

# **Eine Vorstudie über die genetische Diversität des Steinkrebse (*Austropotamobius torrentium*) im Kanton St. Gallen: Geografische Differenzierung und Fragmentierungseffekte**

Christoph Vorburger und Nicola Rhyner

*EAWAG, Abteilung Gewässerökologie, Überlandstrasse 133, 8600 Dübendorf*

## **Fragestellung**

Die einheimischen Flusskrebse sind in der Schweiz selten geworden durch Verlust oder Verschlechterung ihres Habitats, durch die Krebspest und durch Konkurrenz durch eingeschleppte Flusskrebse. Ein typisches Beispiel ist der Steinkrebs (*Austropotamobius torrentium*) der in der Roten Liste als 'bedroht' aufgeführt ist. Ursprünglich weit verbreitet in Gewässern der Nord-, Zentral- und Ostschweiz, ist er heute mehrheitlich auf Restpopulationen in den Oberläufen relativ kleiner Bächen beschränkt. Zudem sind solche Restpopulationen häufig von anderen Populationen isoliert, da viele Bäche im Unterlauf eingedolt oder mit künstlichen Hindernissen verbaut sind. Das hat mehrere unerwünschte Auswirkungen. Zum einen verhindern solche Hindernisse die Wiederbesiedlung von unten, wenn eine Population ausstirbt, z.B. durch ein lokales und temporäres Verschmutzungsereignis. So können durch die fehlende Vernetzung progressiv Restpopulationen verlorengehen, obschon die Gewässer (nach ihrer Erholung) als Lebensraum geeignet wären. Zum anderen führt die fehlende Zuwanderung längerfristig zu einer Erosion der genetischen Variabilität oder sogar zu lokaler Inzucht (abhängig von der Populationsgrösse), wie auch zu einer genetischen Differenzierung zwischen Restpopulationen. Allerdings muss auch gesagt werden, dass Hindernisse in manchen Fällen die Zuwanderung von nicht heimischen Krebsen verhindern können.

Um die Auswirkungen der Habitatfragmentierung auf die genetische Vielfalt und die Populationsstruktur zu untersuchen, sind genetische Marker mit hoher Variabilität und dadurch grosser Aussagekraft nötig. Für die Populationsgenetik im Dienste des Artenschutzes ('conservation genetics') sind sogenannte Mikrosatelliten die Marker der Wahl. Dabei handelt es sich um repetitive DNA Sequenzen, in denen ein kurzes Motiv von 2-5 Basenpaaren mehrfach wiederholt ist, z.B. CACACACACACACACA oder (CA)<sub>8</sub>. Sequenzen dieser Art haben eine hohe Mutationsrate, wodurch in einer Population meist mehrere Varianten (Allele) unterschiedlicher Länge vorkommen, also z.B. (CA)<sub>7</sub>, (CA)<sub>8</sub>, (CA)<sub>9</sub> & (CA)<sub>10</sub>. Diese Allele werden in normaler Mendel'scher Manier vererbt und eignen sich deshalb als populationsgenetische Marker. Solche Marker wären auch wünschenswert für die Planung von Umsetzungsmassnahmen zur Förderung des Steinkrebse. An sich geeignete Bäche, in denen die Steinkrebse aus irgend einem Grund verschwunden sind, könnten mit Individuen aus noch starken Populationen wiederbesiedelt werden. Dafür eignet sich aber nicht jede gesunde Population, denn man möchte die historisch gewachsene Populationsstruktur nicht durch Umsetzungsmassnahmen verändern. Auch zur Identifizierung geeigneter Quellpopulationen sind also populationsgenetische Daten erforderlich. Aus diesem Grund haben wir für den Steinkrebs neue Mikrosatelliten entwickelt und in einer Vorstudie ihre Aussagekraft an einer Stichprobe von Tieren aus dem Kanton St. Gallen getestet.

## Vorgehen

Die Mikrosatelliten-Sequenzen wurden nach der Methode von Abdelkrim et al. (2009) isoliert. Dafür wurde eine grosse Zahl zufälliger Stücke der DNA eines Steinkrebsees auf einem 'high-throughput' Sequenziergerät, der 454 GS-FLX platform (Roche, Switzerland) sequenziert. Die so erhaltenen Sequenzen wurden dann mit einem Computerprogramm auf Mikrosatelliten durchsucht, welches auch geeignete Primer für Amplifizierung dieser Mikrosatelliten mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestimmte. Wir testeten eine grosse Zahl solcher Primer an einer kleinen Stichprobe von 15 Tieren und verwendeten nur jene weiter, welche variable Mikrosatelliten mit klar interpretierbaren Mustern amplifizierten. Das waren leider nur wenige. Trotzdem erhielten wir so acht neue Mikrosatelliten-Marker. Weiter testeten wir, ob Mikrosatelliten, die bereits für die beiden Schwesterarten *A. pallipes* und *A. italicus* entwickelt wurden (Gouin et al. 2000; Pedraza-Lara et al. 2011), auch bei Steinkrebsen 'funktionierten'. Das war für vier Marker der Fall, wodurch uns nun insgesamt 12 Mikrosatelliten für populationsgenetische Untersuchungen an Steinkrebsen zur Verfügung stehen.

