

## Phylogeographie, Artbildung und postpleistozäne Einwanderung mitteleuropäischer Reptilien

ULRICH JOGER<sup>1</sup>, DANIELA GUICKING<sup>2</sup>, SVETLANA KALYABINA-HAUF<sup>3</sup>, PETER LENK\*,  
ZOLTAN T. NAGY<sup>4</sup> & MICHAEL WINK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Staatliches Naturhistorisches Museum, Pockelsstr. 10, D-38179 Braunschweig, ulrich.joger@snhm.niedersachsen.de; <sup>2</sup>Universität Kassel, FB1, Systematik und Morphologie der Pflanzen, Heinrich-Plett Str. 40, D-34132 Kassel, guicking@uni-kassel.de; <sup>3</sup>Institut für Pharmazie und molekulare Biotechnologie, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 364, D-69120 Heidelberg, wink@uni-hd.de; <sup>4</sup>HAKI, Anna liget 8., H-5540 Szarvas, Ungarn, lustimaci@yahoo.com.

\*Wir widmen diese Arbeit unserem Freund und Mitautor PETER LENK,  
der am 23.11.2005 im Alter von 41 Jahren verstarb.

### Phylogeography, speciation and post Pleistocene invasion of central European reptiles

A phylogeographic analysis of 7 species complexes of European reptiles was executed using different molecular methods. While mitochondrial genes (here mainly cytochrome b sequences) enabled us to draw conclusions about phylogeographic history and differentiation, the additional application of bisexually inherited markers was helpful to determine which stage had been reached in speciation. As species with similar distribution patterns in southern and central Europe had been selected, matching phylogeographic branching patterns could be used to draw some general conclusions:

- Highest genetic diversity among the analyzed species complexes was observed in their representatives in southern Europe, the Near East and the Caucasus. Obviously the differentiation took place in the Pleistocene refugia.
- The species complexes were found in different stages of speciation. In some cases, cryptic species could be detected.
- Evidence for multiple range retractions and expansions, which were postulated for the times of Pleistocene climatic oscillations, could be found in the Balkans, but in Central Europe their traces have been wiped out. Only the Holocene invasion has left imprints in the genomes from this area.
- The Balkans and the Pontic region were the origins of active invaders into Central and Northern Europe.
- Groups from the Iberic and Apennine peninsulas rarely conquered other regions. This limitation can be attributed to the barrier function of the Pyrenees and the Alps.

**Key words:** *Emys*, *Lacerta*, *Elaphe*, *Hierophis*, *Natrix*, phylogeography, phylogeny, taxonomy, Pleistocene refugia, colonization.

### Zusammenfassung

Sieben Artenkomplexe europäischer Reptilien wurden einer phylogeographischen Analyse unterzogen, wobei verschiedene molekulargenetische Methoden eingesetzt

wurden. Während mitochondriale Gene (hier vor allem Cytochrom b Sequenzen) weit reichende Aussagen über die phylogeographische Differenzierungsgeschichte zuließen, war der zusätzliche Einsatz bisexuell vererbter Marker hilfreich bei der Entscheidung, welches Stadium die Speziationsprozesse bereits erreicht haben. Da Arten mit ähnlichen Verbreitungsmustern in Süd- und Mitteleuropa gewählt wurden, konnten übereinstimmende phylogeographische Verzweigungsmuster genutzt werden, einige allgemeine Schlussfolgerungen zu ziehen:

- Die höchste genetische Diversität der untersuchten Artenkomplexe wird bei ihren Vertretern in Südeuropa, Kleinasien und im Kaukasus erreicht. Die Differenzierung erfolgte offenbar in den pleistozänen Refugialräumen.
- Die Speziationsprozesse sind unterschiedlich weit fortgeschritten. In einigen Fällen konnten bereits kryptische Arten erkannt werden.
- Multiple Arealretraktionen und -expansionen während der pleistozänen Klimaschwankungen sind zu postulieren und auf dem Balkan auch nachweisbar, aber in Mitteleuropa sind ihre Spuren verwischt; erst die holozäne Invasion ist dort genetisch präsent.
- Der Balkan und die Pontische Region waren Ursprungsregionen aktiver Einwanderer nach Mittel- und Nordeuropa.
- Gruppen von der Iberischen und der Apenninhalbinsel eroberten nur selten andere Regionen. Die Barrierefunktion der Pyrenäen und der Alpen dürfte hierfür verantwortlich sein.

**Schlüsselbegriffe:** *Emys*, *Lacerta*, *Elaphe*, *Hierophis*, *Natrix*, Phylogeographie, Phylogenie, Taxonomie, pleistozäne Refugien, Ausbreitung.

## 1 Einleitung

Phylogeographie ist eine verhältnismäßig neue Disziplin innerhalb der Biologie. Sie verbindet über die Klammer molekulargenetischer Methodik (Markeranalysen) Fragestellungen der Populationsgenetik, Evolutionsforschung und Biogeographie miteinander und erforscht die genetische Differenzierung (Mikroevolution) von Arten in Zeit und Raum (AVISE et al. 1987). Oberhalb des Artniveaus geht Phylogeographie in Phylogenetik über.

Klassische tiergeographische Differenzierungsmodelle stellen immer wieder hypothetische Zusammenhänge zwischen der Artbildung bei europäischen Tierarten und den pleistozänen Klimaschwankungen her. In Kaltzeiten (Glazialen) werden für thermophile Arten Refugialräume im Mittelmeerraum bzw. in der pontischen oder kaspischen Region postuliert; die postpleistozäne (Wieder-) Einwanderung nach Mitteleuropa wäre dann aus unterschiedlichen Refugien – von Südwesten und von Südosten her – erfolgt (TABERLET et al. 1998). Ost-West-Artenpaare wie Nebelkrähe (*Corvus corone cornix*) – Rabenkrähe (*C. c. corone*) oder Rotbauch- (*Bombina bombina*) und Gelbbauchunke (*B. variegata*) scheinen diesem Muster zu folgen.

Molekulargenetische Methoden ermöglichen es, solche phylogeographischen Hypothesen zu überprüfen. Da genetische Marker, wie z. B. mitochondriale Gensequenzen, bei Tierarten einer Verwandtschaftsgruppe eine relativ einheitliche Differenzierungsgeschwindigkeit aufweisen, ist zu erwarten, dass gleiche Außenfaktoren, wie z. B. Klimaschwankungen, in ähnlichen phylogeographischen Mustern resultieren. Unser Ziel war es, die phylogeographische Differenzierung europäischer Reptilien zu klären.

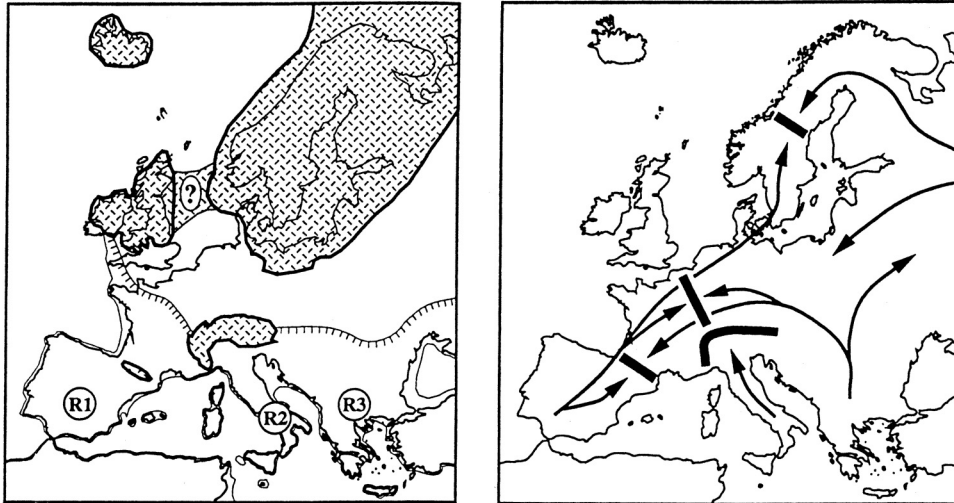


Abb. 1: Hypothetische eiszeitliche Refugialräume und postglaziale (Wieder-) Einwanderungsrouten in Europa, nach TABERLET et al. (1998). A) Die drei Hauptrefugialräume in Südeuropa (R1 bis R3, weitere werden in der pontischen und der kaspischen Region postuliert). Eingezeichnet sind die Südgrenze des Permafrostbodens sowie die Eisbedeckung während des Höhepunkts des letzten Glazials, 20000–18000 Jahre vor heute. B) Postulierte postglaziale Haupteinwanderungsrouten nach Mittel- und Nordeuropa, Zonen des Aufeinandertreffens unterschiedlicher Einwanderungswellen (schwarze Balken) und Ausbreitungsbarrieren (Pyrenäen, Alpen).

Hypothetical glacial macro refugia and post glacial (re-)colonisation routes in Europe, from TABERLET et al. (1998). A. The 3 main refugial areas in southern Europe (R1–R3; others have been postulated in the Pontic and Caspian regions). The map shows the southern border of permafrost soil and ice coverage at the maximum of the last glacial, 20,000 to 18,000 y.b.p. B. Postulated main post glacial colonisation routes into central and northern Europe, zones of contact between different immigration routes (black bars) and mountain barriers (Pyrenees, Alps).

Im Rahmen des DFG-Projekts »Phylogeographie thermophiler Reptilien Mitteleuropas« (DFG-Aktenzeichen Jo 134/7 und Wi 319/18) wurden mehrere Artenkomplexe einer umfassenden phylogeographischen Analyse unterzogen: Die europäische Sumpfschildkröte, *Emys orbicularis*, die Wassernattern der Gattung *Natrix*, die Gelbgrüne Zornnatter, *Hierophis viridiflavus*, die Äskulapnattern des *Elaphe longissima*-Komplexes, die Smaragdeidechsen, *Lacerta viridis/bilineata* und die Zauneidechse, *Lacerta agilis*. Ergänzende Daten aus Zentralasien wurden im Rahmen des DFG-Projekts »Statusbestimmung der Herpetofauna im Aralsee-Becken« (Jo 134/9) gewonnen.

Ein vergleichender Ansatz mit mehreren Arten, die sowohl Gemeinsamkeiten (z. B. ein ähnliches tiergeographisches Verbreitungsmuster und in Mitteleuropa die Beschränkung auf besonders warme Regionen) als auch Unterschiede (z. B. aquatische/terrestrische Lebensweise, unterschiedliche taxonomische Stellung) aufweisen, soll Korrelationen zwischen phylogeographischen Differenzierungsmustern und der Geschichte der Arten und ihrer Lebensräume (also der Ursachen der Differenzierung) aufdecken. Wenn zwei Artenkomplexe ein ähnliches räumlich-genetisches Muster aufweisen, wird zu fragen sein, inwieweit intrinsische Gemeinsamkeiten dieser Arten (gemeinsamer Ursprung, gleiche Evolutionsrate, ähnliche Nischenbildung) ursächlich für dieses Muster sind, und inwieweit extrinsische (geographische und Umwelt-) Faktoren des Landschaftsraums prägend waren.

Die Artenkomplexe sind so ausgewählt worden, dass ähnliche phylogeographische Muster zu erwarten sind. Angestrebt wird, aus diesen Mustern allgemeine Aussagen über tiergeographisch wirksame Barrieren des Pleistozäns, über Refugialräume und über postpleistozäne Wanderungsrouten abzuleiten.

Im Rahmen des Projektes wurden mehrere Dissertationen angefertigt (LENK 1997, KALYABINA-HAUF 2003, GUICKING 2004, NAGY 2004).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialbeschaffung

Blutproben wurden den Tieren im Freiland oder im Terrarium (bei Terrarientieren nur, wenn ein eindeutiger Fundort bekannt war) aus der Schwanzvene entnommen (JÖGER & LENK 1997); die Tiere wurden fotografiert und sofort wieder am Fundort freigelassen. Zusätzlich wurde DNA aus in Alkohol konservierten Geweben isoliert. Eine bewährte Methode (SAMBROOK & RUSSELL 2001) wurde für die Extrahierung totalgenomischer DNA angewendet, beginnend mit Proteinase K Verdau. Nach zwieltägiger Proteolyse bei 37 °C wurde die Extraktion mit Phenol/Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol fortgesetzt. Die DNA wurde mit Isopropanol präzipitiert, dann mit 70 % Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in TE Puffer wieder gelöst (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). Sollten Allozyme analysiert werden, wurden die Blutproben in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### 2.2 Laborarbeit

Analysiert wurden sowohl Proteine als auch nukleargenomische und organelläre DNA. Zum Einsatz kamen (in unterschiedlichen Kombinationen) verschiedene molekularbiologische Methoden, für die Blut- und andere Gewebeproben als Materialbasis benötigt werden: Allozym- und Serumproteinelektrophoresen (vgl. AMANN et al. 1997); SPAR bzw. ISSR-(Mikrosatelliten)-PCR mit einem einzelnen Primer (vgl. WINK et al. 1998); Sequenzierung mitochondrialer DNA (vgl. WINK & WEHRLE 1994) und RNA-RNA-Hybridisierung (vgl. LENK & WINK 1997). Die RNA-RNA-Hybridisierung ist eine Hilfstechnik zur Erkennung von Mutationen und unterstützt daher die DNA-Sequenzierung (s. u.). Da ein Stammbaum eines Einzelgens nicht notwendigerweise die Evolution der untersuchten Organismen wiedergibt (s. Diskussion bei AVISE 1994), halten wir dieses mehrgleisige Vorgehen für notwendig. Insbesondere sollte die heute vielfach angewendete Sequenzierung mitochondrialer DNA mit einem Verfahren kombiniert werden, das bisexuell vererbte Allele untersucht.

Beide Merkmalsgruppen ergänzen sich gegenseitig in ihrer Fähigkeit, historische und aktuelle Genflüsse zu unterscheiden sowie in ihrer Auflösungskraft, so dass die verschiedenen Ebenen der genetischen Differenzierung mit einer Kombination mehrerer Methoden besser erfasst werden können. Da mitochondriale Sequenzen nur mütterlich vererbt werden, also keine Rekombination stattfindet (AVISE 1986), führen Introgressionen zum Nebeneinanderbestehen mehrerer Linien (Haplotypen oder Ma-

trilinien), so dass Einwanderungswege zurückverfolgt werden können. Dagegen können Hybridisierungszonen mit mitochondrialer DNA allein nicht erkannt werden. Daher sind die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen mit nucleärer DNA oder Proteinelektrophoresen ebenfalls wichtig.

**Allozymelektrophoresen** sind eine standardisierte Methodik zur Feststellung des Heterozygotiegrads von Populationen und zur Messung genetischer Distanzen und des Genflusses zwischen ihnen (MURPHY et al. 1991). Ein Vorteil ist die Vergleichbarkeit der ermittelten Zahlenwerte für genetische Distanzen bei unterschiedlichen Arten (AMANN et al. 1997). **Plasmaproteinelektrophoresen** sind nicht quantifizierbar, aber wie morphologische Daten kladistisch auswertbar (vgl. JOGER & STEINFARTZ 1994). Allozymdaten liegen bisher nur für die Smaragdeidechsen vor; Plasmaproteindaten auch für die Äskulapnattern. Da für Proteinuntersuchungen verwendbare Proben in einer ununterbrochenen Tiefkühlkette zu lagern sind, während für DNA-Isolierung auch alkoholfixiertes Material verwendbar ist (vgl. JOGER & LENK 1997) wurden bei den übrigen Arten anstelle der Allozyme bzw. Plasmaproteine Genomregionen mittels der ISSR-(Mikrosatelliten)-PCR verglichen.

