

# Endbericht: Populationsgenetische Untersuchung der Koppe (*Cottus gobio*)

Stephan Koblmüller & Raphael Donabaum  
Institut für Biologie, Karl-Franzen-Universität Graz  
Unviersitätsplatz 2, 8010 Graz

## Einleitung

Die Koppe (*Cottus gobio*), ist ein kleiner, bis zu ca. 16 cm langer, bodenassoziierter Süßwasserfisch, der in Mitteleuropa vor allem in der Forellen- und Äschenregion von Fließgewässern vorkommt (Kottelat & Freyhof 2007). Sie lebt in kühlen, sauerstoffreichen Gewässern mit steinigem Grund, wo sie sich v.a. von diversen wirbellosen Tieren ernährt (Villsen et al. 2022). Die Art stellt hohe Ansprüche an die Wasserqualität. Aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber Gewässerverbauung und -verschmutzung wurde sie in die Anhang II der FFH-Richtlinie aufgenommen. Ihre Lebensräume werden zunehmend durch menschliche Eingriffe gefährdet, da selbst kleine Hindernisse wie niedere Schwellen für diese kaum zu überwinden sind. Populationsgenetische Daten an Arten aus der Gattung *Cottus* (inkl. *C. gobio*) zeigen zum Teil beträchtliche Auswirkungen von Querbauten auf die populationsgenetische Struktur (Hänfling & Weetman 2007, Junker et al. 2012).

Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen dieses Projekt die populationsgenetische Struktur von vier Koppenpopulationen (Tabelle 1) aus dem Einzugsgebiet der Bregenzerach in Vorarlberg untersucht werden. Spezifisch sollten folgende drei Hypothesen geprüft werden:

1. Die genetische Variabilität unterscheidet sich zwischen den beprobten Koppenbeständen.
2. Die genetische Variabilität innerhalb der Koppenbestände ist im oberen Teil des Fließgewässersystems (Au/Hirschau) geringer als in tiefergelegenen Teilen (Weißach).
3. Im Untersuchungsgebiet ist die Herausbildung unterschiedlicher Genotypen beobachtbar.

## Material & Methoden

Die Proben (fin-clips von 90 Koppen von 4 Beprobungstellen; Tabelle 1) wurden vom Auftraggeber zur Verfügung gestellt. Von 89 Proben (eine Probe aus Hirschau fehlte) wurde mittels eines schnellen und effizienten Chelex-Protokolls (CH4 in Lienhard & Schäffer 2019) gesamtgenomische DNA extrahiert.

**Tabelle 1:** Anzahl Proben je Beprobungsstandort

Probenstelle	Koordinaten	Anzahl Proben <sup>1</sup>
Subersach (Hirtobel/Hittisau)	47.45044°N 9.95039°E	6
Weißach (Zwing)	47.50053°N 9.91962°E	28
Bregenzerach (Hirschau)	47.34636°N 9.91889°E	29 <sup>1</sup>
Bregenzerach (Au)	47.32066°N 9.98826°E	26

<sup>1</sup>Eine Probe fehlte

Anschließend wurden Multiplex-PCRs für elf Dinukleotid-Mikrosatelliten-Loci (Cgo18ZIM, Cgo1033, Cgo22ZIM, Cgo56ME, LCE21, CottE2, CottE10, Cott149, Cott179, Cott207; Englbrecht et al. 1999, Nolte et al. 2005), die in einer rezenten Studie über Koppen eine gute Auflösung auf Populationslevel erlaubten (Thaler 2021), durchgeführt. Die optimalen Reaktionsbedingungen/Primerkonzentrationen für die jeweiligen Multiplex-PCRs wurden im Rahmen der aktuellen Studie etabliert. Der PCR-Reaktionscocktail setzte sich zusammen aus 1 µl DNA-Extrakt, 2 µl destilliertem Wasser, 0.5 µl Primer-Mix (Tabelle 2; Primerkonzentration je 1.2 - 2 µM) und 2.5 µl Qiagen Type-it Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Venlo, The Netherlands). Die PCR-Reaktion wurden mit folgendem Programm durchgeführt: 5 min. bei 95°, gefolgt von 35 Zyklen mit je 30 sek. bei 95°C, 1.5 min bei T<sub>A</sub> (Tabelle 2) und 30 sek. bei 72°C; beendet wurde sie mit einer finalen Extensionsphase von 30 min. bei 60°C. Der Erfolg der PCRs wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte zur Genotypisierung vorbereitet und auf einen 3500xl 24-Kapillar-Sequenzierer geladen. Die Auswertung (Allelgrößenermittlung) wurde mit der GeneMapper 6.0 Software (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt.