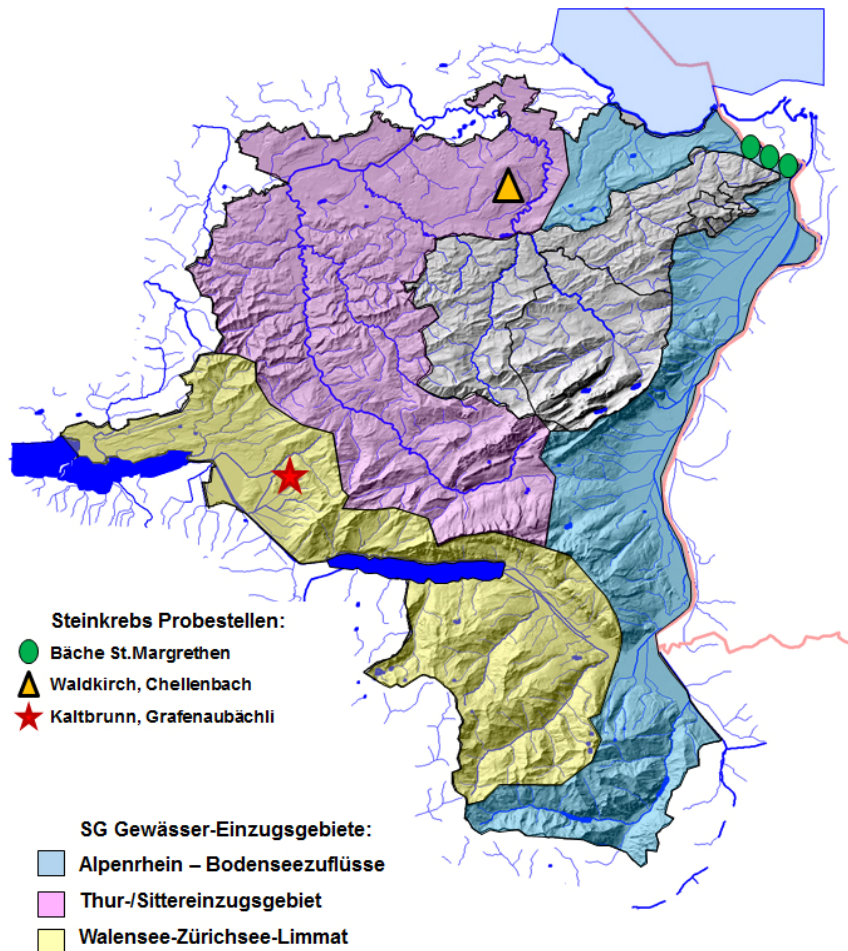
Um die Variabilität und Aussagekraft dieser genetischen Marker zu bestimmen, beprobten wir insgesamt 130 Steinkrebse aus fünf verschiedenen Bächen im Kanton St. Gallen (Tabelle 1, Abb. 1). Die drei Bäche in St. Margrethen entwässern alle via den Rheintaler Binnenkanal in den Bodensee und liegen sehr nahe beisammen. Sie sind unten verbaut, weshalb zu vermuten ist, dass ihre Steinkrebspopulationen seither voneinander isoliert sind. Die Proben aus diesen drei Bächen sollten zeigen, ob die Unterbrechung des Genflusses durch künstliche Hindernisse seit relativ kurzer Zeit mit unseren Markern nachweisbar ist. Der Chellenbach in Hohfirst entwässert via Sitter und Thur in den Rhein unterhalb des Bodensees, während des Grafenaubächli in Kaltbrunn in den Zürichsee entwässert. Zusammen mit den Populationen aus St. Margrethen decken sie drei Gebiete ab, die unterschiedlich entwässern und darum über lange Zeiträume keinen oder höchstens geringen genetischen Austausch erfuhren. Ihr Vergleich soll zeigen, ob unsere Marker auch geeignet sind, die historische Populationsstruktur abzubilden. Mit diesen drei Gebieten sind alle drei im 'Aktionsplan Flusskrebse Schweiz' vorgeschlagenen Genpool-Standorte abgedeckt, welche sich auf dem Gebiet des Kantons St. Gallen befinden. Schweizweit wurden für den Steinkrebs zehn solche Standorte vorgeschlagen (Stucki & Zaugg 2011).

