ende März bis April) konnten aus dem Gebiet oberhalb der Schliesse nicht mehr als 5 Gewebeproben entnommen werden. Wir schlossen die Proben in die Analysen mit ein, können aufgrund der zu tiefen Probenzahl jedoch keine gesicherten Aussagen machen.



Abb. 1: Entnahmestellen der Äschen in der Wiese und im Riehenteich-System. A (rot): Probestrecken in der Wiese oberhalb der Schliesse (n=5), B (pink): Befischte Abschnitte in der Wiese unterhalb der Schliesse (n=32), C (orange): Beprobte Abschnitte im Riehenteich-System (n=24), S (violett): Lage der Schliesse in der Wiese.

Von den elsässischen Fischereibehörden erhielten wir als untere Rhein-Referenz 17 Proben aus der Thur (Abb. 2A). Als obere Rhein-Referenz erhielten wir von den aargauischen Fischereibehörden 19 Proben aus dem Rhein im Kanton Aargau (Abb. 2B), sowie als Flusssystem-fremde Referenz 25 Gewebeproben aus der Limmat (Abb. 2C). Komplettiert wurde das Set mit 21 Proben aus der kantonalen Fischzucht in Schaffhausen (Abb. 2D), welche als Besitzreferenz dienen sollten. Sämtliche Gewebeproben stammten von Fischen aller Altersklassen und Grössen und wurden auf zufälliger Basis entnommen. Alle Proben wurden direkt nach der Entnahme in 96% Ethanol konserviert.

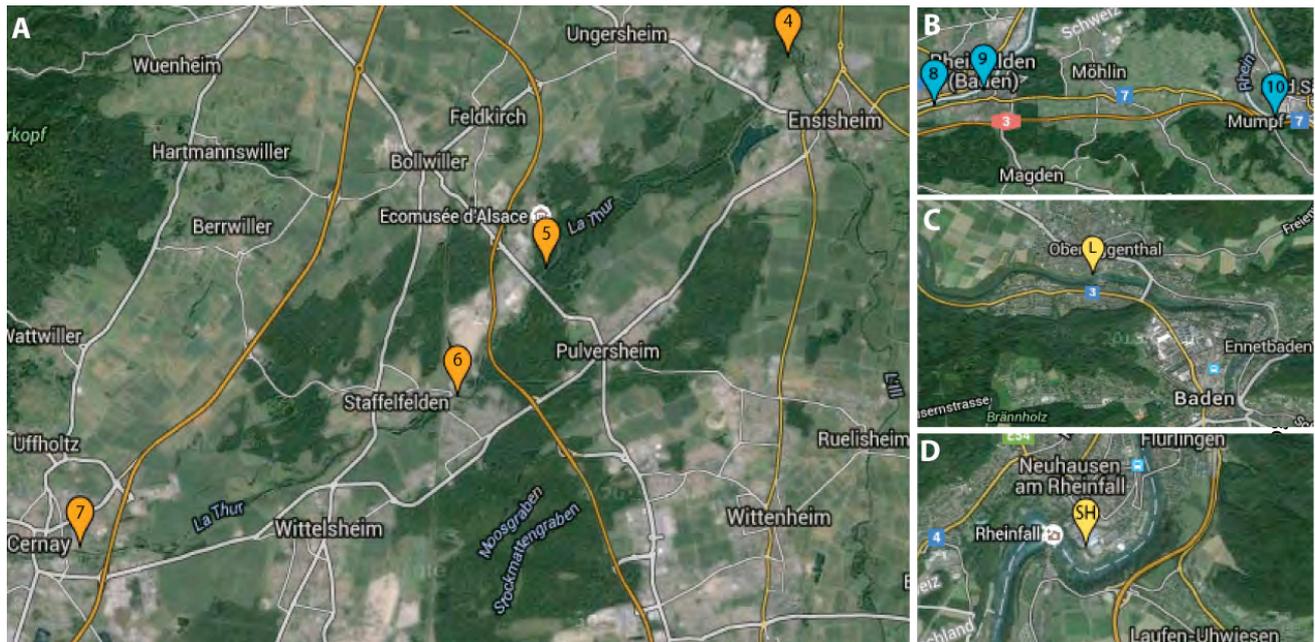


Abb. 2: Probestellen der Äschen aus dem Rhein unterhalb (Thur, Elsass) und oberhalb (Kanton Aargau) der Wiesenmündung in den Rhein, sowie die Flusssystem-fremde Referenz Limmat und die Besitzreferenz aus der kantonalen Fischzucht in Schaffhausen. A: Probestellen an der Thur (Elsass): 4: in Ensisheim (n=2), 5: in Pulversheim (n=3), 6: in Staffelfelden (n=11), 7: in Cernay (n=1); B: Probestellen im Rhein im Kanton Aargau: 8 und 9: Rheinfelden (n=13), 10: Mumpf (n=6); C: Limmat bei Obersiggenthal (n=25); D: kantonale Fischzucht Schaffhausen (n=21).

Auswahl der Analysemethoden

Zur Beantwortung der Fragestellungen entschieden wir uns für die Analyse von Mikrosatelliten-Loci, um allfällige genetische Cluster, resp. Populationen, zu identifizieren und für die sog. D-Loop-Analyse, die Sequenzierung einer Region der mitochondrialen DNA (siehe auch D-Loop-Analysen, S. 8), welche über die Herkunft eines Individuums Aufschluss gibt.

Mikrosatelliten sind spezifische Regionen des Erbguts, in welchen kurze identische Abfolgen von Basenpaaren wie z.B. 5' TATATATATA...TA 3' aneinandergereiht sind. Diese Abfolgen sind populationstypisch und gelten als „neutrale“ Regionen, da sie nicht für Gene kodieren. Weiter weisen Mikrosatelliten eine hohe Mutationsrate auf, sodass auch rezente Veränderungen festgestellt werden können. Für ihre Analyse haben wir den Ansatz eines Multiplex-Verfahrens gewählt. Bei diesem Verfahren werden der DNA gleichzeitig mehrere Primer hinzugefügt (Multiplex 1 enthielt 6 Primer und Multiplex 2 deren 5). Primer sind kurze DNA-Sequenzen, die direkt vor und nach den Mikrosatelliten-Regionen liegen und die verwendet werden, um die Mikrosatelliten-Loci zu multiplizieren, was mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR / polymerase chain reaction) geschieht. Die vervielfältigten (amplifizierten) DNA-Abschnitte werden anschliessend mit Hilfe einer Sequenziermaschine visuell dargestellt.

Als D-Loop-Analyse bezeichnet man das Verfahren, bei welchem die sog. Kontrollregion mitochondrialer DNA sequenziert wird. Dabei werden die beiden DNA-Stränge getrennt und durch einen dritten DNA-Strang in diesem Zustand gehalten, was einem grossgeschriebenen „D“ ähnelt. Dadurch, dass Mitochondrien nur mütterlicherseits vererbt werden, findet keine Rekombination statt. Identifizierte Abschnitte (Sequenzen) können sog. Referenzsequenzen zugeordnet werden. Unterschiedliche Sequenzen mitochondrialer DNA werden auch als Haplotypen, resp. Referenzsequenzen als Referenzhaplotypen bezeichnet. So können Herkunftslinien untersuchter Individuen erstellt und Tiere unterschiedlicher Flusssysteme miteinander verglichen werden. Der Vergleich der Sequenzen ist essentiell, da bereits eine einzige Abweichung (Mutation / Deletion) eine Sequenz einzigartig macht und so einen neuen Haplotypen definiert. Analytisch werden auch bei der D-Loop-Analyse spezifische Primer eingesetzt, um die entsprechende Region der mitochondrialen DNA in einer PCR zu amplifizieren. Ebenso wird für die Visualisierung der entsprechenden DNA-Abschnitte ein Sequenzierer eingesetzt – nur werden bei der D-Loop-Analyse Basenabfolgen identifiziert und visualisiert.