Die Single Primer Amplification Reaction (SPAR) bzw. **Inter Simple Sequence Duplication (ISSR)-PCR** setzt nur einen einzigen Primer aus Mikrosatelliten-Motiven (z. B. [GACA]<sub>4</sub>) ein. Amplifiziert werden Regionen, die zwischen zwei solcher Mikrosatelliten (davon muss einer invers orientiert sein) auf komplementären DNA-Strängen liegen. Da hohe Annealing-Temperaturen eingesetzt werden, kann die PCR stringent und reproduzierbar durchgeführt werden. Eine hochauflösende Polyacrylamid-Elektrophorese trennt die erhaltenen, unterschiedlich großen Amplifikate auf. Man erhält je nach Organismus bis zu 20–40 Banden. Da die Reaktion <sup>32</sup>P-markierte Nucleotide benutzt, erfolgt die Detektion über Autoradiographie. Die meisten der erhaltenen Banden sind artspezifisch; einige Banden können geschlechts-, andere populationsspezifisch sein (s. WINK et al. 1998, 2001).

Die Technik wird auch für die Detektion von Arthybriden eingesetzt (ROY et al. 1994); allerdings liegen erst wenige Erfahrungen mit Reptilien vor (z. B. WINK et al. 2001).

Die für die **DNA-Sequenzierung** verwendete Technik ist ein modifiziertes Strangabbruch-Verfahren nach SANGER et al. (1977). Mit selbst entworfenen Primern wurde das vollständige mitochondriale Cytochrom b-Gen durch Polymerasenkettenreaktionen (PCR) amplifiziert. In mehreren Fällen – bei älterem und degradiertem Material – war die Reamplifizierung der PCR-Produkte nötig. Die anschließenden Schritte wurden nach Standard-Protokollen durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden automatische Kapillarsequenzierer (ABI Prism Genetic Analyzer 3100 und 310; beide Applied Biosystems, Foster City, USA) oder MEGABase (Amersham-Pharmacia) benutzt.

Die Alignierung der Sequenzen wurde manuell durchgeführt.

Eine sinnvolle Haplotypen-Analyse sollte auf dem Vergleich einer größeren Zahl von Individuen jeder Population beruhen, was mit Sequenzierung recht aufwändig ist. Wir verwendeten daher (bei *Emys orbicularis*) zusätzlich eine RNA-RNA-Hybridisierungstechnik, die **Heteroduplexanalyse**. Das Prinzip dieser zur Mutantendetektion entwickelten Methode beruht auf der Eigenschaft von RNase A, einzelsträngige RNA abzubauen, (künstlich erzeugte) doppelsträngige RNA dagegen nicht anzugreifen. Unterwirft man einen RNA-RNA-Heteroduplex, der ein Abkömmling zweier unter-

schiedlicher, homologer DNA-Sequenzen ist, einer RNase-Spaltung, werden die nicht zusammenpassenden Sequenzpositionen (»mismatches«) von dem Enzym als einzelsträngig erkannt und geschnitten. Je nach Anzahl dieser »mismatches« entsteht eine unterschiedliche Anzahl von Spaltprodukten, die auf einem Agarosegel visualisiert werden können (MYERS et al. 1988, LENK & WINK 1997).

Zunächst wird eine herkömmliche PCR durchgeführt. Das so erhaltene Amplifikat wird durch Primer, an deren 5'-Ende RNA-Polymerase-Promotoren gekoppelt sind, in einer »second stage PCR« in RNA transkribiert, und zwar »light strand« und »heavy strand« in getrennten Ansätzen. Heteroduplices werden erzeugt, indem »light« und »heavy strand« von zwei verschiedenen Tieren miteinander kombiniert werden. Nach Behandlung mit RNase werden die Spaltprodukte auf einem Agarosegel aufgetrennt und mit einer Standardfärbung sichtbar gemacht. Identische Bandenmuster entsprechen identischen Sequenzunterschieden. Die verschiedenen langen Spaltprodukte können bereits bekannten (sequenzierten) Haplotypen zugeordnet werden oder durch nachträgliche Sequenzierung identifiziert werden.

Erfahrungen mit dieser Technik bei der Sumpfschildkröte zeigen, dass sie in der Lage ist, selbst einzelne Basenunterschiede zu erkennen (LENK & WINK 1997).

### 2.3 Datenauswertung

Für die phylogeographische und phylogenetische Analyse wurden die gewonnenen Daten mit verschiedenen Rechenverfahren ausgewertet (Neighbor-Joining-Clustering, Parsimony-maximierende Schwestergruppenbestimmung, phylogenetische Stammbaumrekonstruktion nach HENNIG, Maximum-Likelihood-Analyse des wahrscheinlichsten Baumes; hierarchische molekulare Varianzanalyse [AMOVA], partieller Manteltest, multidimensionale Skalierung u. a.; vgl. JÖGER 1996, LENK 1997).

Maximum likelihood (ML) Bäume wurden mit PAUP\* 4b10 gerechnet. Bei den Parametern im Nukleotidsubstitutionsmodell wurde die Empfehlung von Modeltest 3.06 (POSADA & CRANDALL 1998) befolgt. PAUP\* haben wir ebenfalls genutzt, um ungewichtete Maximum Parsimony (MP) Bäume zu erstellen. In den MP Analysen wurden die Alignmentlücken (»gaps«) als »fünfte Basen« behandelt.

## 3 Ergebnisse

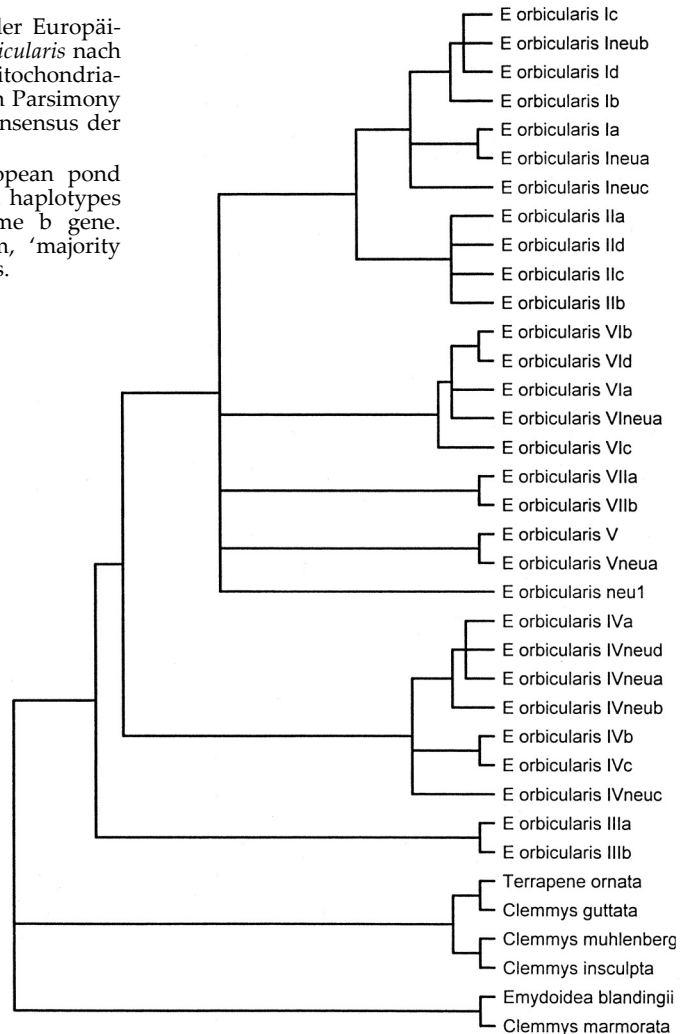
### 3.1 Europäische Sumpfschildkröten (*Emys orbicularis*-Komplex)

Für die intraspezifischen Untersuchungen an *Emys orbicularis* wurden insgesamt 728 Individuen, die von ca. 200 Fundorten stammen, analysiert. Für die interspezifischen Untersuchungen, die der Klärung der systematischen Stellung von *Emys orbicularis* innerhalb der Unterfamilie Emydinae dienen, wurden weitere sechs Arten verwendet. Es handelt sich dabei um Vertreter der nordamerikanischen *Clemmys*-Gruppe. Jede der drei nearktischen Gattungen ist durch mindestens eine Art repräsentiert.

Innerhalb von *Emys orbicularis* wurden bislang 35 Haplotypen gefunden, die sich 8 monophyletischen Haplotypengruppen zuordnen lassen (Abb. 2 und 3) Zwischen-

Abb. 2: Genetische Gliederung der Europäischen Sumpfschildkröte *Emys orbicularis* nach Genotypen (Haplotypen) des mitochondrialen Cytochrom b-Gens. Maximum Parsimony Kladogramm, »majority rule« Konsensus der 70 besten Bäume.

Genetic structuring of the European pond turtle (*Emys orbicularis*) based on haplotypes of the mitochondrial Cytochrome b gene. Maximum parsimony cladogram, 'majority rule' consensus of the 70 best trees.



gebnisse anhand von 20 Haplotypen aus 7 Gruppen wurden im Rahmen der Dissertation von PETER LENK statistisch ausgewertet und im Hinblick auf historische Ereignisse und phylogeographische Verhältnisse interpretiert (LENK 1997, LENK et al. 1998, 1999).

Die Verbreitung der Haplotypen ist der Kartenübersicht (Abb. 4) zu entnehmen.

Die Gruppe I mit den sieben Haplotypen Ia bis Ig kommt im osteuropäischen Raum östlich des Karpatenbogens, im ägäischen Raum und in Anatolien vor. Nördlich des Schwarzen Meeres und der Krim ist lediglich Ia verbreitet, während die anderen Linien in dem südlich angrenzenden Gebiet vorkommen. Die erhebliche Variation der Linie I in Kleinasien legt die Existenz mehrerer pleistozäner Refugialgebiete dort nahe. Von dort ist die postglaziale Ausbreitung wohl sowohl östlich wie westlich um das Schwarze Meer verlaufen.

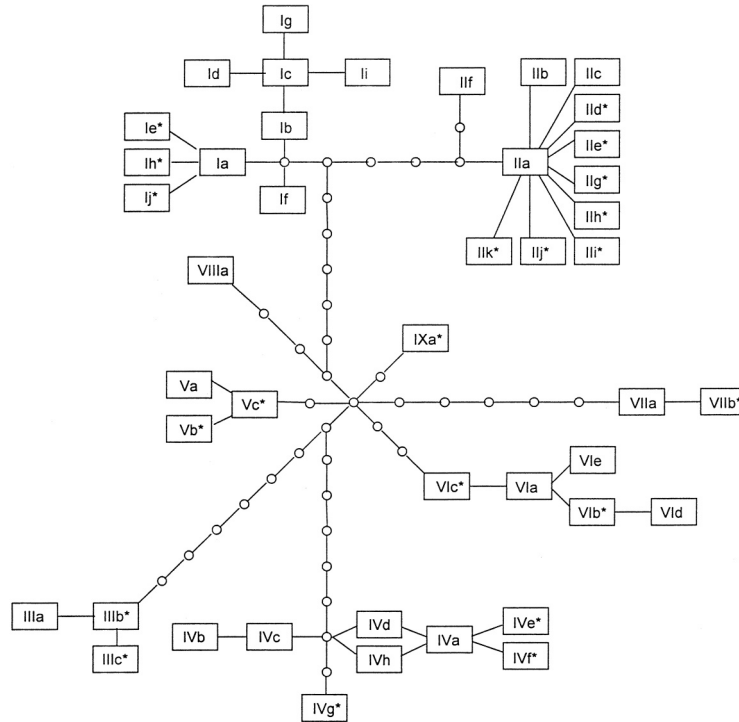


Abb. 3: »Minimum Spanning Network« aller bislang nachgewiesenen Haplotypen von *Emys orbicularis*. Jede Linie repräsentiert eine Basensubstitution im Zielfragment des Cytochrom b-Gens. Hypothetische ancestrale Haplotypen, die bisher noch bei keinem Tier gefunden wurden, sind durch einen Kreis angedeutet. Haplotypen, die mit \* markiert sind, wurden bislang nur bei einem einzigen Tier gefunden.

Minimum spanning network of all haplotypes found so far in *Emys orbicularis*. Each line represents one base substitution in a partial cytochrom b sequence. Hypothetical ancestral haplotypes (not yet found in any analysed sample) are indicated as a circle. Haplotypes marked with an asterisk (\*) have only been recorded from a single individual.

Die mit Gruppe I basal verwandte Gruppe II besiedelt ein Gebiet, das sich vom makedonisch-thessalischen Raum aus über die Donauniederung, Mitteleuropa nördlich der Alpen nach Westfrankreich, Nordwestitalien und darüber hinaus bis in die nördlichen Provinzen Spaniens erstreckt. Innerhalb der Gruppe II hat IIa die weiteste Verbreitung. Lediglich der ostdeutsche Raum wird ausschließlich von Haplotyp IIIb besiedelt. Er ist ein direkter Nachfahre von IIa. Im Westen des Areals scheint diese ursprünglich balkanische Gruppe ein rezenter Einwanderer zu sein.

Die Gruppe III besitzt ein kleines Verbreitungsgebiet in Süditalien und Sizilien. Hier wurde Haplotyp IIIa in zwei Populationen gefunden. Die genetische Differenzierung ist hier besonders weit fortgeschritten. Da sie mit eindeutigen morphologischen Unterschieden gekoppelt ist und keine Hybriden bekannt sind, wurde diese Populationsgruppe mittlerweile als neue Art *Emys trinacris* beschrieben (FRITZ et al. 2005).

Die Gruppe IV kommt ausgehend vom südlichen Griechenland entlang der Küste des Ionischen und Adriatischen Meeres bis in die norditalienische Poebene und das ganze östliche Italien vor. Auf Euböa ist IVa mit Ib vergesellschaftet.



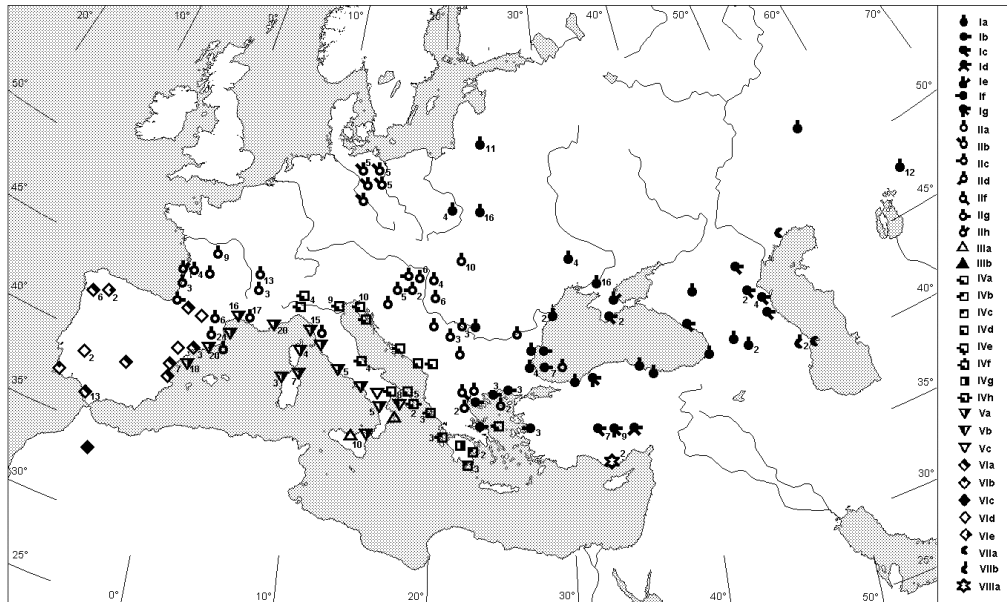


Abb. 4: Geographische Verbreitung der in Abb. 2 gezeigten Haplotypen (nur natürliche Populationen). Nördlich der Alpen kommen ursprünglich nur Haplotypen der Gruppe II vor.  
Geographical distribution of the haplotypes shown in fig. 2 (only natural populations). North of the Alps only haplotype group II occurs naturally.