**Tabelle 2:** Information zu den Multiplex-Primer-Cocktails (inkl. Info über verwendete Farbstoffe)

Cotgob_A		Cotgob_B		Cotgob_C	
Cgo18ZIM	1.5 µl F & 2.5µl R	Cgo1033PBBE	1.5 µl F & 2.5µl R	Cgo56MEHU	1.5 µl F & 2.5µl R
FAM		FAM		FAM	
Cgo22ZIM	1.5 µl F & 2.5µl R	CottE2	1.5 µl F & 2.5µl R	LCE21	1.5 µl F & 2.5µl R
NED		NED		NED	
		CottE10	1.5 µl F & 2.5µl R	Cott179	1.5 µl F & 2.5µl R
		FAM		VIC	
		Cott149	1.5 µl F & 2.5µl R	Cott207	1.5 µl F & 2.5µl R
		VIC		VIC	
		Cott164	1.5 µl F & 2.5µl R		
		VIC			
		VIC-Dye	5 µl	VIC-Dye	5 µl
NED-Dye	2.5 µl	NED-Dye	2.5 µl	NED-Dye	2.5 µl
FAM-Dye	2.5 µl	FAM-Dye	5 µl	FAM-Dye	2.5 µl
TE-Buffer	112 µl	TE-Buffer	92.5 µl	TE-Buffer	99 µl
T <sub>A</sub>	49°C	T <sub>A</sub>	56°C	T <sub>A</sub>	60°C

T<sub>A</sub>, Annealing-Temperatur

Von allen 89 Proben konnten Daten in ausreichender Qualität für weiterführende populationsgenetische Analysen generiert werden. Ein Test auf Nullallele und Scoring-Fehler mittels Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) ergab keine konsistenten (über Probenstandorte hinweg) Hinweise auf das Vorhandensein von Nullallelen, sodass die ermittelten Genotypen direkt für standard-populationsgenetische Analysen verwendet werden konnten. Als Maß für die genetische Diversität wurden für jeden Mikrosatellitenlocus und Population die Anzahl an Allelen (N<sub>A</sub>), beobachtete (H<sub>o</sub>) und erwartete Heterozygotität (H<sub>e</sub>) in Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010) ermittelt. Zudem wurde Arlequin verwendet um auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu testen (Markov-chain mit 100,000 Schritten), das Linkage-Disequilibrium zwischen den Loci zu berechnen (10,000 Permutationen), und für jede Population den Inzucht-Koeffizienten (F<sub>IS</sub>) zu ermitteln.

Die Differenzierung zwischen den einzelnen Populationen wurde anhand von FSTs (FST beschreibt den Anteil an der Varianz in Allelfrequenzen, der durch die Gruppierung der Individuen in verschiedene Populationen erklärt wird; Weir & Cockerham 1984) in Arlequin ermittelt. Die p-Werte wurden unter Anwendung der Benjamini-Hochberg-Korrektur (Benjamini & Hochberg 1995) angepasst, um die durch multiple Tests bedingte „False Discovery Rate“ zu kontrollieren. Außerdem wurde eine Bayes'sche Clustering-Methode in Structure 2.3 (Pritchard et al. 2000) durchgeführt, in der die einzelnen Proben K Clustern zugeordnet werden (correlated allele frequency-Modell, Falush et al. 2003; burn-in 100000,

run-time 1000000 steps). Für jede Anzahl an Clustern ( $K = 1-5$ ) wurden 10 Wiederholungen durchgeführt. Die wahrscheinlichste Anzahl an distinkten Clustern wurde mittels der DeltaK-Statistik (Evanno et al. 2005) über das R-Pakets POPHELPER (Francis 2017) ermittelt. POPHELPER wurde auch verwendet um die Wiederholungen der Structure-Ergebnisse jeder Anzahl an Clustern analog zu CLUMPAK (Kopelman et al. 2015) zusammenzufassen, und die Ergebnisse zu visualisieren. Darüber hinaus wurde die populationsgenetische Struktur auch mit einer DAPC (Discriminant Analysis of Principal Components) unter Verwendung des R-Pakets adegenet 2.1.11 (Jombart et al. 2010; Jombart & Ahmed 2011) untersucht. Um sicherzustellen, dass das Modell nicht überangepasst (overfitted) ist, wurde mittels Cross-Validation die optimale Anzahl an Hauptkomponenten (PC)s für die finale DAPC ermittelt.

Rezente Migration zwischen Populationen wurde mit BayesAss 3.0.5 (BA; Wilson & Rannala 2003) untersucht. Die BA3MASAT-Analyse in BayesAss wurde über 1,000,000 durchgeführt, von denen 100,000 als Burn-in verworfen wurden, mit Sampling alle 1000 Iterationen. Die Analyse wurde zehnmal mit unterschiedlichen random starting seeds wiederholt, wobei die Mixing-Parameter für Allelfrequenzen, Inzuchtkoeffizienten und Migrationsraten auf  $a$  0.3,  $-f$  0.6 und  $-m$  0.8 gesetzt wurden. Mit diesen Werten erreichten wir Akzeptanzraten für diese Parameter im optimalen Bereich zwischen 20 und 60% in den MCMC-Ketten, wie im BayesAss-Manual empfohlen. Tracer 1.7 (Rambaut et al. 2018) wurde verwendet um zu evaluieren ob die Dauer der einzelnen Läufe lang genug war (beurteilt anhand der Effective Sample Sizes (ESS) für die einzelnen Parameter; Kuhner 2009). Um den „besten“ Lauf für die Abschätzung der rezenter Migrationsraten zu identifizieren, wurde gemäß Faubet et al. (2007) mittels des in Meirmans (2014) bereitgestellten R-Skripts die Bayes'sche Deviance (Spiegelhalter et al. 2002) berechnet. Die BayesAss-Ergebnisse wurden mithilfe des R-Pakets Circlize (Gu et al. 2014) visualisiert.