DNA Extraktion und Amplifikation der Mikrosatelliten

Nach dem Erhalt der Gewebeproben extrahierten wir im Labor die DNA, wobei die Extraktion von fünf Proben nicht erfolgreich verlief. Die Gewebeproben wurden in einem Mix aus Proteinase K (10µl), SDS (80µl) und Extraktions-Buffer (1M Tris, 0.5M EDTA, 5M NaCl und ddH₂O) über Nacht bei 37°C und 500rpm inkubiert. Die Extraktion führten wir von Hand mittels Auswaschung durch Ethanol oder mit dem Extraktions-Roboter MagNa Pure LC (Roche Ltd., Basel, Schweiz) durch. Für die Multiplex-Analyse benutzen wir einen PCR Multiplex Kit (Qiagen, Venlo, NL). Die Primer wählten wir basierend auf der Arbeit von Gum et al., 2003. Wir fügten daher der DNA im ersten Multiplex-Verfahren gleichzeitig 6 dinukleotide und im zweiten gleichzeitig 4 dinukleotide und 1 tetranukleotiden Primer hinzu [(Multiplex 1: Ssa289 (McConnell et al., 1995), BFRO017 (Sušnik et al., 1999b), BFRO004 (Snoj et al. 1999), BRFO009 (Sušnik et al., 1999a), One2 (Scribner et al., 1996), Ogo2 (Olsen et al., 1998); Multiplex 2: Ocl8 (Condrey und Bentzen, 1998), SsoSL311 (Slettan et al., 1995), BFRO010, BFRO011 (Sušnik et al., 2000) und F43 (Sanchez et al., 1996)]. Den Amplifikations-Prozess definierten wir folgendermassen: Ein Mix aus 5µl Qiagen Multiplex-Reaktionsbuffer, 1µl DNA und 0.2µl jedes Primers durchlief als Erstes eine Aktivierungsphase bei 95°C für 15min, dann folgten in Phase 2 eine Abfolge von 35 Zyklen bei 94°C für 30s, gefolgt von 57°C für 90s und 72°C für 90s. Die letzte Phase beinhaltete die finale Elongation während 10min bei 72°C. Die Produkte der Amplifikation wurden schliesslich mit Hilfe des ABI3130xl automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) visualisiert.

D-Loop-Analysen

D-Loop-Analysen benötigen eine höhere Qualität der extrahierten DNA, weshalb wir nicht von allen Proben die benötigten Sequenzen erstellen konnten. Von 118 DNA-Proben war die Qualität ausreichend, sodass wir sie mit den Primern LRBT-25 und LRBT-1195 (Uiblein et al., 2001) versehen und zusammen mit RedTaq-Polymerase, TaqBuffer und einem dNTP-Mix in folgenden Zyklen amplifizieren konnten: Aktivierungsphase bei 94°C für 2min, gefolgt von 30 Zyklen bei 94°C für 60s, 58°C für 90s, 72°C für 3min und der finalen Elongation von 72°C während 8min. Als Nächstes testeten wir mittels Gel-Elektrophorese, ob die Amplifikation erfolgreich war und purifizierten die amplifizierten PCR-Produkte mit ExoSAP-IT (Amersham Biosciences Corp., Cleveland, US). Anschliessend behandelten wir die PCR-Produkte mit einem Terminator Ready Reaction-Mix (BigDye, Life Technologies, Carlsbad, US). Die Sequencing-PCR beinhaltete folgendes „Stepwise Protocol“: Eine Aktivierungsphase bei 96°C für 60s, gefolgt von 15 Zyklen (10s bei 96°C und 2:30min bei 60°C), gefolgt von 15 weiteren Zyklen (10s bei 96°C und 3min bei 60°C). Abgeschlossen wurde das „Stepwise Protocol“ mit 10 weiteren Zyklen (10s bei 96°C und 3:30min bei 60°C). Nach einem wei-

teren Purifikationsschritt (X-Terminator purification mit beads, Life Technologies, Carlsbad, US) wurden die Basenabfolgen vom ABI3130xl automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, US) sequenziert und visualisiert.

Softwareanalysen

Mikrosatelliten-Marker: Die visualisierten Profile analysierten wir manuell mit der Software Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems, Life Technologies). Zur Überprüfung der eingegebenen Daten setzten wir die Software TANDEM (Matschiner und Salzburger, 2009) ein. TANDEM ist ein Programm das kontrolliert, ob die manuell angegebene Grösse der identifizierten Allele mit der erwarteten Grösse übereinstimmt. Allele sind Variationen eines bestimmten DNA-Abschnittes an einem Locus zwischen zwei Chromosomen einer diploiden DNA. Allele auf den jeweiligen Chromosomen können identisch (homozygot) oder unterschiedlich (heterozygot) sein. Im Anschluss an diese Kontrolle folgte die Auswertung der Daten mit dem Programm STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Diese Software vergleicht Variation und Häufigkeit aller angegebenen Allele miteinander und erstellt dann anhand von Wahrscheinlichkeitsberechnungen ein Verwandtschaftsprofil der einzelnen Fische. STRUCTURE bezieht die geographische Unterteilung durch die verschiedenen Entnahmestellen nicht in die Analyse mit ein, sondern geht von der Annahme aus, dass jedes Individuum mit jedem verwandt sein und von jeder Entnahmestelle stammen kann. Die Ergebnisse der Software STRUCTURE prüften wir anschliessend mit der Software STRUCTURE HARVESTER (Earl und von Holdt, 2012). STRUCTURE HARVESTER identifiziert, basierend auf den Resultaten von STRUCTURE, anhand von Wahrscheinlichkeitsberechnungen die wahrscheinlichste Anzahl an genetischen Clustern (K), resp. Populationen im analysierten Datenset. Die Verwandtschaftsverhältnisse werden als genetische Profile oder Gruppierungen von Genotypen (Clustern, K) dargestellt. Die entsprechenden Ergebnisse untersuchten wir weiter mit der Software Arlequin (Excoffier und Lischer, 2010). Sie errechnet den Grad der genetischen Differenzierung zwischen Entnahmestellen, resp. zwischen möglichen genetischen Gruppen. In einem paarweisen Vergleich werden die einzelnen Entnahmestellen einander gegenübergestellt und dadurch die genetische Unterschiedlichkeit F_{ST} (fixation index) berechnet. F_{ST} -Werte resultieren zwischen 0 und 1, statistisch bestätigt durch einen entsprechenden p-Wert. Ein F_{ST} -Wert von 0 sagt aus, dass keine genetische Struktur errechnet wurde, resp. dass keine genetische Unterschiedlichkeit festgestellt werden konnte, während ein F_{ST} -Wert von 1 komplette genetische Unterschiedlichkeit bedeutet. Abschliessend führten wir eine BOTTLENECK-Analyse (Piry et al., 1999) durch, um eventuelle genetische Engpässe zwischen den untersuchten Individuen und Probestellen zu identifizieren. BOTTLENECK (Piry et al., 1999) errechnet für jede Population und jede Entnahmestelle die Wahrscheinlichkeit, mit welcher die Allele

der Proben in Richtung eines genetischen Flaschenhalses tendieren. Dabei errechnet das Programm einen erwarteten Gleichgewichtswert für genetische Diversität, vergleicht diesen mit den eingegebenen Allel-Werten und identifiziert auf diese Weise allfällige Abweichungen.

D-Loop-Analysen: Die Qualität der durch den „Sequencer“ analysierten Abfolgen der DNA-Basen kontrollierten wir manuell mit Hilfe der Software CODONCODE ALIGNER (CodonCode Corp., Dedham, US). Anschliessend wurden die identifizierten Sequenzen der einzelnen Äschen mit der Software MEGA6 (Tamura et al., 2013) geordnet und durch Vergleichen mit der Referenzsequenz auf Basendifferenzen (Mutationen) untersucht. Folgende Referenzsequenzen, resp. -haplotypen (GenBank-Nummer in Klammer) konnten wir unserem Probenstet zuordnen: Haplotyp At20 (AF522444.1), Haplotyp Rh5 (AF522450.1), Haplotyp At11 (AF522435.1), Haplotyp Da17 (AF522411.1), Haplotyp Da1 (AF522396.1) und Haplotyp Rh1 (AF522446.1). Alle Referenzsequenzen, resp. -haplotypen stammen aus Weiss et al., 2002. Abschliessend wurden mit Hilfe der Software MEGA6 die genetischen Distanzen (Mutationsschritte zwischen den einzelnen Haplotypen) errechnet und so ein Haplotypen-Netzwerk erstellt.

Resultate

Mikrosatelliten-Marker-Analysen

Structure und Structure Harvester: In unserem Datenset ergaben die Berechnungen, dass zwei genetische Cluster (genetische Gruppen; $K=2$, Abb. 3), gefolgt von drei Clustern ($K=3$, Abb. 4), am wahrscheinlichsten sind. So weisen bei zwei angenommenen genetischen Gruppen ($K=2$, Abb. 3) die Proben der Limmat, diejenigen des Rheins im Kanton Aargau, sowie die Proben der kantonalen Fischzucht in Schaffhausen einen hohen Anteil eines Genotyps auf (grau), welcher vom Genotypen, der in der Wiese und im Riehenteich-System überwiegt (schwarz), leicht abgrenzbar scheint (Abb. 3). Die Proben der Thur im Elsass erscheinen bei $K=2$ nicht klar zuordenbar. Die Äschen in der Wiese oberhalb der Schliesse (hoher Schwarz-Anteil) scheinen zum Cluster der Wiese unterhalb der Schliesse und des Riehenteich-Systems zu gehören und somit von den Proben der Limmat, des Kanton Aargau, der Thur und der Zucht in Schaffhausen abgrenzbar; da wir von der Wiese oberhalb der Schliesse jedoch nur fünf Proben erhielten, können wir dort keine abgesicherte Aussage treffen.