**Tabelle 1.** Für die Vorstudie untersuchte Steinkrebs-Populationen

Bach	Dezimalkoordinaten	Stichprobengrösse
Romenschwandenbach, St. Margrethen	Br. 47.4565° Lä. 9.6143°	$n = 20$
Rätscherenbach, St. Margrethen	Br. 47.4553° Lä. 9.6181°	$n = 20$
Schutzmühlebach St. Margrethen	Br. 47.4511° Lä. 9.6264°	$n = 10$
Chellenbach, Hohfirst	Br. 47.4480° Lä. 9.3118°	$n = 37$
Grafenaubächli, Kaltbrunn	Br. 47.2149° Lä. 9.0017°	$n = 43$

Für die Beprobung wurden die Tiere bei Nacht oder bei Tag von Hand gefangen, worauf ihnen mit einer scharfen Schere einer der Pleopoden/Afterfüsse amputiert und in 100% Ethanol konserviert wurde. Bei sehr kleinen Tieren wurde statt eines Pleopoden eines der Schreitbeine (Pereiopode) als Gewebeprobe genommen. Die Steinkrebse wurden danach umgehend in ihr Gewässer zurückgesetzt. Im Molekularlabor wurde die DNA mit der

Aussalz-Methode aus den Gewebeprobe extrahiert (Sunnucks & Hales 1996) und für die Mikrosatelliten-Analyse verwendet. Die PCR Produkte wurden auf einem ABI 3130 Kapillarsequenzierer aufgetrennt und visualisiert, die Bestimmung der Allelgrößen erfolgte mit dem Computerprogramm GeneMapper. Für die populationsgenetischen Analysen Daten verwendeten wir die Computerprogramme Fstat (Goudet 2001) und Genepop (Rousset 2008).



**Abb. 1.** Standorte der fünf beprobten Bäche und ihrer Einzugsgebiete im Kanton St. Gallen.

## Ergebnisse

Zwei wichtige Voraussetzungen für populationsgenetische Marker sind ihre Unabhängigkeit und ihre Neutralität. Das ist nicht politisch gemeint ;-). Es bedeutet, dass die einzelnen Marker im Erbgut nicht gekoppelt sein und nicht unter natürlicher Selektion stehen sollten. Das scheint bei unseren Mikrosatelliten erfüllt zu sein, denn wir beobachteten keine signifikanten Kopplungs-Ungleichgewichte ('linkage disequilibrium'), und die beobachtete Heterozygotie war in den meisten Fällen nahe bei der erwarteten Heterozygotie (Tabelle 2), weshalb keine signifikanten Abweichungen vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht festgestellt wurden. Je einer der für die Schwesternarten *A. pallipes* und *A. italicus* entwickelten Mikrosatelliten wiesen nur ein Allel auf in unseren Steinkrebs-Proben. Wir haben sie trotzdem verwendet, weil sie in anderen Populationen vielleicht doch informativ sein könnten. Die anderen Mikrosatelliten zeigten in unserer Stichprobe zwischen 2 und 7 Allelen. Einer der neu entwickelten Marker, AT9, war schwierig zu interpretieren, weil die Primer neben dem eigentlichen Mikrosatelliten noch mindestens ein zusätzliches Produkt ähnlicher Grösse amplifizieren (evtl. eine Duplikation jener Region im Erbgut).

**Tabelle 2.** Anzahl Allele, erwartete und beobachtete Heterozygotie für die zwölf verwendeten Mikrosatelliten-Marker, basierend auf 130 Steinkrebsen aus fünf Populationen.

Locus	Anzahl Allele	Beobachtete Heterozygotie	Erwartete Heterozygotie
neu entwickelte Mikrosatelliten:			
AT1	3	0.503	0.506
AT9	2	0.210	0.213
AT22	2	0.225	0.226
AT23	3	0.422	0.423
AT37	7	0.489	0.558
AT40	2	0.273	0.258
AT43	2	0.381	0.371
AT52	2	0.254	0.240
für Schwesternarten entwickelte Mikrosatelliten:			
AP1	2	0.516	0.448
AP6	1	0.000	0.000
Aitali3	6	0.579	0.582
Aitali4	1	0.000	0.000