Die effektive Populationsgröße ( $N_e$ ) der Koppelpopulationen wurde mittels der LD (linkage disequilibrium) Methode (Waples & Do 2010) in NeEstimator v2 (Do et al. 2014) ermittelt. Dabei wurden Singletons (Allele die nur einmal in einem einzigen Heterozygoten vorkommen), wie für diese Methode empfohlen, nicht berücksichtigt (Do et al. 2014). In einer Simulationsstudie wurde gezeigt, dass die von uns verwendete LD-Methode zur Ermittlung von  $N_e$  die genauesten Schätzungen von  $N_e$  über ein breites Spektrum an demographischen Szenarien liefert (Gilbert & Whitlock 2015). Zudem wurde in Bottleneck (Piry et al. 1999) mittels des Wilcoxon-Tests auf einen Heterozygotenüberschuss getestet, was auf eine drastische rezente Reduktion in  $N_e$  hinweisen würde (Cornuet & Luikart 1996).

### **Ergebnisse:**

Von allen 89 Proben konnten weiter verwertbare Mikrosatellitenprofile ermittelt werden, auch wenn bei einigen wenigen Proben einzelne Mikrosatellitenloci nicht amplifiziert werden konnten. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die genetische Diversität an den untersuchten Mikrosatellitenloci in den vier untersuchten Koppelpopulationen. Ein signifikantes und über die Populationen hinweg konsistentes Linkage zwischen Mikrosatellitenloci war nicht vorhanden. Nach Korrektur für multiples Testen waren  $H_0$  und  $H_E$  in drei Fällen signifikant unterschiedlich voneinander - Locus Cott210 in der Weißach-Population, Locus CottE2 in den Populationen aus der Weißach und der Bregenzerach in Hirschau (Tabelle 3). Der Inzuchtkoeffizient FIS war nur in der Weißachpopulation signifikant (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Genetische Diversität an den untersuchten Mikrosatellitenloci in den untersuchten Koppenpopulationen.

Population		Locus											Durchschnitt (s.d.)
		Cgo18ZIM	Cgo22ZIM	Cott164	Cott210	CottE2	Cgo1033	Cott149	Cott179	Cott207	Cgo56ME	LCE21	
Subersach	NA	3	2	2	4	4	2	2	3	3	3	3	2.818 (0.751)
	HO	1.000	0.333	0.167	0.833	0.200	0.167	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.397 (0.269)
	HE	0.667	0.303	0.167	0.712	0.822	0.167	0.485	0.318	0.712	0.318	0.318	0.454 (0.236)
Weißbach	NA	10	2	4	8	9	6	2	4	9	8	4	6.000 (2.933)
	HO	0.679	0.143	0.179	<b>0.429</b>	<b>0.481</b>	0.429	0.429	0.593	0.643	0.704	0.630	0.485 (0.191)
	HE	0.796	0.135	0.201	<b>0.738</b>	<b>0.774</b>	0.479	0.486	0.573	0.745	0.718	0.646	0.572 (0.228)
Hirschau	NA	8	3	3	14	9	4	2	7	4	9	6	6.274 (3.580)
	HO	0.793	0.414	0.034	0.793	<b>0.500</b>	0.448	0.517	0.379	0.517	0.931	0.552	0.534 (0.243)
	HE	0.739	0.423	0.101	0.818	<b>0.740</b>	0.462	0.487	0.366	0.494	0.837	0.605	0.552 (0.222)
Au	NA	6	4	1	9	3	3	2	5	3	10	5	4.636 (2.803)
	HO	0.654	0.423	0.000	0.885	0.577	0.462	0.269	0.654	0.577	0.846	0.577	0.539 (0.251)
	HE	0.634	0.508	0.000	0.844	0.569	0.461	0.491	0.541	0.584	0.850	0.571	0.550 (0.224)
Durchschnitt (s.d.)	NA	6.75 (2.97)	2.75 (0.96)	2.5 (1.29)	8.75 (4.11)	6.25 (3.20)	3.75 (1.71)	2.00 (0.00)	4.75 (1.71)	4.75 (2.87)	7.50 (3.11)	4.50 (1.29)	4.932 (2.171)
Total	NA	12	5	4	15	15	6	2	9	10	14	8	9.091 (4.549)

NA, Anzahl der Allele; HO, beobachtete Heterozygotität; HE, erwartete Heterozygotität. Fett geschriebene Werte weisen auf signifikante Abweichungen (nach Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiples Testen; Benjamini & Hochberg 1995) vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht hin.

**Tabelle 4:** Inzuchtkoeffizient(FIS) für die einzelnen Koppenpopulationen.

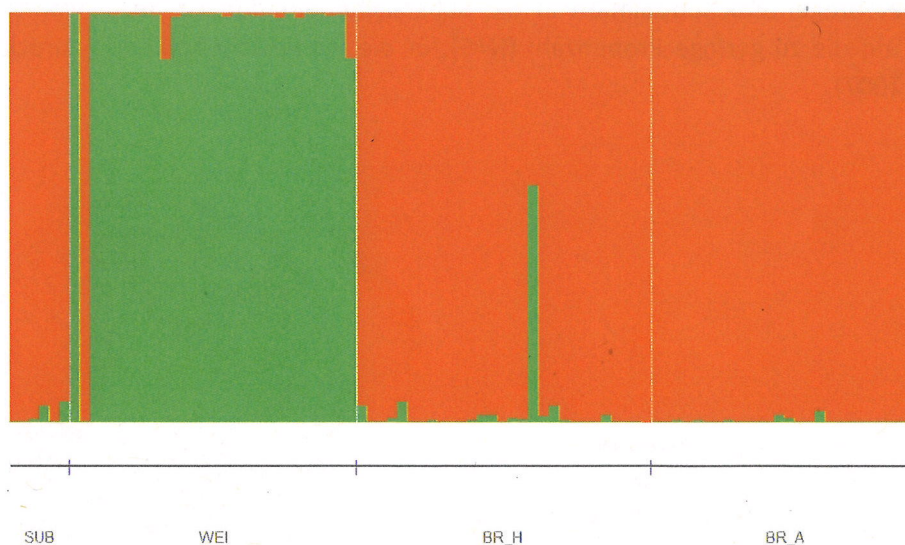
Population	FIS	P (zufälliger FIS $\geq$ beobachteter FIS)
Subersach (Hirtobel/Hittisau)	0.0909	0.2522
Weißsach (Zwing)	0.1415	0.0000
Bregenzerach (Hirschau)	0.0219	0.3265
Bregenzerach (Au)	0.0267	0.2757