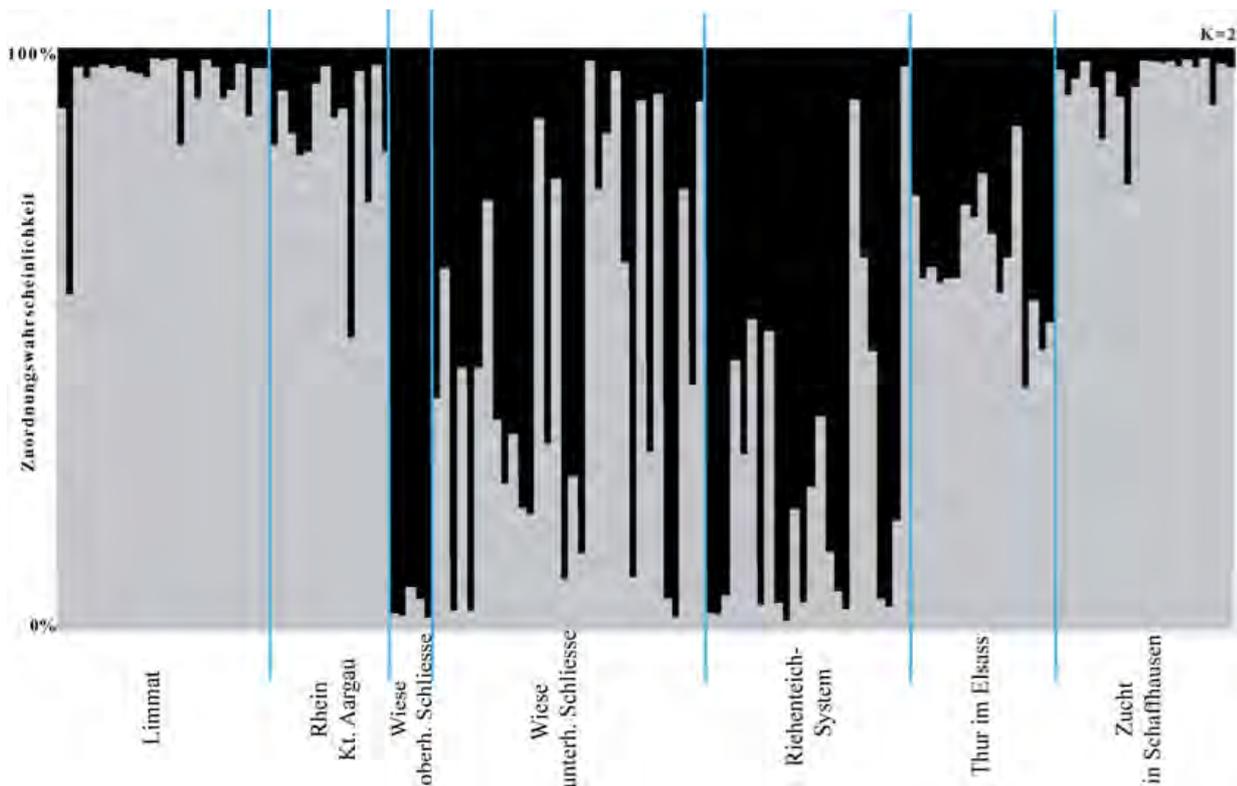


Abb. 3: Ergebnisse des Probensets der Wiese und mit ihr verbundener Gewässer, mit den Entnahmestellen im Rhein oberhalb und unterhalb Basels, sowie den Referenzen Limmat und Schaffhausen bei zwei genetischen Clustern ($K=2$). Die y-Achse gibt die Wahrscheinlichkeit (in %) der errechneten Zuordnungen an. Die Farben spiegeln die angenommene Zuordnung zu einer genetischen Gruppe (Cluster) wieder. Erscheint ein Balken einfarbig, so konnte er zu 100% zugeordnet werden. Das Bild zeigt eine Unterteilung in zwei sog. Cluster ($K=2$): Ein Cluster (mit hohem Grau-Anteil) besteht aus den Proben der Limmat, den aargauischen Rheinproben, sowie der Zucht in Schaffhausen. Der andere Cluster (mit hohem Schwarz-Anteil) beinhaltet die Proben aus der Wiese inkl. Riehenteich-System. Die Zuordnung der Thur ist bei $K=2$ unklar.

Bei drei möglichen genetischen Clustern ($K=3$, Abb.4) weisen die Limmat und die kantonale Zucht in Schaffhausen einen hohen Anteil gleicher Genotypen (blau) auf. Die Thur im Elsass scheint einen eigenen Cluster – also den zweiten – zu bilden (hoher Grau-Anteil). Als dritten Cluster identifizierten wir die Wiese zusammen mit dem Riehenteich-System (hoher Schwarz-Anteil). Der Rhein im aargauischen Gebiet erscheint als Gemisch aus blauen und grauen Genotypen, was keine klare Zuordnung zulässt. Die befischten Strecken der Wiese und des Riehenteich-Systems zeigen neben dem eigenen Genotypen (schwarz) auch zwei andere Genotypen auf (blau und grau), was auf einen möglichen Einfluss, resp. Austausch mit den anderen Genotypen hinweist.

