

Molekulare Phylogenie und Evolutionsgeschichte der Gattung *Natrix*, mit Bemerkungen zur innerartlichen Gliederung von *N. natrix*

DANIELA GUICKING, ULRICH JOGER & MICHAEL WINK

Abstract

Molecular phylogeny and evolutionary history of the genus Natrix, with notes on the intraspecific differentiation of N. natrix

To elucidate the evolutionary history of the genus *Natrix* and to address questions of intraspecific variation in *N. natrix*, we analysed sequences of four mitochondrial genes. With the help of fossil and paleogeographic information a molecular clock was calibrated to estimate the most important divergence times. Our data clearly support a genus phylogeny with *N. maura* at the basal position and *N. natrix* and *N. tessellata* as sister species. With evolutionary rates of 1-1.35 % divergence per one million years and genetic distances of 13.4-14.5 % between species and up to 8.9 % within species, the three species probably evolved independently since the middle Miocene and intraspecific differentiation most likely started in the late Miocene. Intraspecific genetic variation in all three species is clearly correlated to geographic regions. Although the available sampling is far too small to allow for a comprehensive discussion of intraspecific differentiation in *N. natrix*, our data clearly support a European origin for the species and suggest that at least five evolutionary lineages can be distinguished on the Eurasian mainland. These lineages correspond to populations from (1) the Iberian peninsula, (2) Italy, western Germany, France, and England, (3) Germany east of the river Rhine and Scandinavia, (4) the Balkans and southern Greece, and (5) Turkey, the Caucasian countries, Russia and Kazakhstan. A comparison of these lineages with the phenotypically derived subspecies in *N. natrix* supports the existence of a contact zone between two distinct taxonomical lineages in central Europe as well as the differentiation of the Iberian (*N. n. astreptophora*) and western European populations (*N. n. helvetica*).

Key words: *Natrix natrix*, grass snake, phylogeography, systematics, mitochondrial genes: cytochrome b, ND1, ND2, ND4.

Résumé

Phylogénie moléculaire et histoire de l'évolution du genre Natrix, avec des remarques concernant la subdivision de l'espèce N. natrix

Nous avons étudié les séquences de quatre gènes mitochondriaux pour éclairer la phylogénie et l'historique de l'évolution du genre *Natrix* et la variabilité intraspécifique de *N. natrix*. En tenant compte d'informations fossiles et paléogéologiques, nous avons recouru aux différences entre ces séquences pour dater l'apparition des principales divergences à l'aide d'une « horloge moléculaire ». Nos données corroborent clairement une phylogénie plaçant *N. maura* à la base et désignant *N. natrix* et *N. tessellata* comme des branches filles. Avec des taux d'évolution s'élevant à 1-1,35 % de divergence de séquence par million d'années et des distances génétiques atteignant 13,4-14,5 % entre les espèces et 8,9 % au sein des espèces, l'origine des trois espèces récentes peut être datée du milieu du miocène, le début de la différenciation intraspécifique remontant au miocène tardif. La variation génétique intraspécifique est clairement structurée au niveau géographique chez les trois espèces. Bien que l'échantillonnage soit encore insuffisant pour discuter de manière approfondie de la différenciation intraspécifique chez *N. natrix*, nos données montrent clairement que l'espèce est d'origine européenne et qu'aux moins cinq lignées génétiques peuvent être distinguées sur le continent eurasiatique. Ces lignées correspondent aux populations ibériques (1), italiennes, françaises, anglaises et ouest-allemandes (2), germaniques (à l'Est du Rhin) et scandinaves (3), balkaniques et hellènes (4), turques, caucasiennes, russes et kazakhes (5). Une comparaison avec les sous-espèces de *N. natrix* définies selon le phénotype confirme l'existence d'une zone de contact entre deux lignées taxonomiques distinctes en Europe centrale, ainsi que

la différenciation entre les populations ibériques (*N. n. astreptophora*) et d'Europe occidentale (*N. n. helvetica*).

Mots-clés: *Natrix natrix*, couleuvre à collier, phylogéographie, systématique, gènes mitochondriaux: cytochrome b, ND1, ND2, ND4.