Die populationsgenetische Differenzierung zwischen den einzelnen Populationen war in allen paarweisen Vergleichen signifikant, außer zwischen den beiden Populationen aus der Bregenzerach (Tabelle 4). Die Structure-Ergebnisse sind damit konsistent. Die Evanno-Methode zur Ermittlung der Anzahl an distinkten genetischen Clustern K ergab  $K = 2$  (Abbildung 1). Die Weißsachpopulation wird, mit der Ausnahme einer einzigen Probe, in der Structure-Analyse klar als distinkte Einheit aufgelöst, wohingegen die anderen Standorte im Wesentlichen einen genetischen Cluster bilden. Clustering basierend auf höheren Werten für K ( $K = 3$  &  $K = 4$ ) lieferten keine klaren Populationszuordnungen (Ergebnisse nicht graphisch dargestellt). Konsistente Ergebnisse lieferte auch die DAPC (Abbildung 2). Auch hier resultierte die Weißsachpopulation als ganz klar getrennt von den anderen Probenstellen. Allerdings wurde auch die Subersachpopulation als eigenständig erkannt. Die beiden Probenstellen aus der Bregenzerach (Hirschau, Au) überlappen allerdings vollständig.

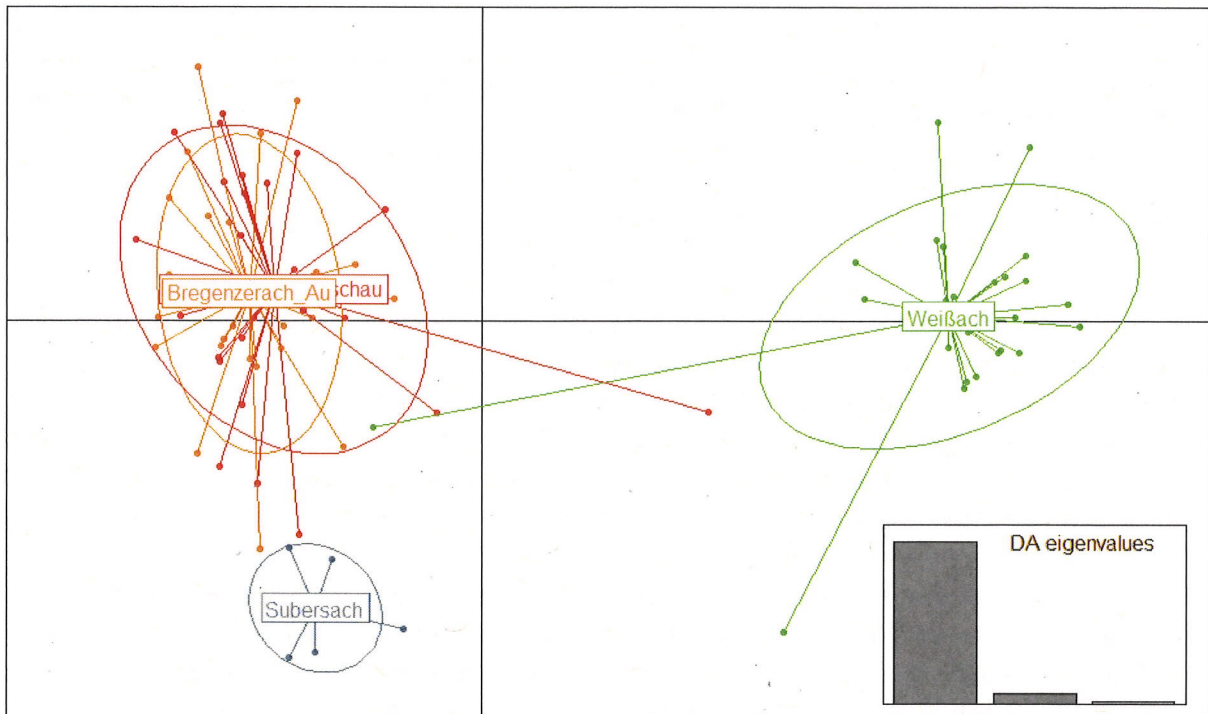
**Tabelle 4:** Paarweise Populationsdifferenzierung (FSTs) zwischen den 4 beprobten Populationen, basierend auf elf Mikrosatelliten

	Subersach	Weißsach	Hirschau
Weißsach	<b>0.3083</b>		
Hirschau	<b>0.0809</b>	<b>0.2829</b>	
Au	<b>0.0737</b>	<b>0.2768</b>	0.0037

Signifikante FSTs sind in fetter Schrift dargestellt.