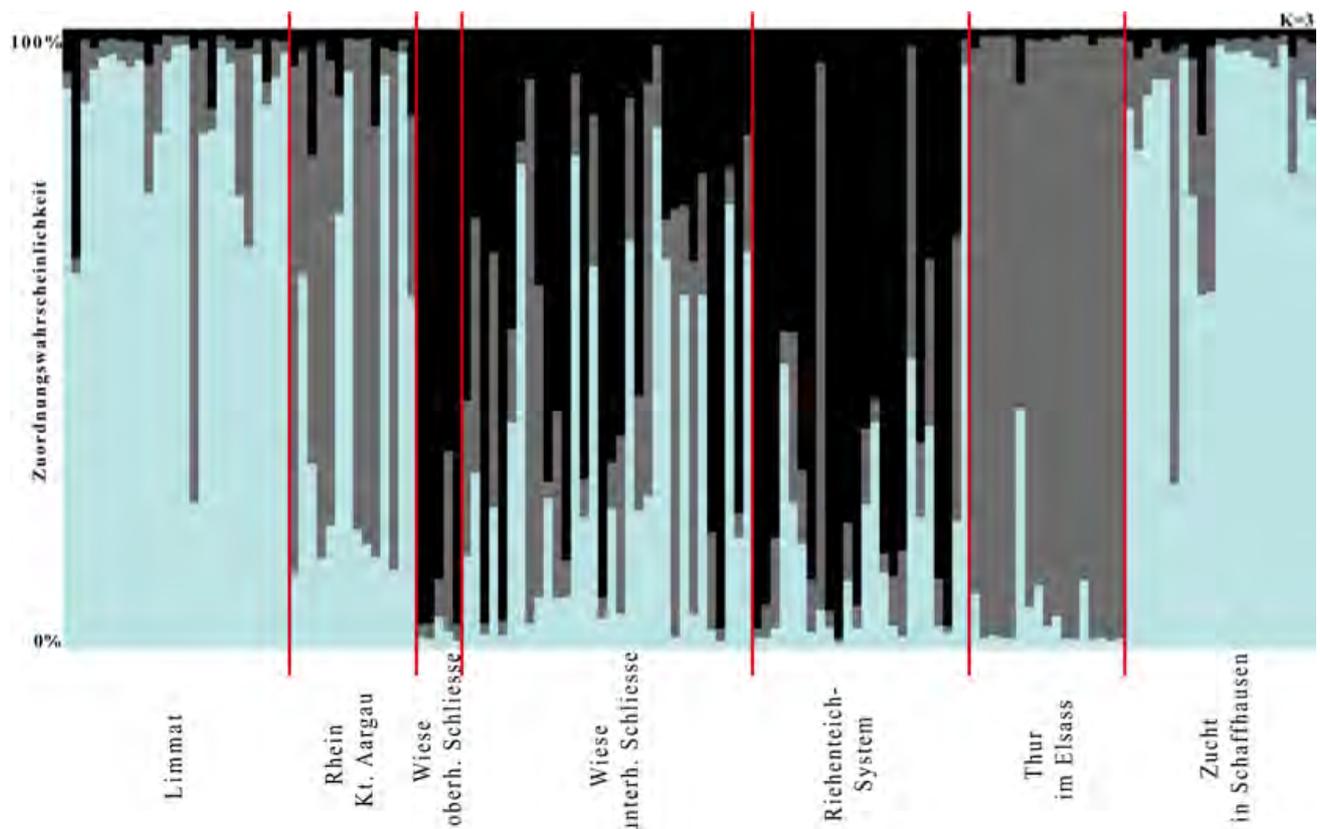


Abb. 4: Ergebnisse des Probensets der Wiese und mit ihr verbundener Gewässer, sowie den Entnahmestellen im Rhein oberhalb und unterhalb Basels und den Referenzen Limmat und Schaffhausen bei drei genetischen Clustern ($K=3$). Die y-Achse gibt die Wahrscheinlichkeit (in %) der errechneten Zuordnung an. Die Farben und Balken spiegeln die Zuordnung zu einer genetischen Gruppe wieder. Erscheint ein Balken einfarbig, so konnte er zu 100% zugeordnet werden. Erscheint er mehrfarbig, so ist die Zuordnung unsicherer. Auf dieser Abbildung erscheinen die Limmat und die Zucht in Schaffhausen einander sehr ähnlich, während die Thur einen eigenen Cluster bildet (mit hohem Grau-Anteil). Abgegrenzt und mit hohem Anteil eines eigenen Genotypen (hoher Schwarz-Anteil) erscheint die Wiese mit dem Riehenteich-System.

Arlequin- und Bottleneck-Analysen: Die Software ARLEQUIN (Excoffier und Lischer, 2010) errechnete den Grad der genetischen Differenzierung zwischen den Entnahmestellen und bestimmte die Unterschiedlichkeit. Zuerst stellten wir die Proben der Wiese und des Riehenteich-Systems den anderen Probeorten (Limmat, Rhein im Aargau und Thur im Elsass, kantonale Zucht in Schaffhausen) gegenüber und erhielten einen F_{ST} -Wert von 0.06 ($p < 0.001$). Als zweites testeten wir Wiese und Riehenteich-System gegen die Proben aus der Thur im Elsass und gegen die Gruppe aus Limmat und kantonaler Zucht in Schaffhausen und erhielten einen F_{ST} -Wert von 0.13 ($p < 0.001$). Die Bottleneck-Analysen (Piry et al., 1999) gaben bei keiner der Probestellen Anzeichen auf genetische Engpässe an.

D-Loop-Analysen

Haplotypen-Netzwerk und -Übersicht im Untersuchungsgebiet

Insgesamt konnten wir 118 Individuen erfolgreich sequenzieren und Referenzsequenzen, resp. -haplotypen zuordnen (Abb. 5). Die Kreise, aus welchen das Haplotypen-Netzwerk aufgebaut ist, stellen durch ihre Grösse die relative Anzahl, sowie durch ihre Einfärbung die Zugehörigkeit zu den entsprechenden Haplotypen dar. Zusätzlich zeigt das Netzwerk die genetische Distanz zwischen den einzelnen Haplotypen in Form von diskreten Mutationsschritten (schwarze Linien zwischen den Punkten). Weicht die vorliegende Sequenz durch eine Mutation von der Referenzsequenz ab, so wird ein neuer Haplotyp benannt. Für die Einteilung der Haplotypen haben wir uns auf das Paper von Weiss et al., 2002 gestützt. Sie haben die gesamte mitochondrielle DNA von 44 europäischen Äschenpopulationen sequenziert und so einen fein skalierten Stammbaum von Referenzhaplotypen, welche in Cluster gruppiert werden, erstellt. Der Grossteil der Äschen in unserem Probenet (99 von 118 Individuen) konnte atlantischen Haplotypen (Haplotyp 1, 2 und 3) zugeordnet werden. Die Unterschiede zwischen den atlantischen Haplotypen (Haplotyp 1-3) entstehen dadurch, dass Haplotyp 1 einem Haplotypen entspricht, welcher Teil des „Mixed Rhine/Donau“- Clusters ist, während Haplotyp 2 dem Cluster „Mixed Central Europe“ angehört (Weiss et al., 2002). Den beiden atlantischen Haplotypen phylogenetisch nah, somit auch atlantisch, durch eine Mutation jedoch eigenständig, ist Haplotyp 3. Haplotyp 4 entspricht einem Rhone Haplotypen (auch zum Cluster „Mixed Central Europe“ gehörend), welcher jedoch nahe verwandt mit den atlantischen Haplotypen erscheint. Ihm entsprechen 3 Individuen unseres Probenets. Davon sind 2 Individuen aus dem Rhein im Kanton Aargau und 1 Individuum aus der Limmat. Phylogenetisch weiter entfernt von den Haplotypen 1- 4 ist Haplotyp 5, der zweite Rhone Haplotyp, welchem 4 Individuen zugeordnet werden konnten. Diese bestehen aus 1 Individuum der Wiese oberhalb der Schliesse, 2 Individuen unterhalb der Schliesse

und 1 aus der Limmat. Die Donau Haplotypen (Haplotyp 6 und 7) sind durch zwei Mutationen von einander entfernt. Beide identifizierten wir nur in der Wiese und im Riehenteich-System. Haplotyp 6 umfasst im Ganzen 10 Äschen: 2 Individuen aus der Wiese oberhalb und 6 unterhalb der Schliesse, sowie 2 vom Riehenteich-System. Haplotyp 7 besteht aus 1 Individuum unterhalb der Schliesse und 1 aus dem Riehenteich-System.

Überträgt man die identifizierten Haplotypen auf die einzelnen Entnahmestrecken, so ergeben sich folgende Aufteilungen (Abb. 6): Von den 5 erhaltenen Individuen der Wiese oberhalb der Schliesse (Abb. 6, Strecken A) konnten wir 4 sequenzieren. Von diesen 4 entsprach 1 dem atlantischen Haplotypen 1, 1 dem zweiten Rhone Haplotypen (Haplotyp 5) und 2 gehörten zum ersten Donau Haplotypen (Haplotyp 6). Da wir von dieser Stelle jedoch für eine umfassende Aussage zu wenig Individuen erhielten, gelten die oben beschriebenen Informationen als rein deskriptiv. Von den 32 Proben der Wiese unterhalb der Schliesse (Abb. 6, Strecken B), konnten wir 26 sequenzieren. Davon entsprachen 6 Individuen dem einen atlantischen Haplotypen (Haplotyp 1), 8 dem zweiten (Haplotyp 2) und 3 Individuen dem dritten atlantischen Haplotypen (Haplotyp 3). Weiter konnten wir 2 Individuen dem Rhone Haplotypen (Haplotyp 5), 6 dem ersten Donau (Haplotyp 6), sowie 1 dem zweiten Donau Haplotypen (Haplotyp 7) zuordnen. Die Äschen des Riehenteich-Systems (Abb. 6, Strecken C) – wir konnten 20 von 24 Proben sequenzieren – entsprachen folgenden Haplotypen: 5 Individuen dem ersten atlantischen (Haplotyp 1), 7 dem zweiten atlantischen (Haplotyp 2), sowie deren 5 dem dritten atlantischen Haplotypen (Haplotyp 3). Weiter entsprachen 2 dem ersten Donau (Haplotyp 6) und 1 Individuum dem zweiten Donau Haplotypen (Haplotyp 7). Von den 17 uns zugesandten Äschen aus der Thur im Elsass konnten wir 12 sequenzieren. Davon gehörten 3 zum zweiten atlantischen (Haplotyp 2) und 9 zum dritten atlantischen Haplotypen (Haplotyp 3). Von den 19 Gewebeproben, welche wir aus dem Rhein im Kanton Aargau erhielten, konnten wir 14 sequenzieren. Davon gehörten 7 zum ersten (Haplotyp 1), 4 zum zweiten (Haplotyp 2) und 1 Individuum zum dritten atlantischen Haplotypen (Haplotyp 3). Zum ersten Rhone Haplotypen (Haplotyp 4) gehörten 2 Individuen. Von den Individuen aus der Limmat konnten wir 22 von 25 sequenzieren; davon entsprachen 14 Individuen dem ersten atlantischen Haplotypen (Haplotyp 1), 6 dem zweiten (Haplotyp 2), sowie 1 Individuum dem ersten Rhone (Haplotypen 4) und 1 anderes Individuum dem zweiten Rhone Haplotypen (Haplotyp 5). Die Äschen der kantonalen Zucht in Schaffhausen konnten fast alle sequenziert werden (20 von 21 Proben). Von ihnen entsprachen 19 dem ersten (Haplotyp 1) und 1 Individuum dem zweiten atlantischen Haplotypen (Haplotyp 2).