Haplotyp V ist entlang der westitalienischen Küste bis nach Nordostspanien verbreitet. Außerdem bewohnt er die Tyrrhenischen Inseln Korsika und Sardinien. In Nordostspanien kommen Mischpopulationen mit Iia, VIa und VIId, in Apulien solche mit IVb und IVd, in der Toskana solche mit Iia vor. Auf der Insel Sizilien ist er mit IIIa vergesellschaftet.

Die Gruppe VI ist auf den iberomaghrebinischen Raum beschränkt. VIc, der ursprünglichste Haplotyp, kommt in Nordmarokko vor. Von diesem abgeleitete Haplotypen werden in weiten Teilen Spaniens und Portugals gefunden. Im nordspanischen Raum kommt es zur Vergesellschaftung zwischen VIId, VIe, Iia, V und VIa.

Die Gruppe VII ist auf die kaspische Region beschränkt. Außer zwei Einzeltieren mit VIIb zeigen die untersuchten Schildkröten aus dieser Region Haplotyp VIIa.

Haplotypengruppe VIII kommt nur in der südlichen Türkei vor.

Die statistische Überprüfung verschiedener Kausalhypothesen zur Erklärung des vorgefundenen Verteilungsmusters wurde mittels partieller Manteltests durchgeführt (Tab. 1). Verschiedene ökologische Parameter sowie mehrere allgemein verbreitete Hypothesen zur zoogeographischen Geschichte Europas zeigten keine Assoziationen mit der intraspezifischen genetischen Struktur. Die räumlich-phylogenetischen Beziehungen zwischen den Populationen konnten teilweise mit ihren geographischen Entfernungen und der Refugialhypothese nach DE LATTIN (1949) in Zusammenhang gebracht werden. Die stärkste Assoziation zeigte jedoch ein Modell, welches die Refugialräume nach DE LATTIN aufgrund ihrer Geomorphologie weiter untergliedert. Es impliziert, dass sich die postglaziale Ausbreitung streng an geomorphologische Ver-

Tab. 1: Partieller Manteltest zur Kausalanalyse der aktuellen Verbreitung der Haplotypen von *Emys orbicularis*: Partielle Regressionskoeffizienten und Irrtumswahrscheinlichkeiten für die Ablehnung der Nullhypothese (P-Werte) für die partiellen Regressionen zwischen paarweisen genetischen Distanzen der Populationen und verschiedenen Kausalhypothesen sowie der Unterartgliederung. Ein Bonferroni-Korrekturfaktor wurde auf das 5 % Signifikanzniveau angewendet.

Partial Mantel test to evaluate alternative explanations for the actual distribution of haplotypes of *Emys orbicularis*. Partial regression coefficients and null hypothesis probabilities for denial of the following explanatory factors (P) are given (from top to bottom): geographical distance; geographical distance and/or expansion barriers; start of spring; length of annual cold period; length of annual warm period; subspecies taxonomy; glacial micro refugia; macro refugia, herpetological chorology; amphibian chorology. Significance is indicated in the last column after sequential Bonferroni correction on the 5 % level, or on the 1% level (hoch = highly significant).

Hypothesen	Partielle Regressionskoeffizienten	P-Wert	Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur (p = 5 %)
Geographische Entfernung	-15,3	0,0037	signifikant
Geographische Entfernung respektive Barrieren	0,13	0,0020	signifikant
Beginn des Vorfrühlings	0,05	0,0180	-
Dauer der kalten Periode	-0,022	0,9058	-
Dauer der warmen Periode	0,18	0,3545	-
Unterarten	1,01	0,0019	signifikant
Mikrorefugien	6,14	0,0001	hoch signifikant (p = 1 %)
Makrorefugien	2,08	0,0009	signifikant
Herpetochorologie	-1,37	0,0132	-
Amphibienchorologie	1,37	0,0132	-

hältnisse anlehnt (Mikrorefugialmodell). Dieses Modell zeigte auch im Test der räumlichen Verteilung der Haplotypen eine hoch signifikante Kohärenz. Offenbar reichten bereits schwache physische Barrieren aus, um die mitochondriale Gendiffusion über Distanzen von wenigen 100 km (evtl. noch weniger) hinweg zum Erliegen zu bringen.

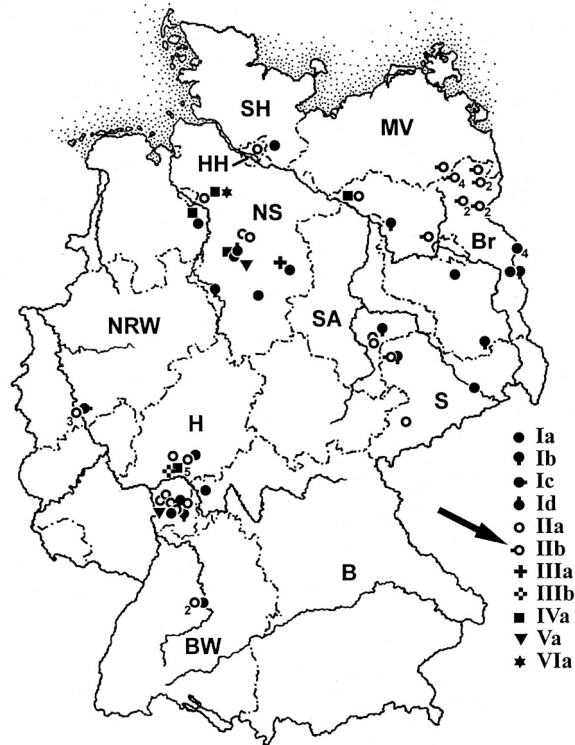
Der Test spricht dafür, dass die Evolution der Art *Emys orbicularis* stark durch die geomorphologischen Verhältnisse in den Refugialräumen bestimmt wurde. Sie sorgten für eine Substruktur dieser Gebiete und definierten Kleinrefugien im Mittelmeerraum, die die Startpunkte der postglazialen Arealentwicklung darstellen. Damit bestimmen sie den Verlauf der holozänen Arealexansion und das rezente Verbreitungsmuster erheblich (Mikrorefugialmodell).

Entlang der Donau und durch die osteuropäische Tiefebene führten offenbar die Einfallsrouten für die Neubesiedlung Mitteleuropas nördlich der Alpen (FRITZ 1996).

Der indigene ostdeutsche Haplotyp IIb scheint durch Gendrift aus IIa entstanden zu sein und kennzeichnet die autochthonen *Emys*-Populationen in Brandenburg und angrenzenden Bundesländern. In Westdeutschland und der Schweiz kommt stattdessen ein Sammelsurium verschiedenster Haplotypen vor (Ia, Ib, Ic, Id, IIa, IIb, IIIa, IIIb, IVa, Va und VIa., vgl. Abb. 5). Dies spiegelt offenbar auch die jahrhundertlange anthropogene Verschleppung zu Nahrungszwecken wider (vgl. KINZELBACH 1988). Wenn überhaupt, so könnte nur der auch in Südosteuropa sowie Frankreich vorkommende Haplotyp IIa auf Reste autochthoner Populationen hindeuten, da er eine Verbindung zwischen den heute getrennten Populationen Ungarns und Frankreichs schaffen könnte (LENK et al. 1997, HANKA & JÖGER 1998, FRITZ et al. 2004).

Abb. 5: In Deutschland identifizierte Haplotypen von *Emys orbicularis* (Auswahl). In Westdeutschland gefundene Schildkröten sind zum größten Teil eingeschleppt.

Haplotypes identified in German *Emys orbicularis* (selection). Most turtles found in western Germany have been introduced.



Die ISSR-PCR ergab bislang bei *Emys orbicularis* keine eindeutig auswertbaren Ergebnisse. Obwohl Variabilität festgestellt wurde, beschränkt sich diese vorwiegend auf einzelne Individuen, weniger jedoch auf Populationen.

### 3.2 Zauneidechse (*Lacerta agilis*)

SVETLANA KALYABINA-HAUF hat das mitochondriale Cytochrom b-Gen dieser Eidechsenart im gesamten Verbreitungsgebiet, das von Westeuropa bis Kasachstan reicht, untersucht (KALYABINA et al. 2001). Bisexuell vererbte Marker wurden nicht mit einbezogen, doch existiert bei dieser Art eine gut herausgearbeitete subspezifische Struktur (vgl. BISCHOFF 1988).

Es stellte sich heraus, dass die höchste genetische Vielfalt im Kaukasus existiert, wenn auch einige der von dort beschriebenen Unterarten (*L. a. grusinica*, *L. a. brevicaudata*) genetisch kaum von *L. a. exigua* differenziert waren (Abb. 6). Die kaukasische Unterart *boemica* zweigt sehr früh ab und verdient wohl schon Artrang. Auch der zu *L. a. bosniaca* führende Ast hat sich wohl bereits im Pliozän abgespalten (Abb. 7). Weitere stark differenzierte Lokalformen konnten in Griechenland und auf der Krim identifiziert werden. Das genaue Verwandtschaftsverhältnis der griechischen Populationen erscheint noch unklar, da sich die Daten widersprechen. Für die Populationen der Krim wurde mittlerweile der Name *L. agilis tauridica* Suchoy, 1926 revalidiert (KALYABINA-HAUF et al. 2004). Dagegen sind die östlichen Steppenformen genetisch praktisch identisch (*L. a. exigua*) und haben demnach ihr riesiges Verbreitungsgebiet erst vor

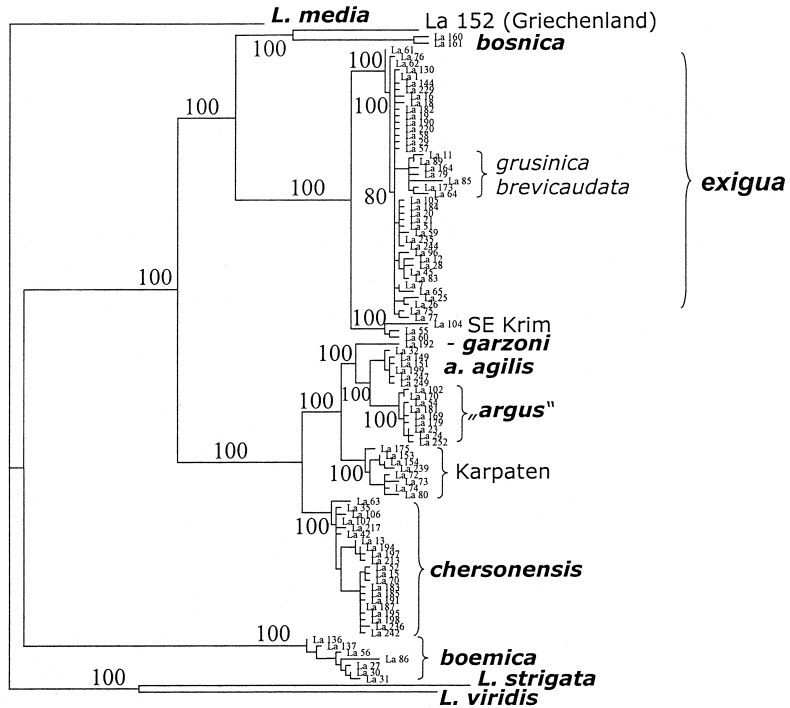
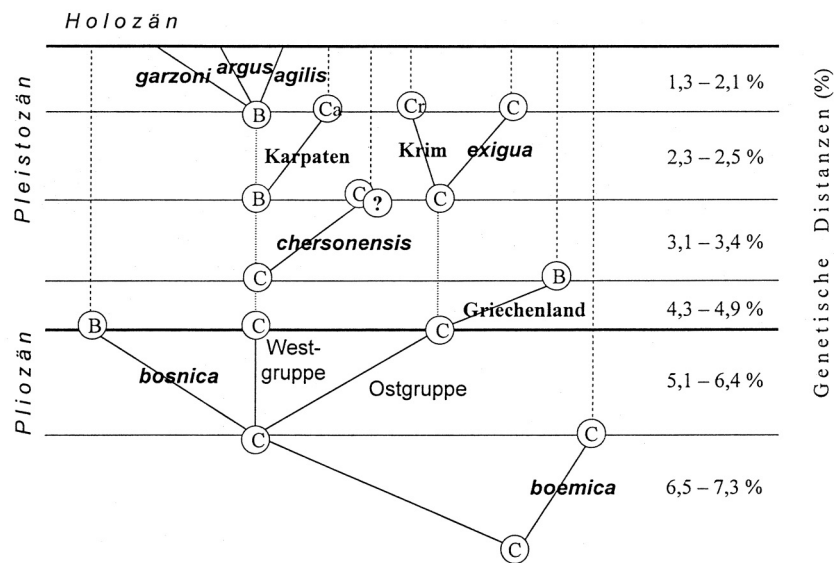


Abb. 6: Maximum Parsimony Phylogramm (Konsensus aus 300 parsimonygleichen Bäumen) des *Lacerta agilis*-Komplexes, nach Sequenzen des mitochondrialen Cytochrom b-Gens. *L. media*, *L. strigata* und *L. viridis* dienen als Außengruppen. Die Zahlen sind Bootstrap-Werte.

Maximum parsimony phylogram (consensus of 300 parsimony identical trees) of the *Lacerta agilis* complex, constructed from sequences of the mitochondrial Cytochrome b Gene. *L. media*, *L. strigata* and *L. viridis* serve as outgroups. Numbers are bootstrap values.



kurzer Zeit erobert. Nur wenig älter sind die westlichsten Unterarten (*L. a. agilis*, *L. a. argus* und *L. a. garzoni*). Die Einwanderung erfolgte also, vom Kaukasus ausgehend, in mehreren Wellen nach Westen und in nur einer (heute noch nachweisbaren) Welle nach Osten.

### 3.3 Smaragdeidechsen (*Lacerta viridis*/*L. bilineata*)

Durch Kreuzungsexperimente (RYKENA 1991, 1996, 2001) und Allozymvergleiche (AMANN et al. 1997, JOGER et al. 1998, 2001) wurde klar, dass die früher allgemein als *Lacerta viridis* bezeichneten Smaragdeidechsen zwei biologischen Arten angehören, die nur eingeschränkt fertil sind. AMANN et al. (2001) identifizierten eine Hybridzone im äußersten Nordosten Italiens, in der ein nur noch eingeschränkter und asymmetri-

Abb. 8: Evolution der Smaragdeidechsen nach genetischen Distanzen aus Allozymprofilen (aus JOGER et al., 2001). Eine genetische Barriere trennt zwei Arten – eine westliche (*Lacerta bilineata*) und eine östliche (*L. viridis*). In Deutschland und in Italien kommen jeweils beide Arten vor.