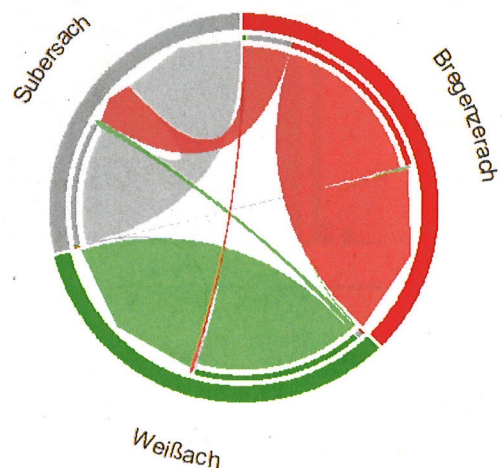


**Abbildung 1:** Individuelle Zuordnung der Proben zu den wahrscheinlichsten genetischen Clustern (unter der Annahme  $K = 2$ ). SUB, Subersach (Zwing); WIE, Weißsach (Hirtoble/Hittisau); BR\_H, Bregenzerach (Hirschau); BR\_A, Bregenzerach (Au).



**Abbildung 2:** DAPC (basierend auf 11 Mikrosatelliten) der Koppen von vier Probenstellen.

Die ermittelten rezenten Migrationsraten (d.h. Genfluss zwischen Populationen; Abbildung 3) spiegeln die allgemeinen populationsgenetischen Muster wider. Prinzipiell scheint es kaum rezente Migration zwischen den einzelnen distinkten Populationen zu geben. Die Migrationsraten zwischen Populationen lagen bis auf eine Ausnahme zwischen 0.59% und 3.7%. Aufgrund der fehlenden populationsgenetischen Differenzierung wurden die beiden Probenstellen aus der Bregenzerach für diese Analyse als eine Population betrachtet. Die ausgesprochen hohe Migrationsrate von 25.88% ( $\pm 4.35\%$ ) aus der Bregenzerachpopulation in die Subersachpopulation ist höchstwahrscheinlich ein Artefakt, das auf die zu geringe Probenzahl ( $N=6$ ) für die Subersachpopulation zurückzuführen ist (Faubet et al. 2007).



**Abbildung 3:** Visualisierung der in BayesAss ermittelten rezenten Migrationsraten zwischen distinkten Populationen. Die vergleichsweise hohe Migration von der Bregenzerachpopulation in die Subersachpopulation ist wahrscheinlich ein Artefakt aufgrund der geringen Probenanzahl ( $N=6$ ) für die Subersachpopulation.

Die ermittelten effektiven Populationsgrößen ( $N_e$ ) für die Weißach und die Bregenzerach – Hirschau und Au gepoolt, da sie keine signifikante Populationsdifferenzierung zeigen und somit als eine Population betrachtet werden können – waren 48.1 (95%CI 26.8-140.4) und 148.4 (95%CI 76.0-790.7). Für die Subersach war die Probenanzahl nicht ausreichend für eine Berechnung von  $N_e$ . Ein signifikanter Heterozygotenüberschuss, und somit ein Hinweis auf eine drastische rezente Reduktion von  $N_e$ , konnte nicht festgestellt werden ( $p > 0.05$  für alle Populationen).

### Interpretation der Ergebnisse/Erkenntnisse

Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass die untersuchten Koppen aus dem Einzugsgebiet der Bregenzerach (4 Probenstellen) in drei distinkte Populationen fallen, die folgenden Gewässern bzw. Probenstellen entsprechen:

1. Subersach (Zwing)
2. Weißach (Hirtobel/Hittisau)
3. Bregenzerach (Hirschau plus Au)

Die klare populationsgenetische Differenzierung weist darauf hin, dass zwischen den drei Populationen derzeit kaum oder kein Genfluss stattfindet. Die Clustering-Ergebnisse in Structure und der DAPC deuten allerdings auf ein geringes Ausmaß an Genfluss (konsistent mit den Bayesass-Ergebnissen zu rezente Migrationsraten). So war z.B. ein Individuum aus der Weißachpopulation war ganz klar dem Bregenzerach-Cluster zugeordnet, und ein Individuum aus der Bregenzerach ist potentiell ein F1 Hybrid aus Fischen der Bregenzerach und der Weißach, oder stammt aus einer geographisch dazwischen liegenden Population. Dass die populationsgenetische Differenzierung zwischen der Subersachpopulation und den anderen Probenstellen signifikant war, ist erstaunlich und unerwartet, da die Probenanzahl ( $N = 6$ ) für die Subersach eigentlich zu gering war für klassische populationsgenetische Analysen. Da die Subersachpopulation in der Structure-Analyse nicht als eigenständige Einheit erkannt wurde, liegt am zugrunde liegenden Modell, das eine ausreichend große Probenzahl je Population benötigt, um die Populationsallelfrequenzen verlässlich abschätzen zu können, eine wichtige Grundlage für die Identifizierung von genetischen Clustern in Structure (Pritchard et al. 2000). Geographisch liegt die Subersach zwischen der Weißach und den beiden Probestellen aus der Bregenzerach, weshalb das beobachtete Clustering in Structure aufgrund der geringen Probenzahl so zu erwarten gewesen ist.