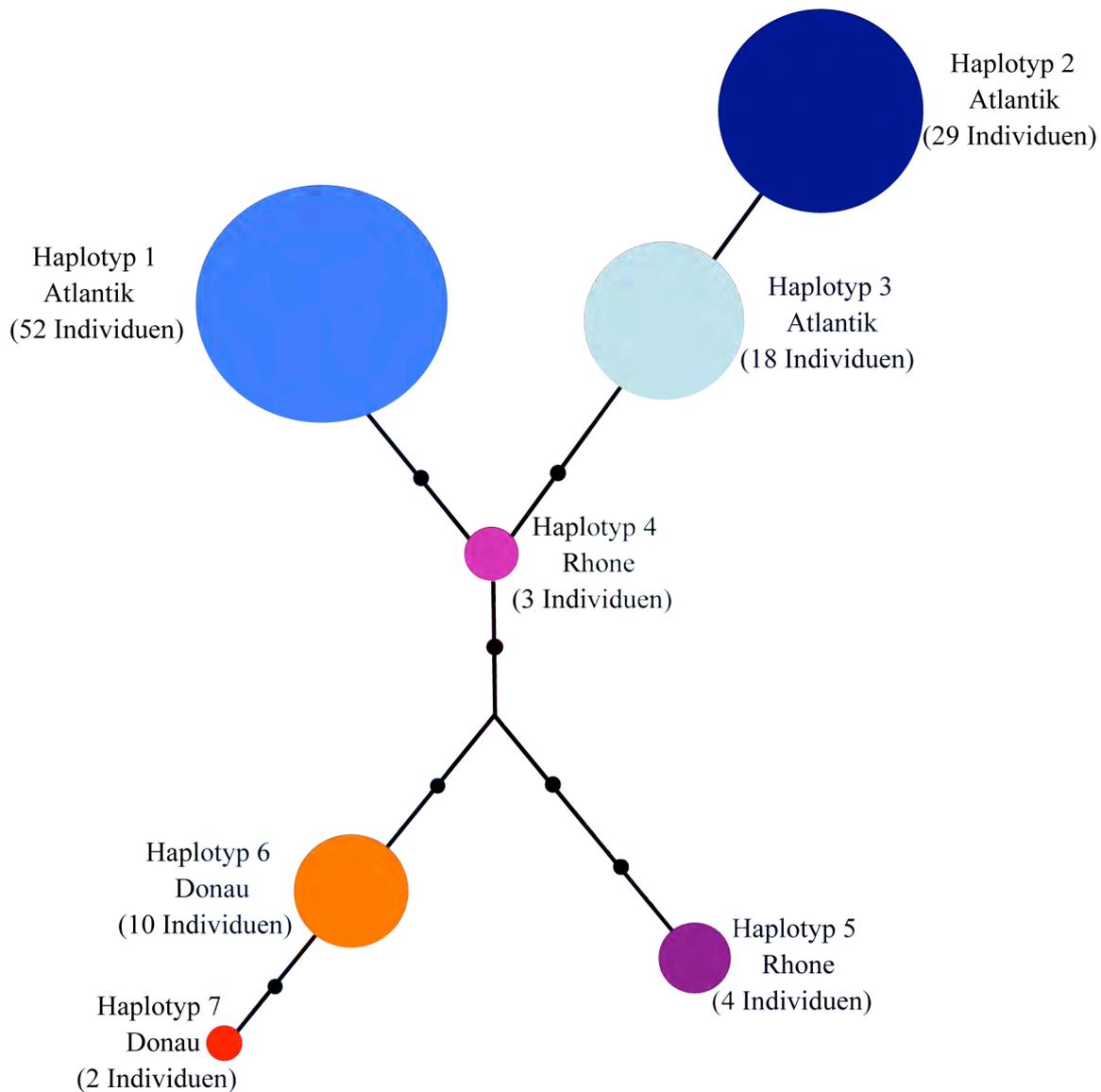


Abb. 5: Netzwerk der Haplotypen der Äschen aus den untersuchten Gebieten. Blautöne: atlantische Haplotypen; Pink und violett: Haplotypen der Rhone, sowie Rot- und Orange: Donau Haplotypen. Jede Linie zwischen einem schwarzen Punkt steht für eine Mutation. Die 52 Individuen, welche im Haplotypen 1 zusammengefasst sind, bestehen aus Individuen der Wiese oberhalb (n=1) und unterhalb der Schliesse (n=6), dem Riehenteich-System (n=5), aus dem Rhein im Kanton Aargau (n=7), aus der Limmat (n=14), sowie aus der Zucht in Schaffhausen (n=19). Die 29 dem Haplotypen 2 entsprechenden Individuen setzen sich zusammen aus Individuen der Wiese unterhalb der Schliesse (n=8), des Riehenteich-Systems (n=7), des Rheins im Kanton Aargau (n=4), der Limmat (n=6), der Thur im Elsass (n=3), sowie der Zucht in Schaffhausen (n=1). Zum Haplotypen 3, welcher phylogenetisch zwischen den ersten beiden Haplotypen angesiedelt wird, gehören Individuen der Wiese unterhalb der Schliesse (n=3), des Riehenteich-Systems (n=5), des Rheins im Kanton Aargau (n=1), sowie der Thur im Elsass (n=9). Die drei Individuen, welche im Haplotyp 4 zusammengefasst sind und ihren Ursprung im Rhone-Gebiet haben, setzen sich aus Individuen des Rheins im Kanton Aargau (n=2) und der Limmat (n=1) zusammen. Haplotyp 5, welcher auch der Rhone zugeordnet werden kann, besteht aus Individuen der Wiese oberhalb (n=1) und unterhalb der Schliesse (n=2), sowie aus der Limmat (n=1). Die Individuen des einen Donau Haplotypen (Haplotyp 6) bestehen aus Individuen der Wiese oberhalb (n=2) und unterhalb der Schliesse (n=6), sowie des Riehenteich-Systems (n=2). Dem anderen Donau Haplotypen (Haplotyp 7) entsprechen Individuen der Wiese unterhalb der Schliesse (n=1) und des Riehenteich-Systems (n=1).

Diskussion

Der vorliegende Bericht hatte drei Hauptziele: 1. Erstmals die Äschenpopulation der Wiese und des mit ihr verbundenen Riehenteich-Systems (bestehend aus Riehenteich, Neuer Teich und „Yysweiher“) populationsgenetisch zu beschreiben, 2. Die Resultate mit früheren Studien, welche die populationsgenetische Struktur der Äschen in der Birs untersucht hatten, zu vergleichen und 3. Abzuschätzen, ob die Schliesse in der Wiese ein Wanderhindernis darstellt und somit populationsgenetisch Einfluss auf die Äschenpopulation der Wiese und des Riehenteich-Systems hat.

Für die Beantwortung der ersten Frage, analysierten wir Mikrosatelliten-Marker-Daten und die sog. Kontrollregion mitochondrieller DNA von Proben aus der Wiese oberhalb und unterhalb der Schliesse, sowie des mit ihr verbundenen Riehenteich-Systems. Um die Proben geographisch einzubetten, bezogen wir Tiere des Rheins aus dem Kanton Aargau, als obere Rhein-Referenz, sowie Äschenproben aus der Thur im Elsass, welche bei Ensisheim in den Ill fliesst (der wiederum bei Strasbourg in den Rhein mündet), als untere Rhein-Referenz in die Analysen mit ein. Als Flusssystem-fremde Referenz analysierten wir Proben aus der Limmat, sowie als Besatzreferenz Äschen der kantonalen Zucht in Schaffhausen. Zweitens wählten wir aus, da wir aus Vorgesprächen erfahren hatten, dass in den 1990er Jahren bis um die Jahrtausendwende unter anderem Fische von Zuchten, deren Muttertiere zum Teil aus der kantonalen Fischzucht Schaffhausen stammten, wie auch einige Tiere, welche direkt von dieser Zucht bezogen worden waren, in der Wiese als Stützbesatz eingesetzt wurden (persönl. Mitteilung H. Koffel).