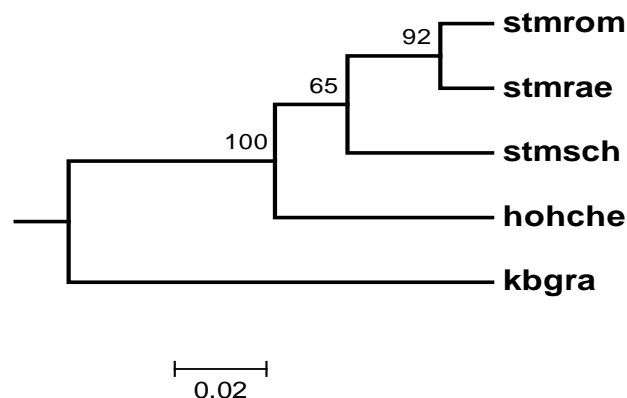
Die Allelfrequenzen der zwölf Mikrosatelliten unterschieden sich sehr deutlich zwischen den fünf Populationen, besonders zwischen den drei Entwässerungsgebieten. Diese genetische Differenzierung lässt sich mit sogenannten  $F_{ST}$ -Werten quantifizieren. Theoretisch können  $F_{ST}$ -Werte den Bereich von 0 (keine Differenzierung) bis 1 (vollständige Differenzierung) umfassen, doch erreichen sie in Praxis selten mehr als 0.5. Am stärksten differenziert von allen anderen Populationen ist jene des Grafenaubächlis in Kaltbrunn (Tabelle 3). Die  $F_{ST}$ -Werte zwischen dieser und den anderen Populationen liegen zwischen 0.28 und 0.37. Das sind sehr hohe Werte, die nur durch langfristig fehlenden Genaustausch erklärbar sind. Auch die Population des Chellenbaches in Hohfirst unterscheidet sich stark von allen anderen. Von den drei Populationen in St. Margrethen ist sie durch  $F_{ST}$ -Werte von immerhin noch 0.17 – 0.25 getrennt (Tabelle 3). Die Steinkrebse im Kanton St. Gallen zeigen also eine sehr starke geografische Populationsstruktur, die den historisch geringen Genfluss zwischen verschiedenen Entwässerungsgebieten reflektiert.

Überraschender ist, dass auch die Populationen aus drei sehr nahe beieinander liegenden Bächen in St. Margrethen signifikant und mit  $F_{ST}$ -Werten von 0.05 – 0.10 deutlich genetisch differenziert sind (Tabelle 3). Das deutet darauf hin, dass die Verbauungen im Unterlauf der Bäche deren Steinkrebs-Populationen tatsächlich voneinander isolieren, und dass der reduzierte oder sogar fehlende Genfluss seit der Entstehung der Hindernisse bereits zu einer erkennbaren genetischen Differenzierung zwischen den Populationen geführt hat. Um diese Interpretation zu bestätigen, sollten zum Vergleich auch Steinkrebse aus Bächen beprobt werden, die ähnlich nahe beisammen liegen, jedoch nicht durch künstliche Hindernisse isoliert sind. Die Erwartung wäre, dass bei solchen Populationen die Differenzierung gering ist oder gänzlich fehlt.

**Tabelle 3.** Paarweise  $F_{ST}$ -Werte als Mass für die genetische Differenzierung zwischen den fünf beprobten Steinkrebs-Populationen. Alle Werte sind statistisch signifikant ( $P < 0.005$ ). Abkürzungen: stmrom = St. Margrethen; Romenschwandenbach, stmrae = St. Margrethen, Rätcherenbach; stmsch = St. Margrethen, Schutzmühlebach; hohche = Hohfirst, Chellenbach; kbgra = Kaltbrunn, Grafenaubächli.

	stmrom	stmrae	stmsch	hohche	kbgra
stmrom					
stmrae	0.0543				
stmsch	0.1011	0.0927			
hohche	0.1870	0.1705	0.2504		
kbgra	0.2896	0.2863	0.3215	0.3643	

Stellt man die Verwandtschaftsverhältnisse der fünf untersuchten Steinkrebspopulationen grafisch als Stammbaum dar, zeigt sich die auf Grund der geografischen Verhältnisse zu erwartende Struktur (Abbildung 2). Am ähnlichsten sind sich die benachbarten Populationen in St. Margrethen, die bereits deutlich getrennt sind von jener in Hohfirst und noch deutlicher von der Population in Kaltbrunn, die auch geografisch und hydrologisch am entferntesten ist.



**Abbildung 2.** Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen der fünf untersuchten Steinkrebs-Populationen als Stammbaum. Distanzmass: Nei's  $D_A$ . Konstruktionsmethode: UPGMA.