Evolution of green lizards according to genetic distances derived from allozyme profiles (from JOGER et al., 2001). A genetic barrier divides two species – a western species (*Lacerta bilineata*) and an eastern species (*L. viridis*). In Germany and in Italy, respectively, both species occur.

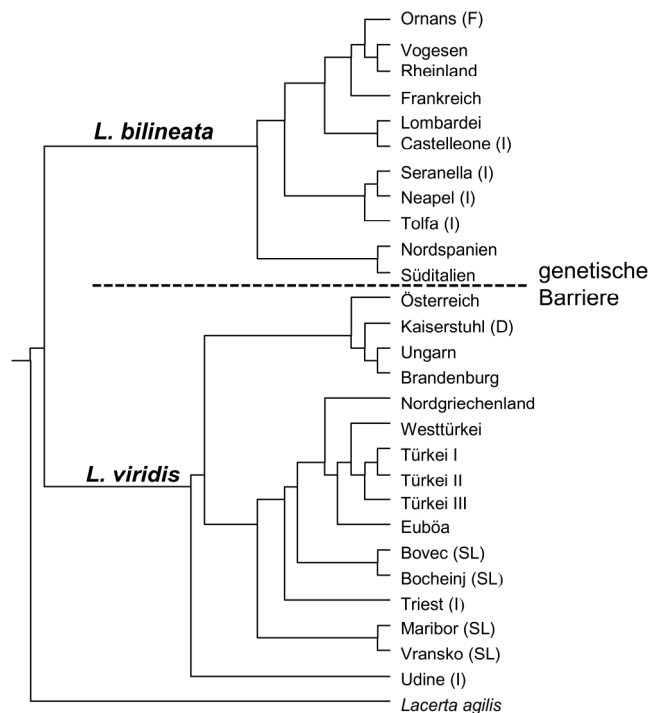


Abb. 7 (links): Phylogeographische Beziehungen der Unterarten und Regionalformen der Zauneidechse (*Lacerta agilis*) - aufgrund von Cytochrom b-Sequenzen - und ihre zeitliche Differenzierung. Die genetischen Distanzen (prozentuale Sequenzunterschiede) wurden einer hypothetischen Zeitskala angepasst (»molekulare Uhr«). B = balkanische Formen, C = kaukasische Formen (bei ausgestorbenen Zwischenformen hypothetisch, bei Überlebenden [gestrichelte senkrechte Linien] sehr wahrscheinlich); Ca = Karpatenpopulation, Cr = Population der Krim.

Phylogeographical relationship between subspecies and regional populations of *Lacerta agilis* – according to Cytochrome b sequences – and their temporal differentiation. Genetic distances (percent sequence differences) were arranged in a hypothetical time axis ('molecular clock'). B = Balkans, C = Caucasus (hypothetical in ancestral forms, highly probable in ancestors of living forms [dashed lines]); Ca = Carpathian population, Cr = Crimean population.

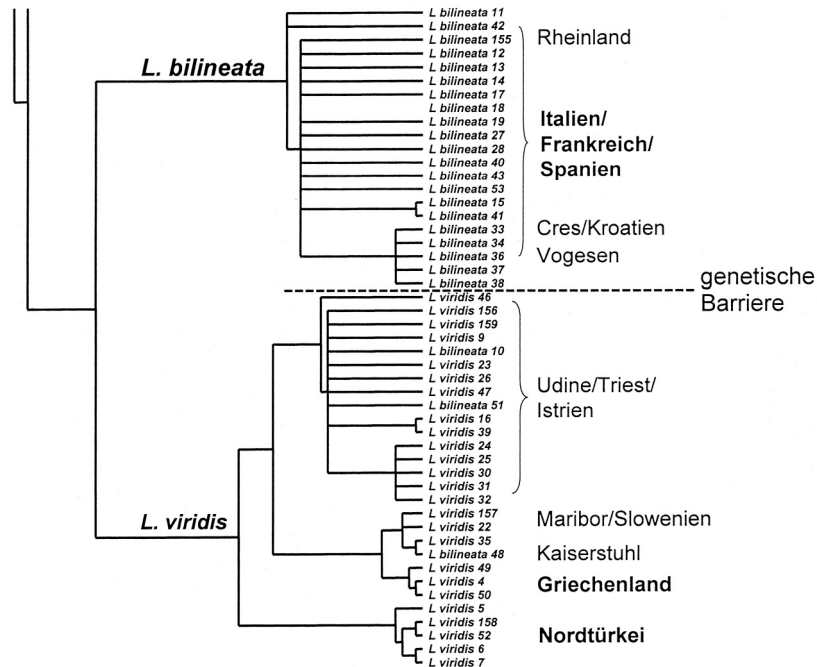


Abb. 9: Mitochondriale DNA-Sequenzen (Cytochrom b, Maximum Parsimony Baum) bestätigen das Ergebnis der Allozyme (vgl. Abb. 8). Die konkordante genetische Barriere spricht für die Existenz zweier getrennter Arten. Zu beachten ist, dass einige zunächst als *L. bilineata* bestimmte Tiere (aus Triest, Italien, und vom Kaiserstuhl) nach dem Cytochrom b zu *L. viridis* gehören, während Eidechsen von der kroatischen Insel Cres eindeutig *bilineata* sind.

Mitochondrial DNA sequences (Cytochrome b, a maximum parsimony tree) confirm the results of the allozyme tree (fig. 8). The concordant genetic barrier argues in favour of two separate species. Note that a few samples from animals that were initially determined as *L. bilineata* (from Trieste, Italy, and Kaiserstuhl, Germany), cluster with *L. viridis* according to their Cytochrome b, whereas lizards from the Croatian Island of Cres are clearly *bilineata*.

scher Genfluss (hauptsächlich von Ost nach West) festgestellt wurde. Eine derartige Hybridzone zwischen Arten »in statu nascendi« wird räumlich beschränkt bleiben, kann aber lange Bestand haben, da sie von einem Gleichgewicht zwischen Einwanderung und Auswanderung, Bastardierung und Selektion aufrechterhalten wird (BARTON & HEWITT 1985).

Ein weiteres Kriterium für eine effektive Artbarriere ist nach AVISE (1994) und JÖGER et al. (1998) das Konkordanzkriterium: Wenn mit zwei methodisch unabhängigen Ansätzen identische, getrennte phylogeographische Gruppen identifiziert werden können, kann damit eine genetische Trennung belegt werden.

Der Vergleich zwischen dem Allozymbaum (Abb. 8) und dem Cytochrom b-Baum (Abb. 9) zeigt eine übereinstimmende Auftrennung in zwei Cluster: In beiden Fällen werden die nordostitalienischen Populationen (Udine, Triest) zu *viridis* gruppiert, ebenso wie die Kaiserstuhl-Population, was zunächst nicht zu erwarten war (sie wurden als *bilineata* bestimmt). Im Kaiserstuhl darf Allochthonie vermutet werden (JÖGER et al. 2001). Dass die Udine-Population im Allozymbaum eine basalere Stellung einnimmt, ist mit ihrer Bastardnatur zu erklären. Diese kommt in den unisexuell vererb-

ten mitochondrialen Genen nicht zum Tragen. Diese Population scheint von Osten her nach Italien eingewandert zu sein. Hoch interessant erscheint auch die Zugehörigkeit der Population von der kroatischen Insel Cres zu *bilineata*. Dieses Ergebnis wird von BRÜCKNER et al. (2001) sowie GODINHO et al. (2005) bestätigt, jedoch haben diese Autoren leider keine slowenischen oder nordostitalienischen Eidechsen einbezogen.

Als Erklärung bietet sich an, dass *L. bilineata* die kroatische Küste primär besiedeln konnte, bei der West-Expansion von *L. viridis* aber verdrängt wurde – bis auf die Insel Cres, die offenbar von *viridis* nicht erreicht wurde. Allerdings wurden auch an der Küste Istriens *L. bilineata* beobachtet (NETTMANN, mdl. Mitt.), wenngleich sie noch nicht molekular typisiert wurden.

Bei der *L. viridis*-Gruppe hat offenbar ein Speziationsprozess gerade den »point of no return« überschritten.

### 3.4 Gelbgrüne Zornnatter (*Hierophis viridiflavus*)

Bei der polymorphen gelbgrünen Zornnatter (*Hierophis viridiflavus*) haben SCHÄTTI & VANNI (1986) keine der beschriebenen Unterarten als hinreichend begründet angesehen.

Die mitochondriale Sequenzanalyse des Cytochrom b-Gens, unterstützt von ISSR-PCR Fingerprints, zeigte jedoch, dass es diskrete phylogenetische Einheiten mit klar definierter geographischer Verbreitung gibt (NAGY et al. 2002). Für die Isolation sind sowohl räumliche als auch zeitliche Faktoren verantwortlich.

Zwei große Gruppen ließen sich unterscheiden, eine westliche und eine östliche Populationsgruppe, die durch die Gebirgszüge der Alpen und des Apennin getrennt sind (Abb. 10a). Die Gebirge stellen offensichtlich starke geographische Barrieren dar (siehe auch Abb. 10b). Diese Schlangenart scheint daher höhere Lagen nicht einfach überqueren zu können. Die auf Cytochrom *b* Sequenzen beruhenden Ergebnisse weisen auf eine genetisch einheitliche westliche Gruppe hin (allerdings standen keine Proben von den mediterranen Inseln und von der Nordgrenze der Verbreitung [z. B. Luxemburg] zur Verfügung).

Die Population, die auf der Adriainsel Krk, also an der Ostgrenze des Areal vorkommt, zeigt eine nur unbedeutende genetische Divergenz zu denjenigen italienischen Populationen, die zur östlichen Gruppe gehören. Eine ununterbrochene Anwesenheit der gelbgrünen Zornnatter während des Pleistozäns ist wegen der nördlichen Lage wenig wahrscheinlich. Es könnte eher angenommen werden, dass diese Regionen von den süditalienischen Stämmen aus den mutmaßlichen Refugialräumen der gelbgrünen Zornnatter kolonisiert wurden. Die Refugien auf der Balkan-Halbinsel waren zu dieser Zeit wahrscheinlich von der Balkanzornnatter *H. gemonensis* belegt gewesen.

Die süditalienischen und sizilianischen Regionen fungierten in den Glazialzeiten des Pleistozäns wahrscheinlich als Refugien. Refugien für die östliche Gruppe hätten demnach am Golf von Tarent und in Kalabrien existieren können. Bemerkenswert ist, dass unsere beiden kalabrischen Exemplare unterschiedliche Haplotypen aufweisen, einen südlichen und einen nördlichen. Beide sind genetisch von den sizilianischen Exemplaren klar getrennt.

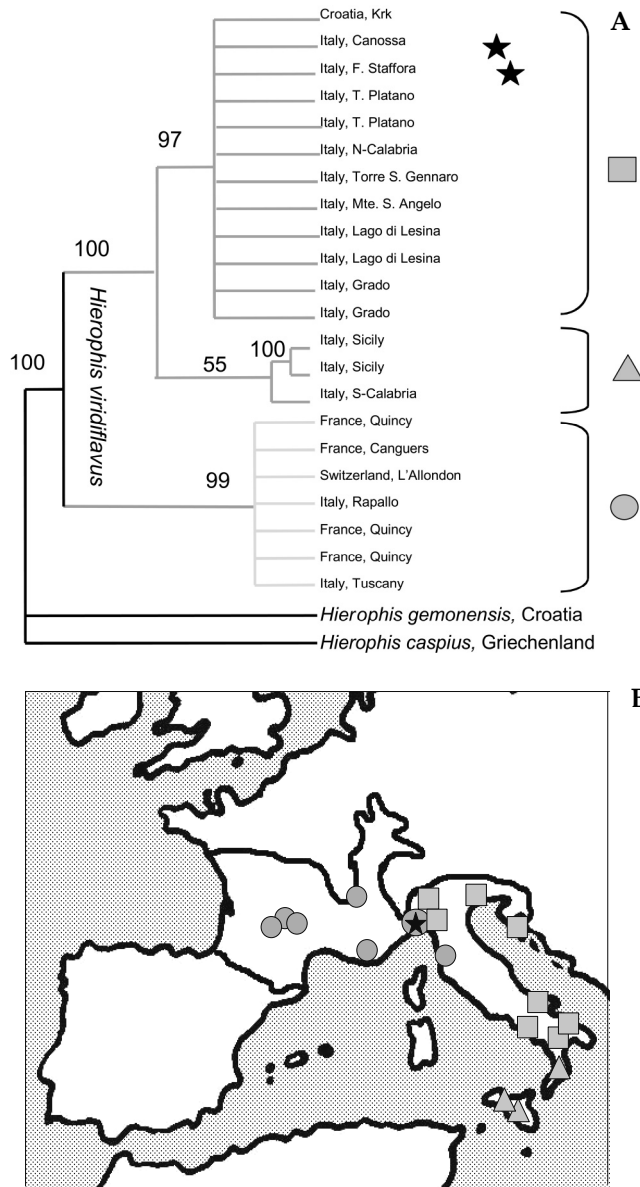


Abb. 10: Phylogeographie von *Hierophis viridiflavus* aufgrund von Sequenzen des Cytochrom b-Gens. A. Maximum Parsimony-Baum mit Bootstraps-Werten für die Hauptgruppen (Haplotypen). \* = Populationen östlich des Apennins, bei denen mit ISSR-PCR Allele der Westgruppe festgestellt wurden. B. Geographische Verbreitung der festgestellten Haplotypen.

Phylogeography of *Hierophis viridiflavus* derived from sequences of the Cytochrome b gene. A. Maximum parsimony tree with bootstraps values for the main haplotype groups. \* = populations east of the Apennines, in which alleles of the western group were found by ISSR PCR. B. Geographical distribution of the identified haplotypes.