Populationsgenetische Struktur der Äschen der Wiese und des Riehenteich-Systems

Der Vergleich aller Mikrosatelliten-Marker-Daten ergab eine Differenzierung der Tiere der Wiese und des Riehenteich-Systems von den anderen beprobten Stellen (Abb. 3, Abb. 4 und Suppl. 3). Die Wiese unterhalb der Schliesse, wie auch das Riehenteich-System zeigen Genotypen, welche in den anderen Probeorten nur selten vorkamen. Der hohe Anteil des Genotypen, der an anderen Probeorten nicht identifiziert wurde, könnte für diese Probestrecken eigen sein; jedoch wäre es auch möglich, dass dies durch einen Besatz mit Äschen anderer Zuchten zustande kommt, da der grösste Teil der Wiese in Deutschland liegt. Auch abgrenzbar von Wiese und Riehenteich-System – wenn auch weniger klar als die Limmat- und die Schaffhauser Proben – sind die Äschenproben des Rheins, welche als obere und untere Referenz dienten, also diejenigen aus dem Rhein im Kanton Aargau und aus der Thur im Elsass. Von beiden Probestrecken findet man auch Signale in der Wiese und im Riehenteich-System. Es besteht also die Möglichkeit, dass Migration von Rheintieren in die Wiese in gewissem Mass stattfindet. Die fünf Individuen, welche oberhalb der Schliesse gefischt wurden, weisen

weniger genetische Heterogenität auf als die Proben unterhalb der Schliesse und diejenigen des Riehenteich-Systems. Wie bereits erwähnt, kann hier jedoch keine gesicherte Aussage gemacht werden, da die Probenzahl oberhalb der Schliesse zu klein war. Daher kann auch die Frage, ob die Schliesse populationsgenetisch als Barriere wirkt, nicht abschliessend beantwortet werden. Die fünf untersuchten Individuen weisen auf eine Barrierewirkung hin, jedoch müsste man mehr Fische untersuchen, um eine gesicherte Aussage machen zu können.

Geographische Zuordnung der untersuchten Äschen

Für die Aufteilung der Haplotypen (Ursprungslinien) der Äschen haben wir uns an der Einteilung von Weiss et al., 2002 orientiert. Die Autoren haben die gesamte mitochondrielle DNA von 44 Äschenpopulationen aus Europa analysiert, wodurch sie einen genauen Stammbaum erstellen und die sog. Haplotypen in Cluster gruppieren konnten. Auf die Entnahmepunkte der Äschen unserer Studie übertragen ergibt sich folgendes Bild (Abb. 6): In der Wiese und im Riehenteich-System finden wir verschiedene Herkunftslinien. So entsprachen die Individuen, welche auf der Strecke B „unterhalb der Schliesse“ untersucht wurden atlantischen, Donau und Rhone Haplotypen und diejenigen des Riehenteich-Systems atlantischen und Donau Haplotypen. Dafür könnte es folgende mögliche Erklärungen geben: Einerseits wurden die Äschenpopulationen der Wiese während den 1990er Jahren mit Äschen aus drei verschiedenen Zuchten gestützt (persönl. Mitteilung H. Koffel) und andererseits ist die Wiese ein internationales Gewässer, welches in Deutschland, nahe des Feldberges im Schwarzwald entspringt und möglicherweise von den Deutschen Fischereibehörden bewirtschaftet wird. Letzteres könnte auch eine Begründung dafür sein, dass nur in der Wiese Tiere der Donau-Linien identifiziert wurden, während die Tiere aus der Thur (Elsass) und aus der kantonalen Fischzucht in Schaffhausen homogener erscheinen: Sie entsprechen nur verschiedenen atlantischen Linien.

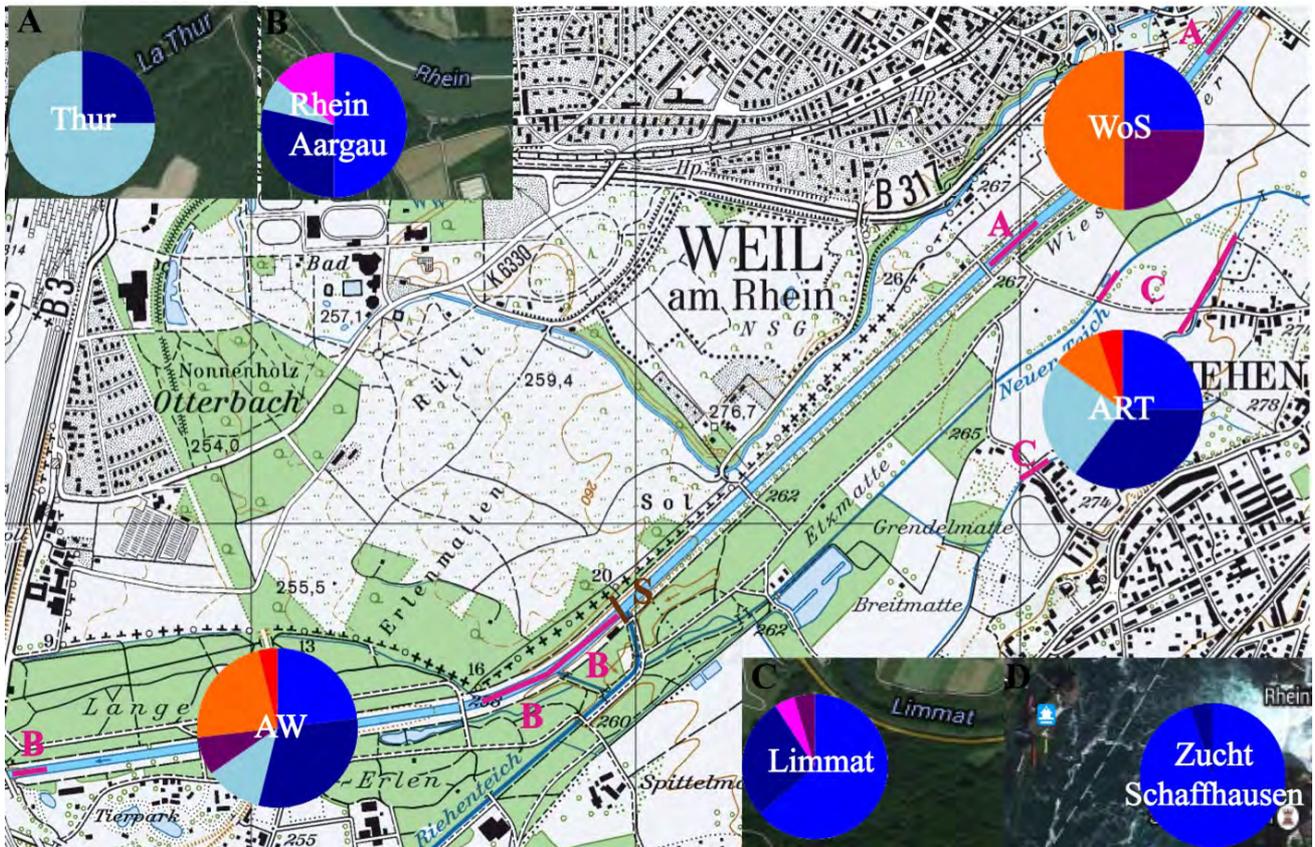


Abb. 6: Übersicht der Haplotypen projiziert auf die einzelnen Entnahmestellen. Blautöne stehen für atlantische Haplotypen (Haplotyp 1-3). Blau für den Haplotypen 1, der zum Cluster „Mixed Rhine / Danube“, gehört; Dunkelblau für den Haplotypen 2, welcher zum Cluster „Mixed Central Europe“ gehört; Hellblau für den Haplotypen 3, welcher durch eine Mutation vom Haplotypen 2 entfernt ist und somit auch als atlantisch gilt. Pink und Violett bezeichnen die Rhone Haplotypen (Haplotyp 4 und 5). Beide gehören auch zum Cluster „Mixed Central Europe“. Orange und Rot bezeichnen die beiden Donau Haplotypen, welche beide zum Cluster „Danubian drainage (Northern Alps)“ gehören. Streckenbezeichnung A: In der Wiese oberhalb der Schliesse befischte Abschnitte; B: In der Wiese unterhalb der Schliesse befischte Abschnitte; C: im Riehenteich-System befischte Abschnitte; S = Schliesse in der Wiese. Kästchen A: Haplotypen der Thur als „untere Rhein-Referenz“; Kästchen B: Haplotypen aus dem Rhein als „obere Rhein-Referenz“; Kästchen C: Haplotypen aus der Limmat als „flusssystemfremde Referenz“; Kästchen D: Haplotypen der kantonalen Zucht in Schaffhausen als „Referenz für die ehemaligen Besatzfische“. Hohe Durchmischung der Herkunftslinien (Haplotypen) sind in der Wiese und im Riehenteich-System zu finden. Rhein im Kanton Aargau und Limmat zeigen in geringem Mass Haplotypen der Rhone, während in der Thur und der kantonalen Fischzucht in Schaffhausen nur Tiere atlantischer Herkunft identifiziert wurden.