Angesichts der geographischen Distanzen und der hydrologischen Gegebenheiten ist dieses Ergebnis erwartbar und entspricht den Befunden anderer Studien an Koppen, die ebenfalls zum Teil hohe Levels an populationsgenetischer Differenzierung innerhalb eines Flusssystemes zeigen (vgl. Hänfling et al. 2002, Hänfling & Weetman 2006, Vonlanthen et al. 2007, Junker et al. 2012, Thaler 2021). Querbauten, die als Migrationsbarriere fungieren, haben eine bedeutende Auswirkung auf die Konnektivität und den Grad der genetischen Differenzierung zwischen Fischpopulation. Dies konnte – in unterschiedlichem Ausmaß - bereits für einige europäische Fischarten gezeigt werden, z.B. Aitel (*Squalius cephalus*) (Gousskov et al. 2016), Dreistacheliger Stichling (*Gasterosteus aculeatus*), Schmerle (*Barbatula barbatula*), Blaubandbärbling (*Pseudorasbora parva*) (Deflem et al. 2022), Schwarzmaulgrundel (*Neogobius melanostomus*) (McCallum et al. 2025), oder auch Koppen (Hänfling & Weetman 2006, Junker et al. 2012). In Systemen, in denen anthropogen bedingte Barrieren Genfluss zwischen (Sub-)Populationen reduzieren, kommt es zum Teil sehr rasch zu deutlicher populationsgenetischer Differenzierung (McCallum et al. 2025).

Im Fall der Bregenzerach und ihrer Zuflüsse ist der Einfluss von Querbauten auf die Populationsstruktur der Koppen jedoch unklar. Einerseits zeigen unsere Ergebnisse eine deutliche genetische Differenzierung zwischen der Weißach, Subersach und der Bregenzerach, die alle durch verschiedene Querbauten getrennt sind. Andererseits zeigen die Probenstellen innerhalb der Bregenzerach (Hirschau und Au) keine genetische Differenzierung, trotz vorhandener (wenn auch kleiner) Querbauten, die theoretisch ebenfalls als Migrationsbarrieren fungieren könnten. Es bleibt daher fraglich, ob die beobachteten Differenzierungen auf Isolation by Distance oder tatsächlich auf die Auswirkungen der Querbauten zurückzuführen sind. Weitere Untersuchungen in kleineren geographischen Abständen zwischen den Probenstellen wären erforderlich, um diese Frage zu beantworten.

In kleinen Populationen führt genetische Drift oft rasch zu einer zunehmenden genetischen Divergenz zwischen den Populationen (Allendorf et al. 2013) und einer höheren Wahrscheinlichkeit für Inzucht und den damit assoziierten (oft) negativen Effekten auf die Population. Der Inzuchtkoeffizient FIS war in der Weißachpopulation signifikant positiv, was auf eine erhöhte Inzucht in dieser Population hinweist. Ein positiver FIS-Wert deutet darauf hin, dass verwandte Individuen häufiger miteinander verpaart sind, als es bei einer randomisierten Paarung der Fall wäre. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass diese Population an zwei von elf untersuchten Mikrosatellitenloci ein signifikantes Heterozygotendefizit aufwies. Ein solches Defizit ist typisch für eine reduzierte genetische Vielfalt, die durch eine erhöhte Verpaarung von verwandten Individuen, also Inzucht, verursacht wird. Trotz des signifikanten Inzuchtsignals und des Heterozygotendefizits war die genetische Diversität der Weißachpopulation jedoch ähnlich hoch wie die der Population(en) aus der Bregenzerach. Dies könnte darauf hinweisen, dass, trotz der Inzucht, die Weißachpopulation relativ gut erhaltene genetische Vielfalt besitzt, möglicherweise aufgrund der ursprünglichen Größe und Vielfalt der Population oder aufgrund von (nicht notwendigerweise rezenter) Genfluss aus benachbarten Populationen. Die Subersachpopulation wies eine zu geringe Probenanzahl auf, um im Hinblick auf ihre genetische Diversität mit den anderen untersuchten Populationen verglichen zu werden. Eine größere Stichprobe wäre erforderlich, um eine aussagekräftige Analyse zur genetischen Struktur und Diversität dieser Population zu ermöglichen.

Unsere Daten zeigen keinen Hinweis auf einen drastischen rezenter genetischen Bottleneck. Das bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass die Populationsgrößen in der jüngeren Vergangenheit stabil waren oder sogar zugenommen haben. Ein Populationseinbruch (Bottleneck) führt in der Regel zu einem raschen Verlust seltener Allele, während die Heterozygotie vergleichsweise langsamer abnimmt, da vor allem von der Häufigkeit der Allele und weniger von deren Anzahl abhängt. Daher tritt unmittelbar nach einem Bottleneck ein vorübergehendes Ungleichgewicht auf, bei dem die beobachtete Heterozygotie höher ist als die unter Mutations-Drift-Gleichgewicht erwartete. Dieses Phänomen wird als Heterozygotenüberschuss bezeichnet (Cornuet & Luikart 1996). Ein signifikanter Überschuss an Heterozygotie über mehrere Loci hinweg gilt dabei als Hinweis auf einen rezenter Bottleneck, bevor sich die Allelfrequenzen wieder stabilisieren (Cornuet & Luikart 1996). Somit deuten unsere Daten auf eine rezente Verringerung der Populationsgröße in der Weißach hin. Dieser Rückgang scheint allerdings nicht stark genug gewesen zu sein (oder die Anzahl der Loci zu gering) oder zu weit zurück zu liegen (mehr als in paar wenige Generationen) um mittels des Bottleneck-Tests detektiert werden zu können (Cornuet & Luikart 1996; Hoban et al. 2013).