Bei der gelbgrünen Zornnatter konnte sich die Evolution der südlichen Populationen auch während der glazialen Perioden ungehindert fortsetzen. Dies resultierte in höheren genetischen Differenzen oder aber in einem Mosaik genetisch unterschiedlicher Formen. Einige dieser Formen – in der Tat nur je eine auf beiden Seiten des Apennins – konnten die klimatisch vorteilhaften Interglaziale nutzen, um sich weiter in nördlicher Richtung auszubreiten. Pleistozäne Fossilien, die angeblich zu *H. viridiflavus* gehören, wurden auch in Süddeutschland und Österreich gefunden. In dem vorangegangenen Pliozän hatte die Art sogar die Gebiete der heutigen Länder Tschechien und



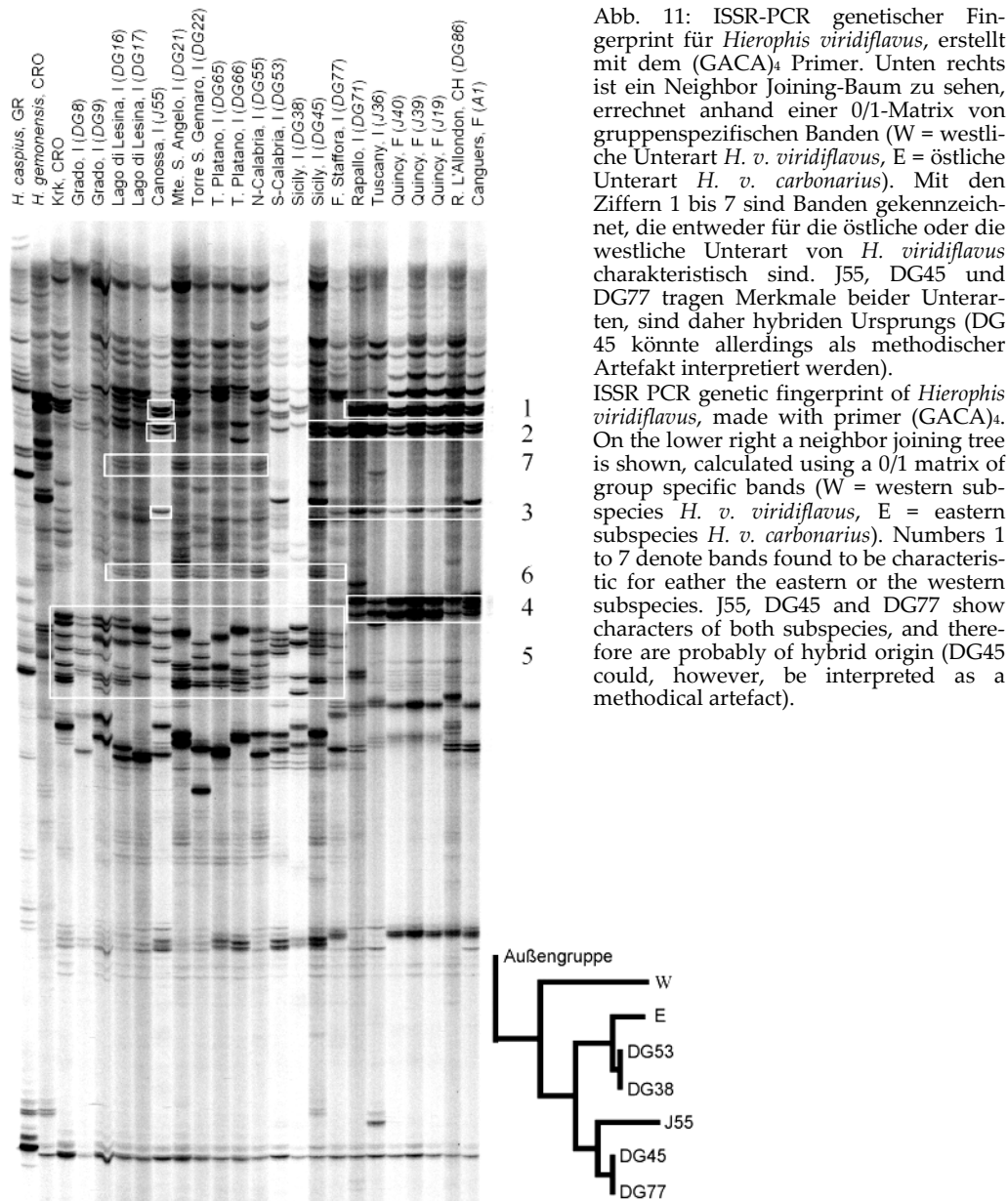


Abb. 11: ISSR-PCR genetischer Fingerprint für *Hierophis viridiflavus*, erstellt mit dem (GACA)<sub>4</sub> Primer. Unten rechts ist ein Neighbor Joining-Baum zu sehen, errechnet anhand einer 0/1-Matrix von gruppenspezifischen Banden (W = westliche Unterart *H. v. viridiflavus*, E = östliche Unterart *H. v. carbonarius*). Mit den Ziffern 1 bis 7 sind Banden gekennzeichnet, die entweder für die östliche oder die westliche Unterart von *H. viridiflavus* charakteristisch sind. J55, DG45 und DG77 tragen Merkmale beider Unterarten, sind daher hybriden Ursprungs (DG 45 könnte allerdings als methodischer Artefakt interpretiert werden).

ISSR PCR genetic fingerprint of *Hierophis viridiflavus*, made with primer (GACA)<sub>4</sub>. On the lower right a neighbor joining tree is shown, calculated using a 0/1 matrix of group specific bands (W = western subspecies *H. v. viridiflavus*, E = eastern subspecies *H. v. carbonarius*). Numbers 1 to 7 denote bands found to be characteristic for either the eastern or the western subspecies. J55, DG45 and DG77 show characters of both subspecies, and therefore are probably of hybrid origin (DG45 could, however, be interpreted as a methodical artefact).

Polen erreicht (IVANOV 1997). Die ungünstigen klimatischen Bedingungen während der Glaziale erzwangen jedoch den Rückzug der Art in die erwähnten süditalienischen Refugien. Nach der letzten glazialen Periode war wohl die erneute Einwanderung in die nord-adriatischen Regionen (östliche Gruppe) sowie nach Frankreich und Belgien-Luxemburg (westliche Gruppe) in relativ kurzer Zeit abgelaufen, wodurch eine signifikante genetische Differenzierung der nördlichen Populationen praktisch auszuschließen ist.

Die ISSR-PCR Methode ermöglichte die Untersuchung der genetischen Eigenständigkeit der einzelnen Gruppen sowie die des Auftretens von Hybriden (Abb. 11). Sie bestätigte die Trennung der Zornnatterpopulationen in eine westliche und eine östliche Gruppe. Zusätzlich wies sie auf rezente Genfluss in Nord-Italien hin, lieferte aber wenig Unterstützung für die genetische Eigenständigkeit der sizilianischen und süditalienischen Populationen.

Wegen der eindeutigen, aber nicht vollständigen genetischen Isolation halten wir erneut die Existenz zweier Unterarten der gelbgrünen Zornnatter sensu MERTENS & WERMUTH (1960) für gegeben. Wenn zukünftige Studien in der Kontaktzone beider Unterarten eine intrinsische genetische Barriere nachweisen könnten, könnten die zwei Gruppen sogar auf Artniveau angehoben werden (siehe JÖGER et al. 1998). Der anwendbare Name für die westlichen Populationen ist *Hierophis viridiflavus viridiflavus* (Lacépède, 1789) (Terra typica: Südfrankreich). Die östlichen Stämme sind traditionell zu der Unterart *Hierophis viridiflavus carbonarius* (Bonaparte, 1833) zu zählen. Die Grenze zwischen beiden Unterarten sind die Gebirgsketten des Apennin und der Alpen. Die süditalienischen Populationen sind innerhalb der östlichen Gruppe nicht sehr stark differenziert: 1,16 % (entspricht 13 bp) Unterschied bei der süditalienischen Probe sowie 1,25–1,34 % (14–15 bp) bei den sizilianischen Proben in den Cytochrom b-Sequenzen. Deshalb sind hier keine taxonomischen Konsequenzen gerechtfertigt. Es bedeutet aber, dass eventuell ältere verwendbare Namen existieren, die für die östliche Unterart gültig sein könnten: *Coluber profulax* Costa, 1828 (Terra typica: Aspromonte, Süd-Kalabrien) oder *Coluber xanthurus* Rafinesque-Schmaltz, 1810 (Terra typica: Sizilien).

### 3.5 Äskulapnattern (*Elaphe longissima*/*E. lineata*)\*

Bislang wurden Äskulapnattern aus insgesamt 17 verschiedenen Herkunftsorten und einige weitere europäische *Elaphe*-Arten untersucht. Der methodische Ansatz gleicht weitgehend dem, der bislang auch für *Emys orbicularis* angewendet wurde. Es wurden Proteinelektrophoresen durchgeführt (LENK 1993, LENK & JÖGER 1994) und Cytochrom b-Sequenzen verglichen (LENK et al. 2001).

Proteinelektrophoretisch stellte sich heraus, dass am Transferrin-Locus drei charakteristische Allele vorkommen, die in wechselnden Häufigkeiten über das gesamte Areal von *Elaphe longissima*, von Spanien bis zum Kaukasus, zu finden sind. Dagegen weist die süditalienische Population, die früher der Unterart *E. l. romana* zugerechnet wurde, ein völlig anderes Elektrophoresebild auf. Dies deckt sich mit Sequenzunterschieden der mitochondrialen DNA (Abb. 12).

Um die innerartlichen Beziehungen von *Elaphe longissima* darzustellen, wurden die Sequenzen mittels der Maximum-Parsimony-Methode analysiert. Ein einziger »sparsamster« Baum der Länge 13 wurde erhalten. Dieser Baum wurde auf die Verbreitungskarte in Abbildung 13 projiziert. In ihr sind die Verzweigungen als konzentrische Linien dargestellt. Die Zahl der Substitutionsschritte, die die einzelnen Linien

---

\* Der nomenklatorischen Umgruppierung der bisherigen Gattung *Elaphe* (UTIGER et al. 2002) wonach *Zamenis longissimus* die korrekte Bezeichnung für die Äskulapnatter wäre, folgen wir hier nicht.

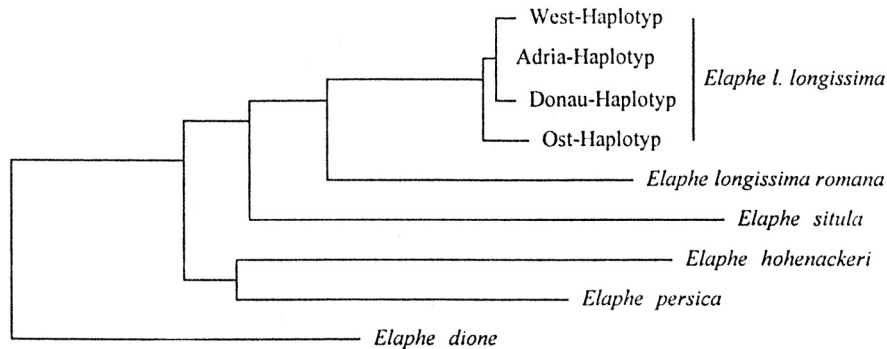


Abb. 12: Neighbor-Joining-Phylogramm der Äskulapnatter (*Elaphe longissima*) und ihrer nächsten Verwandten, nach mitochondrialen Cytochrom b-Sequenzen. *E. longissima romana* wird heute als *Elaphe lineata* klassifiziert. Ein um mehrere Arten erweiterter Stammbaum wurde von LENK et al. (2001) publiziert.

Neighbor joining phylogram of the Aesculapian snake (*Elaphe longissima*) and its nearest relatives, derived from mitochondrial Cytochrome b sequences. *E. longissima romana* has been reclassified as *Elaphe lineata*. An extended tree with more species was published by LENK et al. (2001).

miteinander verbinden, sind als Striche dargestellt. Das Verbreitungsgebiet des süditalienischen Taxons ist fett hervorgehoben.

Erstaunlicherweise zeigt die süditalienische Äskulapnatter eine sehr große genetische Distanz zu den übrigen Haplotypen von *E. longissima*. Sie weicht in über 7 % ihrer Sequenz von der Nominatform ab.

Eine multivariate Diskriminanzanalyse (LENK & WÜSTER 1999) bestätigte, dass diese Südform auch morphologisch verschieden von *Elaphe longissima* ist, wobei in benach-

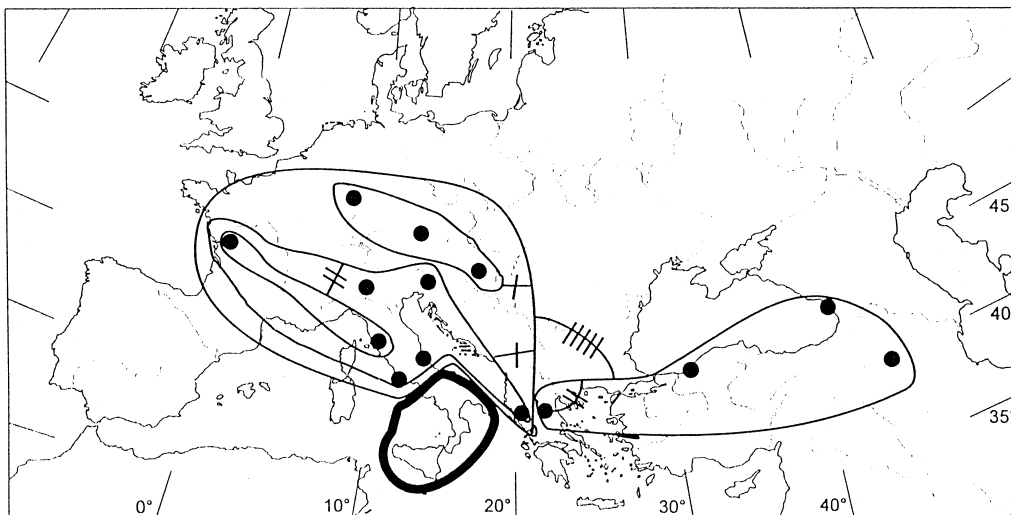


Abb. 13: Phylogeographische Gruppen der Äskulapnattern (*Elaphe longissima* und *E. lineata*) nach mitochondrialen Cytochrom b-Sequenzen.

Phylogeographic patterning in Aesculapian snakes (*Elaphe longissima* and *E. lineata*) derived from mitochondrial Cytochrome b sequences.

barten, d. h. weniger als 100 km voneinander entfernten Populationen beider Formen keine Anzeichen für Introgression gefunden wurden. Hier decken sich also morphologische und molekulare Merkmale in der Bewertung, dass sowohl das Bestehen einer Fortpflanzungsbarriere angenommen werden muss, als auch eindeutige diagnostische Merkmale zur Trennung beider Arten bekannt sind. Die süditalienische Äskulapnatter hat den Namen *Elaphe lineata* zu tragen (LENK & WÜSTER 1999)

Innerhalb der Art *E. longissima* zeigt sich eine Ost-Westgliederung in zwei genetische Linien. Die Westgruppe wurde in Frankreich, Italien, Slowenien, Nord-West-Griechenland, Ungarn und Deutschland nachgewiesen. Die östliche Linie konnte in vier Exemplaren aus dem Kaukasusvorland, der Türkei und Nordgriechenland festgestellt werden. Das griechische Pindosgebirge scheint die geographische Grenze zwischen beiden Linien zu markieren.

Innerhalb der Westgruppe lassen sich die Haplotypen der Donaugruppe, zu der auch sämtliche deutsche Populationen zählen, von einer Gruppe, die von Westgriechenland bis Frankreich verbreitet ist, abtrennen.

#### **Phylogeographische Interpretation**

Der jetzigen Datenlage zufolge muss angenommen werden, dass es sich bei *E. l. longissima* und *E. l. romana* in Wirklichkeit um Schwesternarten handelt, die sich während des Pleistozäns differenzierten. Erstere überdauerte die letzte Kaltzeit in einem Refugium auf der Balkanhalbinsel, letztere in einem süditalienischen. Eine weitergehende Untersuchung mit sexuell vererbten Allelen muss noch klären, ob wie bei den Smaragdeidechsen eine Hybridzone zwischen den beiden Schwesternarten existiert.