### Folgerungen

Diese Vorstudie zeigte, dass die neu entwickelten oder von Schwesterarten übernommenen Mikrosatelliten-Marker geeignet sind, sowohl die historisch entstandene geografische Populationsstruktur des Steinkrebsses abzubilden, als auch reduzierten Genfluss durch künstliche Habitatfragmentierung nachzuweisen. Damit steht nun ein Werkzeug zur Verfügung, den Steinkrebs informierter und gezielter zu erhalten oder sogar zu fördern. Die Marker erlauben es zum Beispiel, den Vernetzungsgrad der verbleibenden Populationen zu messen, Populationen mit noch hoher genetischer Vielfalt zu identifizieren, oder sinnvolle Herkunftspopulationen für Wiederbesiedlungen zu bestimmen.

Die beobachtete Variabilität an den einzelnen Markern ist mit 1 - 7 Allelen (durchschnittlich 2.75) vergleichsweise gering. Das könnte daran liegen, dass wir uns in der Schweiz am westlichen Rand des Verbreitungsgebietes des Steinkrebse befinden. Marginale Populationen weisen bei vielen Arten eine geringere genetische Diversität auf als Populationen in Zentrum des Verbreitungsgebietes (Eckert *et al.* 2008). Das bleibt aber mit entsprechenden Proben zu überprüfen. Trotz der geringen Variabilität ist die Aussagekraft der Mikrosatelliten ausreichend, da die Allelfrequenzen relativ ausgeglichen sind bei den Loci mit wenigen Allelen (Daten nicht gezeigt). Die Aussagekraft wäre deutlich geringer, wenn jeweils ein Allel sehr häufig und alle anderen sehr selten wären, was zum Glück nicht der Fall ist.

Die Datengrundlage ist mit nur fünf beprobten Populationen natürlich schmal. Trotzdem lassen sich unserer Ansicht nach bereits zwei anwendungsrelevante Schlüsse aus dieser Vorstudie ziehen:

(1) Der Steinkrebs weist im Kanton St. Gallen (und wohl auch anderswo) eine ausgeprägte geografische Populationsstruktur auf. Die starke Differenzierung zwischen verschiedenen Abflussgebieten deutet darauf hin, dass diese Struktur historisch gewachsen ist. Umsetzungsaktionen sollten darum möglichst zwischen Populationen im gleichen Einzugsgebiet erfolgen, wenn man auf die historische Populationsstruktur Rücksicht nehmen will.

(2) Die Fragmentierung ihrer natürlichen Gewässer durch künstliche Hindernisse führt zu einer genetischen Isolation der Restpopulationen des Steinkrebse, die zu einer messbaren genetischen Differenzierung sogar zwischen sehr nahe liegenden Populationen führt. Dem könnte mit Renaturierungsmassnahmen entgegengewirkt werden, welche solche Restpopulationen wieder vernetzen. Allerdings ist dabei abzuwägen, ob das Entfernen künstlicher Hindernisse nicht auch die Einwanderung eingeschleppter Krebse erleichtert, was natürlich auch eine (vielleicht sogar grössere) Gefahr für die Steinkrebse darstellt.

## Dank

Wir bedanken uns beim Amt für Natur, Jagd und Fischerei des Kantons St. Gallen für die Fangbewilligung und bei Michael Kugler für die Hilfe beim Beprobieren des Chellenbachs. Hanna Hartikainen und die Firma ecogenics GmbH leisteten wertvolle Hilfe bei der Entwicklung der genetischen Marker.

## Literatur

Abdelkrim J, Robertson BC, Stanton JAL, Gemmill NJ (2009) Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques* **46**, 185-191.

Eckert CG, Samis KE, Lougheed SC (2008) Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology* **17**, 1170-1188.

Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).

Gouin N, Grandjean F, Souty-Grosset C (2000) Characterization of microsatellite loci in the endangered freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Astacidae) and their potential use in other decapods. *Molecular Ecology* **9**, 636-637.

Pedraza-Lara C, Gonzalez EG, Bloor P, Doadrio I (2011) Isolation and characterization of novel polymorphic microsatellite loci for the white-clawed crayfish, *Austropotamobius italicus* (Faxon, 1914). *Molecular Ecology Resources* **11**, 586-589.

Rousset F (2008) GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-106.

Stucki P, Zaugg B (2011) *Aktionsplan Flusskrebse Schweiz. Artenförderung von Edelkrebs, Dohlenkrebs und Steinkrebs*. Bundesamt für Umwelt, Bern.

Sunnucks P, Hales DF (1996) Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Biology and Evolution* **13**, 510-524.