Mit ermittelten effektiven Populationsgrößen  $N_e$  von 48.1 (95%CI 26.8-140.4) für die Weißachpopulation und 148.4 (95%CI 76.0-790.7) für die Bregenzerachpopulation sind diese beiden Koppenpopulationen als sehr klein bis klein anzusehen; für die die Subersachpopulation war die Probenzahl zu gering für eine verlässliche Abschätzung von  $N_e$ . Die effektive Populationsgröße ist einer der wichtigsten Parameter in der Populationsgenetik und Naturschutz-Biologie. Sie stellt die Größe einer idealisierten Population dar, die die gleiche Rate and Verlust von genetischer Diversität aufweist,

wie die untersuchte Population. Sie ist ein Maß für die genetische Diversität in einer Population/Art und ein aussagekräftiger Parameter über die Überlebensfähigkeit einer Population oder Art als die tatsächliche Anzahl an Individuen in einer Population oder Art. Üblicherweise ist  $N_e$  deutlich geringer als die tatsächliche Anzahl an Individuen in einer Population/Art (Frankham 1995). Ein Vergleich der von uns ermittelten  $N_e$  für die beiden Koppenpopulationen in der Weißsach und der Bregenzerach mit den üblichen Thresholds für  $N_e$  im Natur-/Artenschutz, z.B. der 50/500-Regel, lässt einige Rückschlüsse über die langfristige Überlebensfähigkeit dieser Vorkommen zu. Allgemein geht man davon aus, dass eine  $N_e > 50$  notwendig ist um ein kurzfristiges Aussterben aufgrund von Inzuchtdepression zu verhindern, aber eine  $N_e > 500$  vonnöten ist um langfristig das adaptive Potential, d.h. die Anpassungsfähigkeit an sich ändernde Umweltbedingungen, zu erhalten (Franklin 1980). Über die allgemeine Anwendbarkeit dieser Regel besteht allerdings Uneinigkeit. Einige Wissenschaftler argumentieren jedoch, dass die 50/500-Regel nicht ausreichend sei und auf 100/1000 erhöht werden sollte (Frankham et al. 2014). Die effektive Populationsgröße der Koppen in den beiden Bächen weist somit in jedem Fall auf eine unmittelbare Gefährdung hin (unter den gegenwärtigen Bedingungen); das langfristige Überleben des Bestands hängt wohl davon ab, dass die (effektive) Populationsgröße langfristig deutlich erhöht werden kann, z.B. durch Wiederherstellung der Durchgängigkeit von gegenwärtigen Migrationsbarrieren. Falls sich die Situation in der Zukunft weiter verschlechtert, kann/sollte u.U. durchaus auch über Einbringung einzelner Individuen aus anderen Populationen nachgedacht werden (genetic rescue-Effekt; Hedrick & Fredrickson 2010; Whiteley et al. 2015).

### **Weiterer Forschungsbedarf und Handlungsempfehlungen**

Um eine positive Langzeitperspektive für die Koppenpopulationen im Einzugsgebiet der Bregenzerach sicherzustellen, ist es erforderlich, die populationsgenetische Struktur und Habitatnutzung weiter zu untersuchen, insbesondere im Hinblick auf den Einfluss anthropogener Barrieren und die Konnektivität zwischen den verschiedenen (Sub-)Populationen. Weitere Studien mit größeren Stichprobengrößen, insbesondere in den Subersach- und Weißsachpopulationen, aber auch in weiteren Zubringern und über zusätzliche Probenstellen entlang des gesamten Verlaufs der Bregenzerach, wären notwendig, um fundierte, evidenzbasierte Managementmaßnahmen entwickeln zu können, die das gesamte Einzugsgebiet der Bregenzerach umfassen. Die im Rahmen der aktuellen Studie gewonnenen Daten reichen hierfür (noch) nicht aus. Zudem könnte die Wiederherstellung der Durchgängigkeit – etwa durch die Ermöglichung der Passage von Querbauten – den Genfluss zwischen den Populationen ermöglichen, wodurch die genetische Vielfalt langfristig stabilisiert und die Überlebensfähigkeit der Koppenpopulationen im Einzugsgebiet der Bregenzerach nachhaltig gesichert werden könnte.

### **Literatur:**

Allendorf F., Luikart G, Aitken SN. 2013. Conservation and the Genetics of Populations (2nd ed.). Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, USA.

Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false Discovery rate: a practical and powerful approach for multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B* 57, 289-300.

Cornuet J-M, Luikart G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144, 2001-2014.

Deflem IS, Calboli FCF, Christiansen H, Hellemans B, Raeymaekers JAM, Volckaert FAM. 2022. Contrasting population genetic response to migration barriers in two native and invasive freshwater fish. *Evolutionary Applications* 15, 2010-2027.

Do C, Waples RS, Peel D, Macbeth GM, Tillett BJ, Ovenden JR. 2014. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size ( $N_e$ ) from genetic data. *Molecular Ecology Resources* 14: 209-214.

Englbrecht CC, Largiadèr CR, Hänfling B, Tautz D. 1999. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the European bullhead *Cottus gobio* L. (Osteichthyes) and their applicability to related taxa. *Molecular Ecology* 8, 1966-1969.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611-2620.

Excoffier L, Lischer HE. 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.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2003. Inference of population structure: extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587.