Gegenüber *E. »romana«* (= *E. lineata*) zeigte *E. l. longissima* eine dramatische Ausbreitungstendenz über Tausende von Kilometern hinweg.

Offenbar wurde die West-Ostgliederung bei *E. l. longissima* noch während des letzten Glazials durch die Barrierewirkung des Pindosgebirges bewirkt. Von hier aus drang die Art wahrscheinlich an der Südküste des Schwarzen Meeres bis nach Transkaukasien vor. Eine andere Ausbreitungsfront bewegte sich entlang der ostadriatischen Küste nach Norden, überwand die Apenninen und breitete sich in Frankreich aus.

Weitere Analysen müssen zeigen, ob sich das oben skizzierte Bild erhärten lässt und ob weitere feinere Untergliederungen vorgenommen werden können. Vor allem wäre zu klären, ob die Donaugruppe zur Ostgruppe Kontakt aufnimmt und wo sich diese Zone befindet.

### **3.6 Wassernattern (*Natrix maura*/*N. tessellata*)**

Vipernatter und Würfelnatter sind die einzigen echten Wassernattern Europas. Geographisch schließen sie sich fast vollständig aus; lediglich in Norditalien und am Genfer See gibt es gemischte Populationen. Mit Hilfe der ISSR-PCR wurden Tiere von *N. maura* und *N. tessellata* vom Genfer See und aus einem natürlichen Überschneidungsgebiet beider Arten in Norditalien auf Hybridisierung untersucht. Unter über 40 Tieren wurde jedoch kein einziger Bastard gefunden. Offensichtlich kommt es unter natürlichen Bedingungen nicht zu Hybridisierungen zwischen den beiden Arten.

Die phylogeographischen Evolutionsmuster der beiden Arten wurden anhand vollständiger Sequenzen des mitochondrialen Cytochrom b-Gens untersucht. Die dritte

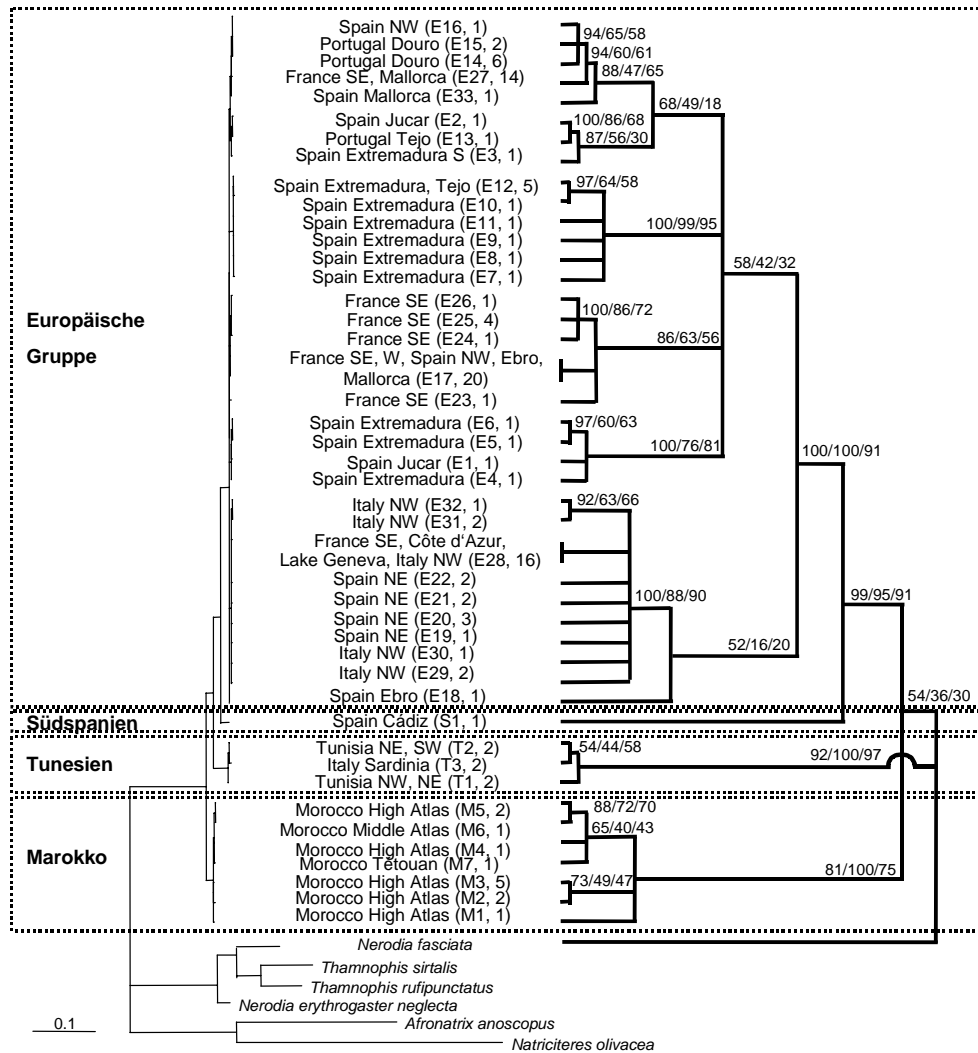


Abb. 14: Stammbaumrekonstruktionen für Cytochrom b-Haplotypen der Vipernatter (*Natrix maura*). Links: Maximum Likelihood Phylogramm; rechts: Kladogramm nach »MrBayes«. Der kürzeste Maximum Parsimony Baum (nicht gezeigt) hatte eine identische Topologie. Die unterstützenden Bootstrapswerte sind in folgender Reihenfolge angegeben: MrBayes/ML/MP. Eingeklammerte Werte geben die Bezeichnung des jeweiligen Haplotyps, gefolgt von seiner Häufigkeit an.

Phylogenetic tree reconstructions for Cytochrome b haplotypes of the Viperine snake (*Natrix maura*). Left: Maximum likelihood phylogram; right: MrBayes cladogram. The shortest maximum parsimony tree (not shown) had an identical topology. Supporting bootstraps values are shown in the following order: MrBayes/ML/MP. Numbers in parentheses denominate haplotypes and their frequencies in the samples.

Art der Gattung *Natrix*, die Ringelnatter, wurde in einer Kooperation mit Robin Lawson, San Francisco, bearbeitet (GUICKING et al. 2006). Dabei stellte sich heraus, dass *N. natrix* die Schwesterart von *N. tessellata* ist, während *N. maura* einem früheren Seitenzweig entspringt. Dieses überraschende Ergebnis macht deutlich, dass die außeror-

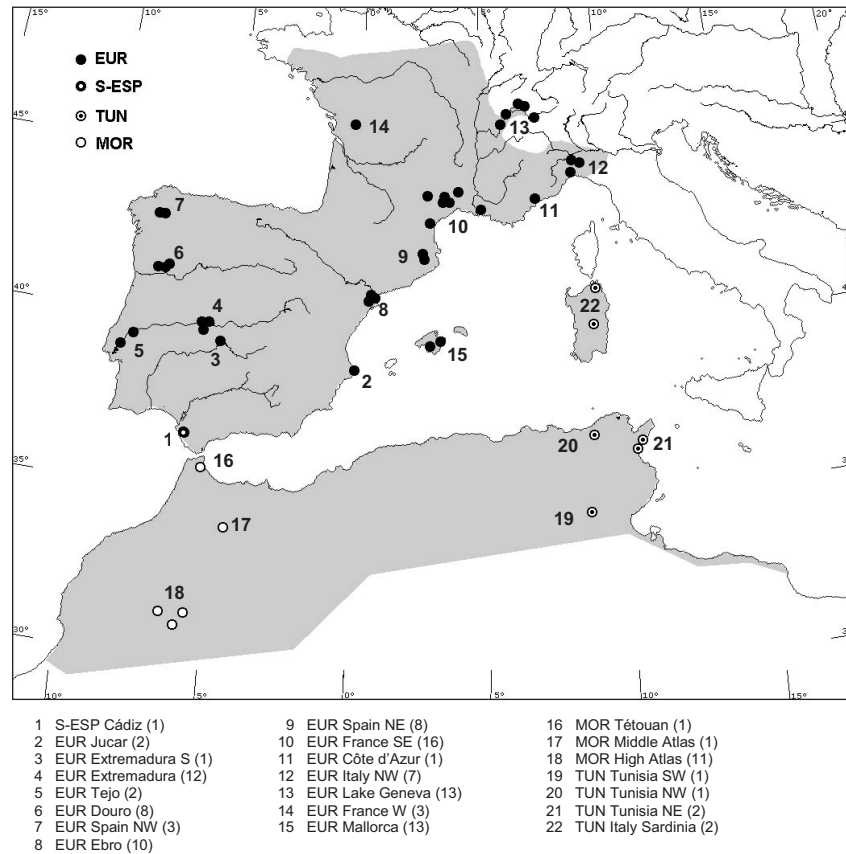


Abb. 15: Geographische Verbreitung der drei Haplotyp-Hauptgruppen sowie der südspanischen Untergruppe bei *Natrix maura*.

Geographical distribution of the 3 main haplotype groups, as well as the southern Iberian subgroup, of *Natrix maura*.

dentliche Ähnlichkeit von Würfel- und Vipernatter ein Produkt ihrer übereinstimmenden vollaquatischen Lebensweise ist (konvergente Evolution).

Bei der Vipernatter wurden drei phylogeographische Gruppen gefunden (Abb. 14 und 15). Die ursprünglichste dieser Gruppen bewohnt Tunesien und Sardinien, die zweite beschränkt sich auf Marokko und die dritte umfasst ganz Westeuropa. Unkorrigierte genetische Distanzen zwischen afrikanischen und europäischen Populationen betragen 3,9 bis 4,6 %, während Distanzen zwischen verschiedenen europäischen Populationen nicht größer als 1,2 % sind. Unter Annahme einer »molekularen Uhr« mit einer Durchschnittsrate von 1,3 % Differenz zwischen zwei Linien, die sich seit einer Million Jahren unabhängig voneinander entwickelt haben, fällt die Auftrennung der drei Gruppen in das mittlere bis späte Pliozän (3–3,5 Mio. Jahre). Die Differenzierung der europäischen *N. maura*, so wie sie heute beobachtet wird, hätte entsprechend vor etwa einer Mio. Jahren begonnen, was mit dem Einsetzen der großen pleistozänen Glazialzyklen zusammenfällt. Eine niedrigere genetische Diversität bei nördlicheren Populationen Europas legt nahe, dass auf der Iberischen Halbinsel mehrere eiszeitliche Refu-

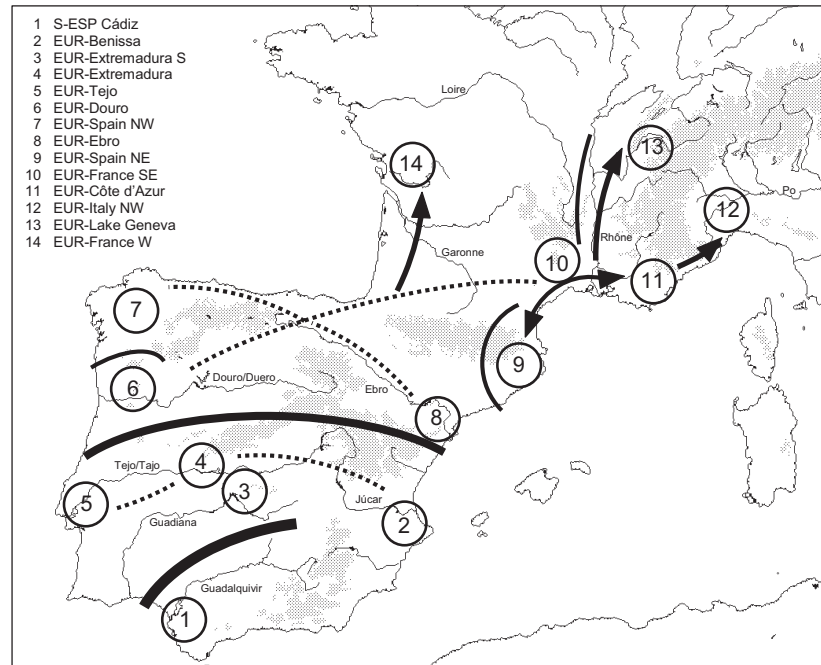


Abb. 16: Rekonstruktion der phylogeographischen Differenzierung der Vipernatter (*Natrix maura*) in Europa. Hauptdrainagesysteme und Gebirgsketten eingezeichnet. Durchgezogene schwarze Linien: Barrieren für Genfluss; punktierte Linien: Genfluss über größere Distanz; Pfeile: wahrscheinliche postpleistozäne Arealausweitung.

Reconstruction of the phylogeographic differentiation in the Viperine snake (*Natrix maura*) in Europe. Main drainage systems and mountain barriers are indicated. Bold lines designate inferred barriers for gene flow; dotted lines show long distance gene flow; arrows indicate probable post Pleistocene range extensions.

gien existiert haben, von wo aus eine oder wenige Gründerlinien postglazial Frankreich, die Schweiz und Nordwestitalien kolonisiert haben (Abb. 16).

Die Vipernattern auf Mallorca weisen identische Haplotypen mit solchen auf dem europäischen Festland auf, was nahe legt, dass die mallorquinischen *N. maura* in relativ junger Zeit durch den Menschen auf die Insel gebracht wurden, auf keinen Fall jedoch schon seit der Trennung Mallorcas vom Festland dort existierten (GUICKING et al. im Druck). Entsprechendes gilt für die sardischen Vipernattern.

Die Vipernattern auf Mallorca weisen identische Haplotypen mit solchen auf dem europäischen Festland auf, was nahe legt, dass die mallorcinischen *N. maura* in relativ junger Zeit durch den Menschen auf die Insel gebracht wurden, auf keinen Fall jedoch schon seit der Trennung Mallorcas vom Festland dort existierten (GUICKING et al. im Druck). Entsprechendes gilt wahrscheinlich für die sardischen Vipernattern.

ISSR-Gele wurden mit drei verschiedenen Primern angefertigt:  $(GACA)_4$ ,  $(GATA)_4$  und  $(GAA)_5$  und in Bezug auf gruppenspezifische Banden ausgewertet. Trotz eines hohen Polymorphiegrades ergaben sich bei *N. maura* nur relativ wenige gruppenspezifische Fragmente, sie unterstützen jedoch die mit Hilfe der Cytochrom b-Sequenzen gefundenen Gruppierungen.