Vergleich mit der Situation in der Birs (D-Loop-Daten)

Die zweite Fragestellung sollte die populationsgenetischen Daten der Birs und der Wiese miteinander vergleichen. Beide Studien, welche in der Birs durchgeführt wurden (Vonlanthen und Salzburger, 2011 und Kläfiger und Salzburger 2012) identifizierten hauptsächlich Doubs-Haplotypen. Nur an der Redingbrücke, nahe der Mündung der Birs in den Rhein, fanden sie Rhein-Haplotypen. Beide sind Haplotypen, welche in unserem Probenstet nicht vorkamen – also auch weder in der Wiese, noch im Riehenteich-System. Weiter identifizierten wir in der Wiese und im Riehenteich-System verschiedene Haplotypen, die wiederum in der Birs nicht vorkamen. Daher empfehlen wir aus populationsgenetischer Sicht keine Vermischung von Äschen aus Wiese und Birs.

Zusammenfassung und Ausblick

Die populationsgenetischen Analysen haben ergeben, dass die Wiese und das mit ihr verbundene Riehenteich-System populationsgenetisch vom Rhein im Kanton Aargau und einem Zufluss des Rheins, der Thur im Elsass, wie auch von den Referenzen Limmat und der kantonalen Zucht in Schaffhausen, abgrenzbar ist und somit als eigener genetischer Cluster betrachtet werden kann. Die Mikrosatelliten-Analysen zeigen auch, dass die Wiese und das Riehenteich-System einen Genotypen aufweisen, der in den anderen von uns untersuchten Stellen nur marginal vorkommt. Weiter zeigen die entsprechenden Proben eine leichte Einmischung der Genotypen der anderen untersuchten Gebiete (Abb. 4 und Suppl. 3). Die Abstammungsanalysen (D-Loop) ergaben ein heterogenes Bild: So ist die Wiese, inkl. Riehenteich-System betreffend Haplotypen vielfältiger als die anderen beprobten Stellen. Sie weist neben mehreren atlantischen Haplotypen auch Haplotypen der Donau und der Rhone auf. Wir können uns zwei Gründe dafür vorstellen: Einerseits könnten sie durch den ehemaligen Besatz mit Fischen Flusssystem-fremder Zuchten dahin gelangt sein oder es könnte sein, dass die Wiese im oberen Abschnitt eventuell von den Deutschen Fischereibehörden bewirtschaftet wird. Wir würden daher eine Anschlussstudie auf internationaler Ebene anregen, welche den ganzen Fluss – also auch Fische aus dem Deutschen Teil der Wiese – kombiniert mit einem erneuten Fischen von Äschen aus dem Abschnitt oberhalb der Schliesse, mitanalysiert. Um die Studie abzurunden würden wir vorschlagen, auch Fische derjenigen Zuchten aus welchen die ehemaligen Besatzfische stammen, miteinzubeziehen. Eine solche Zusatzstudie könnte auch den Einfluss der Schliesse als Wanderhindernis klären, da aufgrund der fünf Fische in der vorliegenden Studie zwar Tendenzen festgestellt, aber keine statistisch verlässlichen Aussagen gemacht werden konnten.

Der Vergleich der Haplotypen der Äschen der Wiese und des Riehenteich-Systems mit denjenigen der Birs fiel eindeutig aus: Die Haplotypen der beiden Flüsse sind unterschiedlich und im jeweils anderen Fluss nicht vorhanden, weshalb wir aus populationsgenetischer Sicht von einer Vermischung abraten.

Danksagung

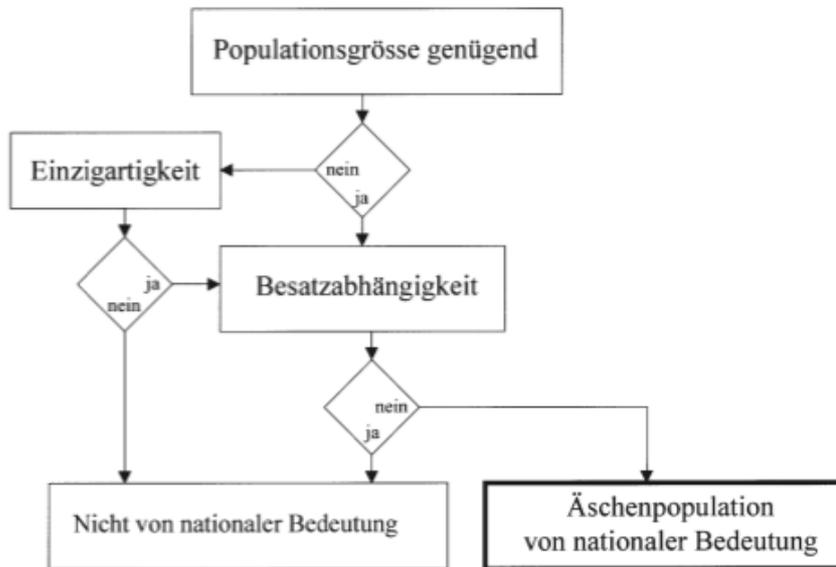
Wir möchten den Fischern des Kantonalen Fischereiverbands Basel-Stadt (KfVBS) für die Proben der Wiese danken. Ein weiterer Dank geht an Pierre Ball, ebenfalls vom KfVBS, für die Vermittlung der Proben aus dem Elsass. Ebenso danken wir Pascal Vonlanthen und David Bittner für die Proben aus dem Kanton Aargau. Auch dem Amt für Umwelt und Energie Basel-Stadt danken wir für die Erteilung des Auftrags und im Speziellen dem Fischereiaufseher von Basel-Stadt, Hans-Peter Jermann für die Organisation der Proben und der Fischer.

Referenzen

- Condrey, M. J., Bentzen, P. (1998). Characterization of coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) microsatellites and their conservation in other salmonids. *Molecular Ecology*.
- 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* vol. 4 (2) pp. 359-361.
- 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.
- 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** (6), 659-672.
- Huet M. (1954). Biologie, profils en long et en travers des eaux courantes. *Bulletin français de pisciculture* 175, 41-53.
- Kirchhofer A., Breitenstein M, Zaugg B. (2007). Rote Liste der Fische und Rundmäuler der Schweiz. Bundesamt für Umwelt, Bern, und Schweizer Zentrum für die Kartographie der Fauna, Neuenburg. Umwelt-Vollzug Nr. 0734. 64 S.
- Kirchhofer A., Breitenstein M. (2002). Äschenpopulationen von nationaler Bedeutung. *Mitteilungen zur Fischerei* Nr. 70. 47 S.
- Kirchhofer A., Zaugg B., Pedrolì JC. (1994). Rote Liste der Fische und Rundmäuler der Schweiz. In Duelli P. (Hrsg). Rote Listen der gefährdeten Tiere der Schweiz. BUWAL, Bern 35-37.
- Kläfìger Y., Salzburger W. (2012). Populationsgenetische Untersuchungen der Äschen in der Birs. Kantonaler Fischereiverband Baselland (KfVBL).
- Matschiner M., Salzburger W. (2009). TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics*, **25** (15), 1982-1983.
- McConnell, S. K., O'Reilly, P., Hamilton, L., Wright, J. M., Bentzen, P. (1995). Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmo salar*): genetic differentiation of North American and European populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **52** (9), 1863-1872.
- Northcote T.G. (2000). An updated review of Grayling Biology, Impacts, and Management. Peace/Williston Fish and Wildlife Compensation Program, Report No. 211 24pp plus appendices.
- Olsen J.B., Bentzen P., Seeb J.E. (1998). Characterization of seven microsatellite loci derived from pink salmon. *Mol Ecol* **7** (8):1087–1089

- Persat, H. (1988). De la biologie des populations de l'Ombre commun *Thymallus thymallus* (L. 1758) à la dynamique des communautés dans un hydrosystème fluvial aménagé, le Haut-Rhône français: éléments pour un changement d'échelles (Doctoral dissertation).
- Piry S., Luikart G., Cornuet J-M. (1999). Bottleneck: A program for detecting recent effective population size reductions from allele data frequencies. (v1.2.02). *Journal of Heredity* **90** (4), 502-503.
- Pritchard J. K., Stephens M. and Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155** (2), 945-959.
- Sanchez J. A., Clabby C., Ramos D., Blanco G., Flavin F., Vazquez E., Powell R. (1996). Protein and microsatellite single locus variability in *Salmo salar* L.(Atlantic salmon). *Heredity*, **77** (4), 423-432.
- 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. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**, 833-841
- Slettan A., Olsaker I., Lie Ø. (1995). Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL311, SSOSL417 loci. *Animal genetics*, **26** (4), 281-282.
- Snoj A., Sušnik S., Pohar J., Dovč P. (1999). The first microsatellite marker (BFRO 004) for grayling, informative for its Adriatic population. *Animal genetics* **30** (1), 74-75.
- Sušnik S., Snoj A., Dovč P. (1999a). Microsatellites in grayling (*Thymallus thymallus*): comparison of two geographically remote populations from the Danubian and Adriatic river basin in Slovenia. *Molecular Ecology*, **8** (10), 1756-1758.
- Sušnik S., Snoj A., Dovč P. (1999b). A new set of microsatellite markers for grayling: BFRO014, BFRO015, BFRO016, BFRO017 and BFRO018. *Animal genetics*, **30** (6), 462-478.
- Sušnik S., Snoj A., Jesenšek D., Dovč P. (2000). Rapid communication: microsatellite DNA markers (BFRO010 and BFRO011) for grayling. *Journal of animal science*, **78** (2), 488-489.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, **30** (12), 2725-2729.
- Uiblein F., Jagsch A., Honsig-Erlenburg W., Weiss S. (2001). Status, habitat use, and vulnerability of the European grayling in Austrian waters. *Journal of Fish Biology*, **59** (sA), 223-247.
- Vonlanthen P., Salzburger W. (2011). Populationsgenetische Untersuchungen der Äschen in der Birs. Kantonaler Fischereiverband Baselland (KFVBL).
- 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** (8), 1393-1407.