Faubet P, Waples RS, Gaggiotti OE. 2007. Evaluating the performance of a multilocus Bayesian method for the estimation of migration rates. *Molecular Ecology* 16, 1149-1166.

Francis RM. 2017. POPHELPER: an R package and web app to analyse and visualize population structure. *Molecular Ecology Resources* 17, 27-32.

Frankham R. 1995. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetical Research* 66: 95-107.

Frankham R, Bradshaw CJA, Brooks BW. 2014. Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation* 170: 56-63.

Franklin IR. 1980. Evolutionary change in small populations. In: Soulé ME, Wilcox BA (eds), *Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 135-149.

Gilbert KJ, Whitlock MC. 2015. Evaluating methods for estimating local effective population size with and without migration. *Evolution* 69, 2154-2166.

Gousskov A, Reyes M, Wirthner-Bitterlin L, Vorburger C. 2016. Fish population genetic structure shaped by hydroelectric power plants in the upper Rhine catchment. *Evolutionary Applications* 9, 394-408.

Gu Z, Gu L, Eils R, Schlesner M, Brors B. 2014. Circlize implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics* 20, 2811-2812.

Hänfling B, Hellemans B, Volckaert FAM, Carvalho GR. 2002. Late glacial history of the cold-adapted freshwater fish *Cottus gobio*, revealed by microsatellites. *Molecular Ecology* 11, 1717-1729.

Hänfling B, Weetman D. 2006. Concordant genetic estimators of migration reveal anthropogenically enhanced source-sink population structure in the river sculpin. *Genetics* 173, 1487-1501.

Hedrick PW, Fredrickson RJ. 2010. Genetic rescue guidelines with examples from Mexican wolves and Florida panthers. *Conservation Genetics* 11: 615-626.

Hoban SM, Gaggiotti OE, Bertorelle G. 2013. The number of markers and samples needed for detecting bottlenecks under realistic scenarios, with and without recovery: a simulation-based study. *Molecular Ecology* 22: 2444-2450.

Jombart T, Devillard S, Balloux F. 2010. Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11: 94.

Jombart T, Ahmed I. 2011. adegenet 1.3.1: New tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 27: 3070-3071.

Junker J, Peter A, Wagner CE, Mwaiko S, Germann B, Seehausen O, Keller I. 2012. River fragmentation increases localized population genetic structure and enhances asymmetry of dispersal in bullhead (*Cottus gobio*). *Conservation Genetics* 13, 545-556.

Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, Mayrose I. 2015. CLUMPAK: a program for identifying clustering models and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources* 15, 1179-1191.

Kottelat M, Freyhof J. 2007. Handbook of European Freshwater Fishes. Publications Kottelat: Cornol, Schweiz.

Kuhner MK. 2009. Coalescent genealogy samplers: windows into population history. *Trends in Ecology and Evolution* 24, 86-93.

Lienhard A, Schäffer S. 2019. Extracting the invisible: obtaining high quality DNA is a challenging task in small arthropods. *PeerJ* 7: e6753.

McCallum ES, Sefc KM, Brodin T, Burkhardt-Holm P, Bussmann-Charran K, Florin A-B, Geist J, Janáč M, Jurajda P, Martin JM, Pander J, Bose APH. 2025. Round goby population differentiation across river barriers in Central Europe. *Aquatic Invasions* 20, 355-370.

Meirmans PG. 2014. Nonconvergence in Bayesian estimation of migration rates. *Molecular Ecology Resources* 14, 726-733.

Nolte AW, Stemshorn KC, Tautz D. 2005. Direct cloning of microsatellite loci from *Cottus gobio* through a simplified enrichment procedure. *Molecular Ecology Notes* 5, 628-636.

Piry S, Luikart G, Cornuet J-M. 1999. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90, 502-503.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.

Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67, 901-904.

Spiegelhalter DJ, Brest NG, Carlin BP, Van der Linde A. 2002. Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Statistical Methodology)* 64, 583-639.

Thaler M. 2021. Population genetic analyses of selected bullhead population (*Cottus gobio*; Telostei: Cottidae) in regard to migration barriers. Masterarbeit, Universität Innsbruck.

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535-538.

Villsen K, Corse E, Archambaud S, Suard G, Héran K, Megléc E, Ereskovsky AV, Chappaz R, Dubut V. 2022. Die metabarcoding reveals extensive dietary overlap between two benthic stream fishes (*Zingel asper* and *Cottus gobio*) and provides insights into their coexistence. *Diversity* 14, 412.

Vonlanthen P, Excoffier L, Bittner D, Persat H, Neuenschwander S, Largiadèr CR. 2007. Genetic analysis of potential postglacial watershed crossings in Central Europe by the bullhead (*Cottus gobio* L.). *Molecular Ecology* 16, 4572-4584.

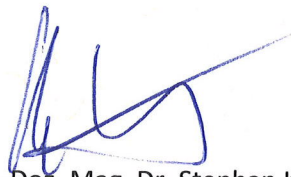
Waples RS, Do C. 2010. Linkage disequilibrium estimates of contemporary  $N_e$  using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications* 3, 244-262.

Weir B, Cockerham C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.

Whiteley AR, Fitzpatrick SW, Funk WC, Tallmon DA. 2015. Genetic rescue to the rescue. *Trends in Ecology & Evolution* 30: 42-49.

Wilson GA, Rannala B. 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163, 1177-1191.

Graz, 4.12.2025



Priv.-Doz. Mag. Dr. Stephan Koblmüller