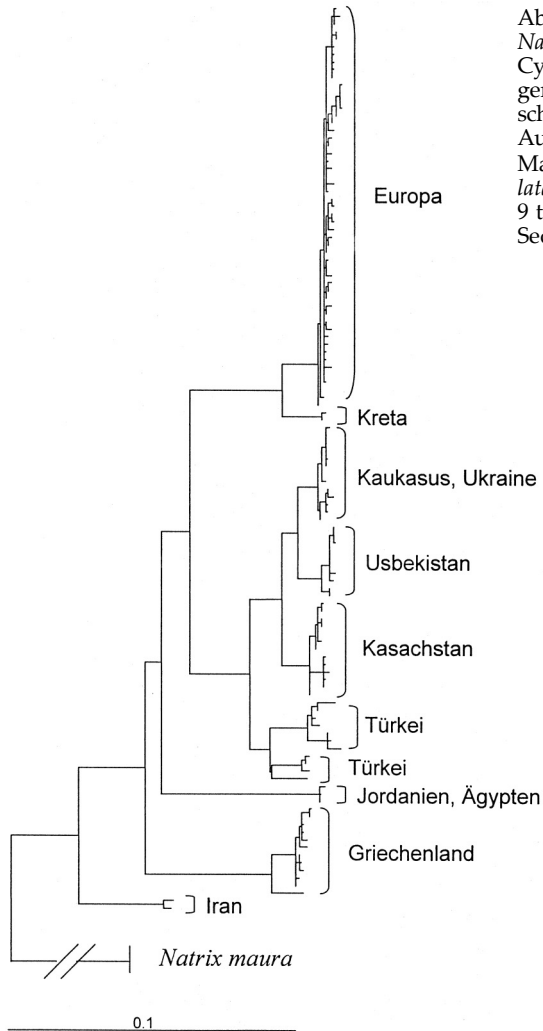


Abb. 17: Maximum Likelihood Phylogramm für *Natrix tessellata*, basierend auf vollständigen Cytochrom b-Sequenzen. Es werden 9–10 große genetische Linien (Haplotypengruppen) unterschieden. Sequenzen von *Natrix maura* dienen als Außengruppe.

Maximum likelihood phylogram for *Natrix tessellata*, based on complete Cytochrome b sequences. 9 to 10 main genetic groups can be distinguished. Sequences of *Natrix maura* were used as outgroup.

Bei der Würfelnatter (Abb. 17 und 18) betragen die genetischen Distanzen (Cytochrom b) zwischen verschiedenen Populationen bis zu 10 %. Die phylogenetisch älteste Linie existiert im Iran. Die übrigen Hauptgruppen entsprechen Populationen in Ägypten/Jordanien, Usbekistan, der Osttürkei, Kreta und dem größten Teil Europas, mit Ausnahme einer möglicherweise sehr lange isolierten Population in Südgriechenland (Peloponnes und Epirus). Eine Linie ist von Georgien über die Ukraine bis nach Zentralkasachstan verbreitet, eine weitere scheint bisher auf Ostkasachstan beschränkt (die östlichsten Populationen aus Nordwestchina konnten noch nicht untersucht werden). Die Würfelnattern der europäischen Linie zeichnen sich durch eine unerwartet geringe genetische Differenzierung aus. Diese Daten legen die Hypothese nahe, dass die Populationen der europäischen Linie möglicherweise auf nur eine kleine Refugialpopulation zurückgehen, während die meisten europäischen Populationen während einer der letzten pleistozänen Glazialzeiten ausgestorben sind. Eine oder einige weni-



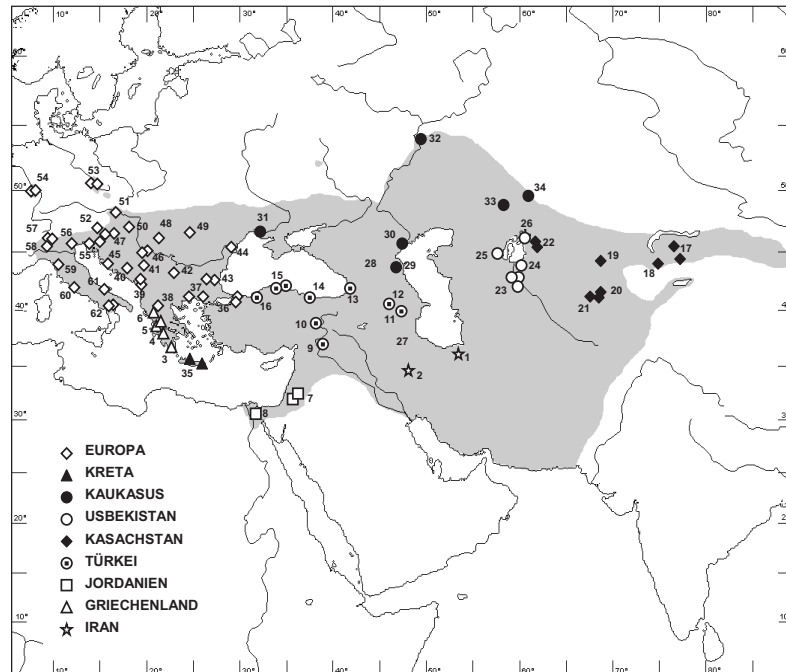


Abb. 18: Geographische Verbreitung der Haplotypengruppen bei *Natrix tessellata*.  
Geographic distribution of Cytochrome b haplotype groups in *Natrix tessellata*.

ge Linien vom Balkan haben Mitteleuropa kolonisiert. Ihre Nachkommen finden sich heute von Rumänien bis Deutschland. Genetische Unterschiede zwischen italienischen und mitteleuropäischen Populationen lassen vermuten, dass Italien in einer separaten Invasion vom Balkan her kolonisiert wurde und seitdem kein Kontakt mit anderen europäischen Populationen bestand.

Die mit Hilfe der **ISSR-PCR** erstellten Fragmentmuster bestätigen die meisten der mit Cytochrom b-Sequenzen ermittelten Haplotypengruppen. Besonders starke Unterstützung durch mehrere gruppenspezifische Banden finden die ostkasachische Gruppe, die griechische Gruppe, die Linie von Kreta und die festlandeuropäische Gruppe (Abb. 19). Die Haplotypenlinien aus Kleinasien und Zentralasien weisen einen sehr hohen Polymorphiegrad auf, sind aber als Gruppen nur undeutlich voneinander getrennt, was auf eine vergleichsweise starke Durchmischung dieser Linien in der evolutiven Vergangenheit hindeutet und gegen eine Trennung dieser Linien auf Art-niveau spricht. Für sich genommen könnten allerdings die zentralasiatischen ebenso wie die iranischen und die (mit ISSR-PCR nicht untersuchten) jordanisch-ägyptischen Würfelnattern separate evolutive Arten darstellen. Die griechische Gruppe vermittelt im ISSR-Baum zwischen den geographisch benachbarten Populationen in Kreta der Nordtürkei und Europa, was wiederum für früheren Genfluss zwischen diesen Gruppen und gegen getrennte Arten spräche. Allerdings ist dieses Verzweigungsmuster nicht durch Bootstrap-Werte gestützt. Für eine isolierte Stellung der griechischen Gruppe spricht dagegen die, wenn auch geringe (54 %) statistische Unterstützung dieser Gruppe auch bei der ISSR.

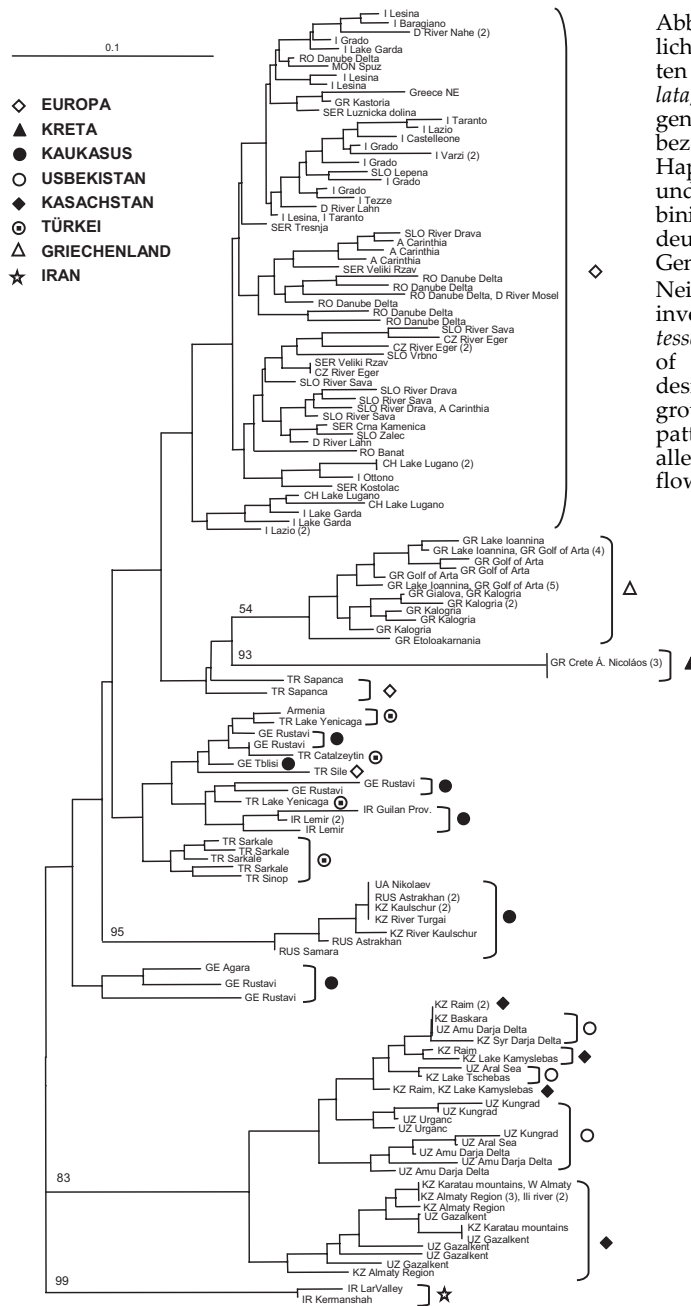


Abb. 19: Neighbor-Joining-Ähnlichkeitsdiagramm der untersuchten Populationen von *Matrix tessellata*, erstellt nach Übereinstimmungen von ISSR-Banden. Die Symbole bezeichnen die Cytochrom b-Haplotypengruppen (vgl. Abb. 17 und 18). Da ISSR-Spektren rekombinierende Allele wiedergeben, deuten gemischte Gruppen auf Genfluss zwischen Haplotypen hin. Neighbor joining cluster tree of the investigated populations of *Matrix tessellata*, derived from similarities of ISSR band patterns. Symbols designate Cytochrome b haplotype groups (see figs 17 and 18). As ISSR patterns represent recombining alleles, mixed groups indicate gene flow between haplotypes.

Die **deutschen Würfelnattern** unterscheiden sich nur anhand weniger Basenpositionen innerhalb des Cytochrom b-Gens von allen übrigen europäischen Tieren und auch untereinander. Ihre nächsten Verwandten stellen die Populationen aus der tschechischen Republik und dem Donaugebiet dar (GUICKING et al. 2005).

#### 4 Diskussion

Es lässt sich zusammenfassen, dass ähnliche biogeographische Muster bei mehreren in bestimmten Regionen Europas einheimischen Reptilienarten festzustellen sind.

Die meisten untersuchten Arten erreichten Mitteleuropa von (Süd-)Osten her. Die klassische Ost-West-Disjunktion, mit je einem Einwanderungsvorstoß von Südwesten und Südosten unter Umgehung der Alpen, tritt bei der Gelbgrünen Zornnatter und bei den Smaragdeidechsen auf (JÖGER et al. 2001, NETTMANN 2001). In diesen Fällen ist die Kontaktzone zwischen West- und Ostform in Italien bzw. im angrenzenden Slowenien auszumachen. Andere, weiter verbreitete Arten, wie die Europäische Sumpfschildkröte und die Äskulapnatter, zeigen dieses Muster ebenfalls, doch ist es bei ihnen weniger deutlich ausgeprägt, und die Westform hat bei ihnen Mitteleuropa nicht erreicht. Stattdessen hat sich bei diesen Arten die süditalienische Populationsgruppe stärker differenziert, so dass dort sogar die Abgrenzung eigener lokaler Arten gerechtfertigt scheint. Noch weiter differenziert ist die Fauna der Iberischen Halbinsel, doch handelt es sich hier meist um Artenkomplexe, die Mitteleuropa nicht erreicht haben und daher hier nicht behandelt werden. Sumpfschildkröte und Vipernatter haben genetisch differenzierte iberische Gruppen herausgebildet, deren Ausstrahlung über die Pyrenäen hinaus sehr begrenzt ist. Aber gerade diese beiden Arten zeigen deutliche Beziehungen nach Nordafrika. Würfelnatter und Zauneidechse haben dagegen ihre größte genetische Vielfalt in Vorderasien bzw. im Kaukasus erreicht. Bei beiden existieren aber auch alte Reliktpopulationen auf der Balkanhalbinsel. Bei diesen genetisch sehr deutlich differenzierten Populationen muss der Prozess der Artbildung weit fortgeschritten sein, so dass – bei entsprechender Bestätigung auf morphologischer Ebene – weitere Artbeschreibungen möglich erscheinen.

So bestätigt sich im Kern die Hypothese von der langsamen, aber kontinuierlichen Artendifferenzierung in den klassischen Refugialgebieten des Mittelmeerraums und Vorderasiens, namentlich den Halbinseln Iberiens, Italiens, des Balkan sowie des kaspischen Raums. Verschiedene Gruppen innerhalb der untersuchten Artenkomplexe verblieben offenbar in den Refugialräumen und überdauerten dort lokal bis heute. Dabei erfuhren sie mit der Zeit maximale genetische Differenzierung, die bei einigen Komplexen zu kryptischen, erst im Zuge unserer Analyse erkannten Arten führte (*Lacerta bilineata*, *Elaphe lineata*, *Emys trinacris*). Dass es sich hierbei um italienische Taxa handelt, belegt nicht eine besonders starke Isolation der Apenninhalbinsel, denn auf der Iberischen Halbinsel haben sich oft ganz eigene, gut bekannte Arten entwickelt (*Lacerta schreiberi*, *Elaphe scalaris*, während die iberische *Emys*-Haplotypengruppe IV ähnlich differenziert ist wie *E. trinacris*, aber noch keine artliche Anerkennung erfahren hat). Vergleichbar ist die Situation im kaukasischen Raum (*Lacerta strigata*, *L. [agilis] boemica*, *Elaphe persica*, *Emys*-Haplotypengruppe VII). Lediglich auf dem Balkan stellt sich die Situation etwas anders dar.

Südosteuropäische Vertreter verschiedener Gruppen unternahmen offenbar im Holozän Vorstöße nach Mitteleuropa (während die Alpen und die Pyrenäen ihre postulierte Funktion als Ausbreitungsbarrieren offenbar tatsächlich wahrnahmen). Expansionen hat es sicher in den Interglazialen öfter gegeben; sie wurden jedoch durch Retraktionen während der Glazialphasen wieder zunichte gemacht und hinterließen kaum

Spuren in den nördlichen Arealteilen. Auf dem ökologisch stark strukturierten Balkan scheinen einige frühere Einwanderungswellen (bei *Emys obicularis*, *Lacerta agilis*, *Natrix tessellata*) in den Genomen der Arten noch heute präsent zu sein. Die dortigen Populationen von *Lacerta viridis* und *Elaphe longissima* sind in dieser Beziehung noch zu analysieren.

Ein Vergleich mit der von uns ebenfalls studierten, hier aber nicht näher behandelten Gattung *Vipera* kann das Gesagte bestätigen (KALYABINA-HAUF ET AL. 2005, ZUFFI 2002): Einwanderung nach Mitteleuropa von (Süd-) Osten (*Vipera berus*, *V. ammodytes*, *V. ursinii*), in geringerem Maße von Westen (*V. a. aspis*); geringe Ausbreitungsdynamik von der Iberischen und der Apenninhalbinsel (*V. latastei* und *V. aspis hugyi*) verbleiben auf ihren jeweiligen Halbinseln; starke Differenzierung im kaukasischen Raum (*V. kaznakovi*-Komplex) und Relikte auf dem Balkan (*V. berus bosniensis*, *V. ursinii* ssp.).