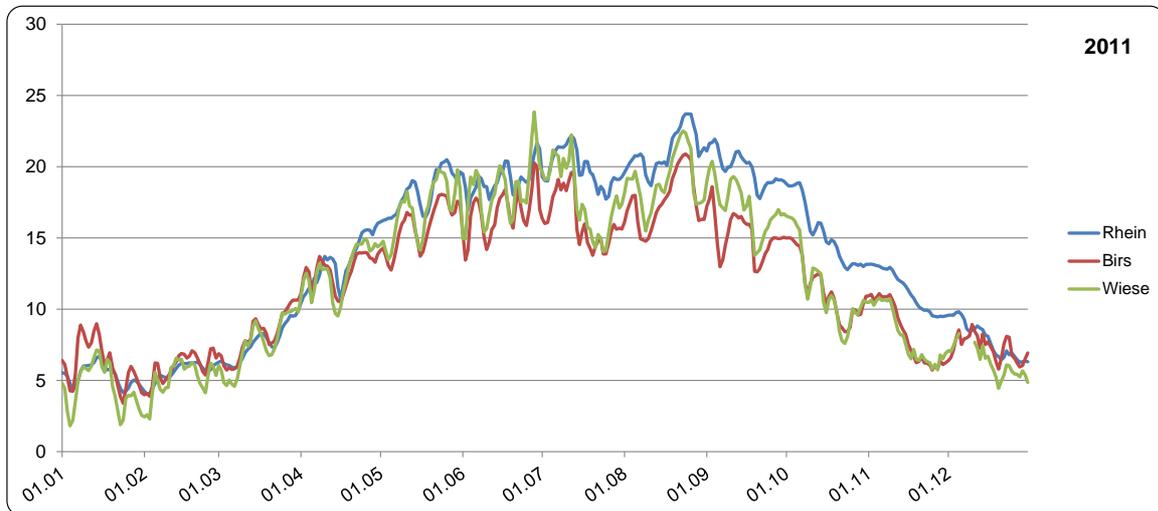
Anhang



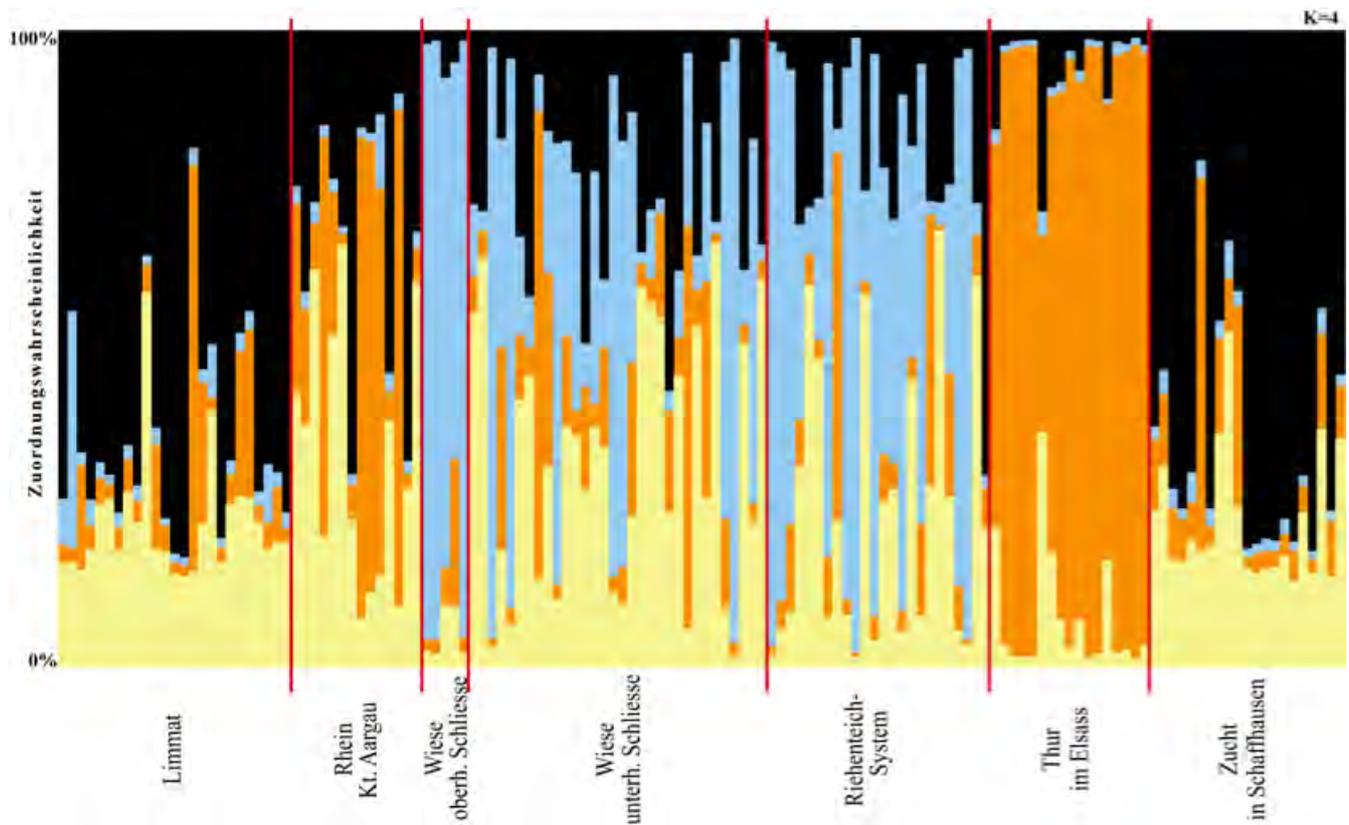
Suppl. 1: Auswahlkriterien für Äschenpopulationen von nationaler Bedeutung (Kirchhofer et al., 2002). Die Auswahl erfolgte in zwei Stufen: 1. Aufteilung der Populationen aufgrund der Zoogeographie in Einzugsgebiete und 2. Einteilung in folgende Kriterien: a) Existieren zoogeographische Besonderheiten? b) Wie gross ist die Population? c) Ist sie einzigartig? und d) Ist sie selbsterhaltend oder besatzabhängig?

Temperaturverlauf von Rhein, Birs und Wiese im Bereich Basel Stadt in den Jahren 2011-2013

Graphiken: Tagesmittelwerte aus stündlichen Messungen
Messstationen: Rhein, Birs: BAFU; Wiese: IWB,



Suppl. 2: Temperaturverlauf der Wiese (grün) im Vergleich mit dem Rhein (blau) und der Birs (rot) im Jahr 2011. Beachtlich dabei sind die Maximalwerte im Juli und im August, welche die Toleranzgrenze für Äschen um 3-5°C überschreiten. Quelle: AUE, Basel-Stadt.



Suppl. 3: Ergebnisse des Probensets der Wiese und des Riehenteich-Systems, sowie den zusätzlichen Entnahmestellen bei vier genetischen Clustern (K=4). Die y-Achse gibt die Wahrscheinlichkeit (in %) der errechneten Zuordnung an. Die Farben und Balken spiegeln die Zuordnung zu einer genetischen Gruppe wieder. Erscheint ein Balken einfarbig, so konnte er zu 100% zugeordnet werden. Erscheint er mehrfarbig, so ist die Zuordnung unsicherer. Bei einer Aufteilung in vier genetische Cluster erscheinen die Proben der Limmat und der Zucht in Schaffhausen gruppiert (hoher Schwarz-Anteil). Ebenso weisen die Wiese und das Riehenteich-System eigene Genotypen auf (blau). Als weiterer Cluster erscheint die Thur (orange). Die Rhein-Proben des Kanton Aargau erscheinen heterogen, verwandt mit Genotypen aus der Thur und gelten bei K=4 als eigener Cluster.