So ist zu erwarten, dass auch weitere Artenkomplexe flugunfähiger Tiere ähnliche Muster aufweisen wie die hier studierten Reptilien.

### Danksagung

Es ist leider unmöglich, den vielen Kollegen, die uns bei der komplexen Aufgabe der Materialbeschaffung aus ganz Europa (und darüber hinaus) behilflich waren, einzeln zu danken. Ihnen sei daher pauschal gedankt. Besondere Anerkennung gebührt PD Dr. UWE FRITZ, der nicht nur seine vielfältigen Kontakte in den Dienst der Beschaffung von Sumpfschildkröten für dieses Projekt stellte, sondern sich auch konstruktiv an der Interpretation und Publikation der Ergebnisse beteiligte. Wichtige Beiträge verdanken wir außerdem TONI AMANN, HEDI SAUER-GÜRTH, SYBILLE HANKA, ROBIN LAWSON, LUC LEGAL, K. D. MILTO, HAKON NETTMANN, ESKANDAR RASTEGAR-POUYANI, EDOARDO RAZZETTI, SILKE RYKENA, ROGER THORPE, MICHAEL VEITH und MARCO ZUFFI.

## 7 Literatur

- ALLEN, P. J., W. AMOS, P. P. POMEROY & S. D. TWISS (1995): Microsatellite variation in grey seals (*Halichoerus gryphus*) shows evidence of genetic differentiation between two British breeding colonies. – *Molecular Ecology* 4: 653–662.
- AMANN, T., E. RAZZETTI & U. JÖGER (2001): La zona di contatto tra *Lacerta bilineata* (Daudin, 1802) e *Lacerta viridis* (Laurenti, 1768) in Italia. – *Atti della 3° Congresso Nazionale, Societas Herpetologica Italica. Pianura (science e storia dell'ambiente padano)* 13/2001: 261–264.
- AMANN, T., S. RYKENA, U. JÖGER, H.-K. NETTMANN & M. VEITH (1997): Zur artlichen Trennung von *Lacerta bilineata* Daudin, 1802, und *L. viridis* (Laurenti, 1768). – *Salamandra* 33: 255–268.
- AVISE, J. C. (1986): Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. – *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 312: 325–342.
- AVISE, J. C. (1994): *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. – New York (Chapman & Hall).
- AVISE, J. C., J. ARTNOLD, R. M. BALL, E. BERMINGHAM, T. LAMB, J. E. NEIGEL, C. A. REEB & N. C. SAUNDERS (1987): Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489–522.
- BARTON, N. H. & G. M. HEWITT (1985): Analysis of hybrid zones. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 113–148.
- BISCHOFF, W. (1988): Zur Verbreitung und Systematik der Zauneidechse, *Lacerta agilis* Linnaeus 1758. – *Mertensiella* 1: 11–30.

- BRÜCKNER, M., B. KLEIN, A. DÜRING, T. MENDEL, S. RABUS & J. T. SOLLER (2001): Phylogeographic analysis of the *Lacerta viridis/bilineata* complex: molecular patterns and distribution. – *Mertensiella* 13: 45–51.
- BUSACK, S. D. (1986): Biogeographic analysis of the herpetofauna separated by the formation of the Strait of Gibraltar. – *National Geographic Research* 2/1: 17–36.
- DELATTIN, G. (1967): Grundriss der Zoogeographie. – Stuttgart (Fischer).
- FRITZ, U. (1996): Zur innerartlichen Variabilität von *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). 5b. Innerartliche Hierarchie und Zoogeographie. – *Zoologische Abhandlungen aus dem Staatlichen Museum für Tierkunde Dresden* 49: 31–71.
- FRITZ, U., D. GUICKING, P. LENK, U. JOGER & M. WINK (2004): When turtle distribution tells European history: mtDNA haplotypes of *Emys orbicularis* reflect in Germany former division by the Iron Curtain. – *Biologia* 59, Suppl. 14: 19–25.
- FRITZ, U., T. FATTIZZO, D. GUICKING, S. TRIPEPI, M. G. PENNISI, P. LENK, U. JOGER & M. WINK (2005): A new cryptic species of pond turtle from South Italy, the hottest spot in the range of the genus *Emys* (Reptilia: Testudines: Emydidae). – *Zoologica Scripta*: 1–21.
- GODINHO, R., E. G. CRESPO, N. FERRAND & D. J. HARRIS (2005): Phylogeny and evolution of the green lizards, *Lacerta* spp. (Squamata: Lacertidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. – *Amphibia-Reptilia* 26: 271–285.
- GUICKING, D. (2004): Molecular phylogeography and evolution of western Palearctic water snakes (genus *Natrix*, Reptilia). – Dissertation Universität Heidelberg.
- GUICKING, D., R. A. GRIFFITHS, R. D. MOORE, U. JOGER & M. WINK (im Druck): Introduced alien or persecuted native? Resolving the origin of the viperine snake (*Natrix maura*) on the island of Mallorca. – *Biodiversity and Conservation*.
- GUICKING, D., A. HERZBERG & M. WINK (2005): Population genetics of the dice snake (*Natrix tessellata*) in Germany: implications for conservation. – *Salamandra* 40: 217–234.
- GUICKING, D., U. JOGER & M. WINK (2003): Phylogeography of the Viperine snake *Natrix maura* and the Dice snake *Natrix tessellata*: First results. – *Biota* 3: 49–59.
- GUICKING, D., R. LAWSON, U. JOGER & M. WINK (2006): Evolution and phylogeny of the genus *Natrix* (Serpentes: Colubridae). – *Biological Journal of the Linnean Society* 87: 127–143.
- HANKA, S. & U. JOGER (1998): *Emys orbicularis* in the Enkheimer Ried near Frankfurt/Main, Hessa. – *Mertensiella* 10: 135–140.
- IVANOV, M. (1997): Vývoj kenozické hadí fauny evropy. (The evolution of European Cenozoic snake fauna). In: HLADÍLOVÁ, S. (ed.): Dynamics of interaction between marine and continental environments: 59–91. – Brno (Masaryk University).
- JOGER, U. (1996): Molekularbiologische Methoden in der phylogenetischen Rekonstruktion. – *Zoologische Beiträge N. F.* 37: 77–131.
- JOGER, U., T. AMANN, P. LENK & U. WILLAND (1998): Molekulare Merkmale und das phylogenetische Artkonzept. – *Zoologische Abhandlungen, Staatliches Museum für Tierkunde Dresden* 50/Suppl. »100 Jahre Artkonzepte in der Zoologie«: 109–123.
- JOGER, U., T. AMANN & M. VEITH (2001): Phylogeographie und genetische Differenzierung im *Lacerta viridis-bilineata*-Komplex. – *Mertensiella* 13: 60–68.
- JOGER, U. & P. LENK (1997): Entnahme und Behandlung von Blutproben bei Amphibien und Reptilien im Freiland. – *Mertensiella* 7: 329–340.
- JOGER, U. & S. STEINFARTZ (1994): Electrophoretic investigations in the evolutionary history of the West Mediterranean *Salamandra*. – *Mertensiella* 4: 241–254.
- KALYABINA, S. A., K. D. MILTO, N. B. ANANJEVA, L. LEGAL, U. JOGER & M. WINK (2001): Phylogeography and systematics of *Lacerta agilis* based on mitochondrial cytochrome b gene sequences: first results. – *Russian Journal of Herpetology* 8: 149–159.
- KALYABINA-HAUF, S. A. (2003): Phylogeography and subspecific structure of the widely distributed lizard species, *Lacerta agilis* L., 1758. – Dissertation Universität St. Petersburg (russisch).

- KALYABINA-HAUF, S. A., K. D. MILTO, N. B. ANANJEVA, U. JÖGER, T. I. KOTENKO & M. WINK (2004): Reevaluation of the status of *Lacerta agilis tauridica* Suchov, 1926. – Russian Journal of Herpetology 11: 65–72.
- KALYABINA-HAUF, S., S. SCHWEIGER, U. JÖGER, W. MAYER & M. WINK (2004): Phylogeny and systematics of adders (*Vipera berus* complex). – Mertensiella 15: 7–16.
- KINZELBACH, R. (1988): Die Europäische Sumpfschildkröte (*Emys orbicularis*) im Einzugsgebiet des Rheins. – Zeitschrift für angewandte Zoologie 75: 385–419.
- LENK, P. (1993): Untersuchungen zur innerartlichen Gliederung der Äskulapnatter, *Elaphe longissima* (Laurenti, 1768). – Diplomarbeit Technische Hochschule Darmstadt, unveröff.
- LENK, P. (1997): Molekularbiologische Untersuchungen zur Mikroevolution der Europäischen Sumpfschildkröte *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). – Dissertation Technische Universität Darmstadt.
- LENK, P., U. FRITZ, U. JÖGER & M. WINK (1999): Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). – Molecular Ecology 8: 1911–1922.
- LENK, P., S. HANKA, U. FRITZ, U. JÖGER, & M. WINK (1997): Die Europäische Sumpfschildkröte im Enkheimer Ried bei Frankfurt/M. – Elaphe 5: 70–75.
- LENK, P. & U. JÖGER (1994): Genetic relationships between populations and intraspecific subdivision of *Elaphe longissima* (Laurenti, 1768). – Amphibia-Reptilia 15: 363–373.
- LENK, P., U. JÖGER, U. FRITZ, P. HEIDRICH & M. WINK (1998): Phylogeographic patterns in the mitochondrial cytochrome b gene of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). – Mertensiella 10: 159–175.
- LENK, P., U. JÖGER & M. WINK (2001): Phylogenetic relationships among European ratsnakes of the genus *Elaphe* Fitzinger based on mitochondrial DNA sequence comparisons. – Amphibia-Reptilia 22: 329–339.
- LENK, P. & M. WINK (1997): A RNA/RNA heteroduplex cleavage analysis to detect rare mutations in populations. – Molecular Ecology 6: 233–237.
- LENK, P. & W. WÜSTER (1999): A multivariate approach to the systematics of Italian ratsnakes of the *Elaphe longissima* complex (Reptilia: Colubridae): Revalidation of Camerano's *Callopeltis longissimus* var. *lineata*. – Herpetological Journal 9: 153–162.
- MERTENS, R. & H. WERMUTH (1960): Die Amphibien und Reptilien Europas. – Frankfurt/M. (Kramer).
- MURPHY, R. W., J. W., JR., BUTH, D. G. & C. H. HAUFLE (1991): Proteins I: Isoenzyme Electrophoresis. In: HILLIS, D. M. & C. MORITZ (eds.): Molecular Systematics. Sunderland, Mass.: 45–126.
- MYERS, R. M., V. C. SHEFIELD & D. R. VOX (1988): Detection of single base changes in DNA: Ribonuclease cleavage and denaturing gradient gel electrophoresis. In: DAVIES, K. E. (ed.): Genome Analysis: A practical Approach: 95–139. – Oxford (IRL Press).
- NAGY, Z. T. (2004): Zur molekularen Systematik und Phylogeographie altweltlicher Nattern (Squamata: Serpentes: Colubridae sensu lato). – Dissertation Universität Heidelberg.
- NAGY, Z. T., U. JÖGER, D. GUICKING, T. AMANN & M. WINK (2002): Phylogeography of the European whip snake, *Coluber (Hierophis) viridiflavus* Lacépède, 1789, inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome b gene and ISSR genomic fingerprinting. – Biota 3: 109–118.
- NAGY, Z. T., R. LAWSON, U. JÖGER & M. WINK (2004): Molecular systematics of racers, whipsnakes and relatives (Reptilia: Colubridae) using mitochondrial and nuclear markers. – Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 42: 223–233.
- NETTMANN, H.-K. (2001): Die Smaragdeidechsen (*Lacerta* s. str.) – Eine Übersicht über Verwandtschaft und Formenvielfalt. – Mertensiella 13: 11–32.
- NETTMANN, H.-K. & S. RYKENA (1984): *Lacerta viridis* (Laurenti, 1768) – Smaragdeidechse. In: BÖHME, W. (Hrsg.): Handbuch der Amphibien und Reptilien Europas, Bd. 2/1: 129–180. – Wiesbaden (Aula).
- POSADA, D. & K. A. CRANDALL (1998): Modeltest: testing the model of DNA substitution. – Bioinformatics 14: 817–818.
- ROY, M. S., E. GEFFEN, D. SMITH, E. A. OSTRANDER & R. K. WAYNE: Patterns of differentiation and hybridization in North American Wolf-like canids revealed by analysis of microsatellite loci. – Molecular Biology and Evolution 11: 554–570.

- RYKENA, S. (1991): Kreuzungsexperimente zur Prüfung der Artgrenzen im Genus *Lacerta* sensu stricto. – Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum Berlin 67: 55–68.
- RYKENA, S. (1996): Experimental interspecific hybridization in the genus *Lacerta*. – Israel Journal of Zoology 42: 171–184.
- RYKENA, S. (2001): Experimental hybridization in green Lizards (*Lacerta* s. str.), a tool to study species boundaries. – Mertensiella 13: 78–88.
- SAMBROOK, J. & D. W. RUSSELL (2001): Molecular Cloning. A laboratory manual. – New York (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- SANGER, F., S. NICKLEN & A. R. COULSON (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. – Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA 74: 5463–5467.
- SCHÄTTI, B. & S. VANNI (1986): Intraspecific variation in *Coluber viridiflavus* Lacépède, 1789, and validity of its subspecies (Reptilia, Serpentes, Colubridae). – Revue Suisse de Zoologie 93: 219–232.
- TABERLET, P., L. FUMAGALLI, A.-G. WUST-SAUCY & J.-F. COSSON (1998): Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. – Molecular Ecology 7: 453–464.
- UTIGER, U., N. HELFENBERGER, B. SCHÄTTI, C. SCHMIDT, M. RUF & V. ZISWILER (2002): Molecular systematics and phylogeny of Old and New World ratsnakes, *Elaphe* auct., and related genera (Reptilia, Squamata, Colubridae). – Russian Journal Herpetology 9: 105–124.
- WINK, M., D. GUICKING & U. FRITZ (2001): Molecular evidence for hybrid origin of *Mauremys iversoni* Pritchard et McCord, 1991, and *Mauremys pritchardi* McCord, 1997 (Reptilia: Testudines: Bataguridae). – Zoologische Abhandlungen aus dem Staatlichen Museum für Tierkunde Dresden 51: 41–50.
- WINK, M., H. SAUER-GÜRTH, F. MARTINEZ, G. DOVAL, G. BLANCO & O. HATZOFÉ (1998): The use of (GACA)<sub>4</sub> - PCR to sex Old World vultures (Aves: Accipitridae). – Molecular Ecology 7: 779–782.
- WINK, M. & H. WEHRLE (1994): PCR im medizinischen und biologischen Labor. – Darmstadt (GIT-Verlag).
- ZUFFI, M. A. L. (2002): A critique of the systematic position of asp viper subspecies *Vipera aspis aspis* (Linnaeus, 1758), *Vipera aspis atra* Meisner, 1820, *Vipera aspis hugyi* Schinz, 1833 and *Vipera aspis zimmeri* Kramer, 1958. – Amphibia-Reptilia 24: 238–241.