Zusammenfassung

Um die Phylogenie und Evolutionsgeschichte der Gattung *Natrix* zu analysieren und die innerartliche Variabilität von *N. natrix* zu beleuchten, untersuchten wir Sequenzen von vier mitochondrialen Genen. Unter Einbezug fossiler und paläogeologischer Informationen verwendeten wir diese Sequenzunterschiede, um mithilfe einer „molekularen Uhr“ die wichtigsten Divergenzereignisse zu datieren. Unsere Daten unterstützen klar eine Gattungsphylogenie, in der *N. maura* an basaler Position steht und *N. natrix* und *N. tessellata* Schwesterarten darstellen. Mit Evolutionsraten von 1-1,35 % Sequenzdivergenz pro eine Million Jahre und genetischen Distanzen von 13,4-14,5 % zwischen den Arten und bis zu 8,9 % innerhalb der Arten lässt sich der Ursprung der drei rezenten Arten auf das Mittlere Miozän und der Beginn innerartlicher Differenzierung auf das Späte Miozän datieren. Die innerartliche genetische Variation ist in allen drei Arten geographisch klar strukturiert. Obwohl die derzeitige Probenauswahl noch ungenügend ist, um die innerartliche Differenzierung von *N. natrix* umfassend zu diskutieren, lassen unsere Daten keinen Zweifel daran, dass *N. natrix* einen europäischen Ursprung hat und auf dem eurasischen Festland mindestens fünf genetische Linien unterschieden werden können. Diese Linien umfassen Populationen von (1) der Iberischen Halbinsel, aus (2) Italien, West-Deutschland, Frankreich und England, (3) Deutschland östlich des Rheins und Skandinavien, (4) den Balkanländern und Süd-Griechenland und (5) der Türkei, den Kaukasusländern, Russland und Kasachstan. Ein Vergleich dieser Linien mit den phänotypisch begründeten Unterarten von *N. natrix* bestätigt die Existenz einer Kontaktzone von zwei unterschiedlichen taxonomischen Linien in Mitteleuropa sowie die Differenzierung der iberischen (*N. n. astreptophora*) und westeuropäischen Populationen (*N. n. helvetica*).

Schlagwörter: *Natrix natrix*, Ringelnatter, Phylogeographie, Systematik, mitochondriale Gene: Cytochrom b, ND1, ND2, ND4.

1 Einleitung

Noch immer sind viele Fragen zur Evolutionsgeschichte und innerartlichen Gliederung der europäischen Wassernattern der Gattung *Natrix* ungeklärt (BÖHME 1999, KABISCH 1999). Die Gattung *Natrix* umfasst nachzeitigem Kenntnisstand drei Arten, Vipernatter *N. maura* (LINNAEUS, 1758), Würfelnatter *N. tessellata* (LAURENTI, 1768) und Ringelnatter *N. natrix* (LINNAEUS, 1758). Die Validität einer vierten Art, der Großkopf-Ringelnatter *N. megalcephala* (ORLOV & TUNIYEV 1987), wird in Frage gestellt (BÖHME 1999). Von den drei anerkannten Arten weist *N. natrix* die größte ökologische Toleranz auf und ist am weitesten verbreitet. Ihr Verbreitungsgebiet reicht im Norden von England und Wales über Skandinavien, Finnland ostwärts durch Russland bis zum Baikalsee. Die Ringelnatter kommt in ganz Mittel- und Südeuropa vor und ist im Mittleren Osten und relikitär in Nordafrika beheimatet (KABISCH 1999). Im Gegensatz dazu sind *N. tessellata* und *N. maura* auf wärmere Gebiete im Süden Europas und Zentralasiens beschränkt und zeigen eine engere Bindung an aquatische Habitats als *N. natrix*. *N. maura* kommt in Nordwest-Afrika, auf der Iberischen Halbinsel und nordwärts bis nach Mittel-Frankreich vor (SCHÄTTI 1999). *N. tessellata* ist in Italien, auf dem Balkan, in Kleinasien, dem Nahen Osten und in Mittelasien bis nach China hinein beheimatet (GRUSCHWITZ et al. 1999). Isolierte Randpopulationen leben zudem in Deutschland und der Tschechischen Republik. Während *N. natrix* mit den beiden anderen Arten über große Gebiete sympatrisch vorkommt, überlappen sich die Verbreitungsgebiete

von *N. maura* und *N. tessellata* nur in einem kleinen Gebiet in Nordwest-Italien.

Fragen zur infraspezifischen Taxonomie sind für alle drei Arten noch nicht abschließend geklärt. *N. maura* gilt derzeit als monotypisch. Innerhalb von *N. tessellata* wurde die Population der ukrainischen Schwarzmeerinsel Ostrov Zmeinyi als Unterart *N. t. heinrothi* (HECHT, 1930) von allen übrigen Populationen abgegrenzt. Diese Unterteilung ist jedoch sehr zweifelhaft (GRUSCHWITZ et al. 1999). Für *N. natrix* sind basierend auf phänotypischen Merkmalen zunächst 13 Unterarten beschrieben worden (s. KABISCH 1999), von diesen erklärte THORPE (1979) nach einer detaillierten morphologischen Analyse jedoch nur noch vier für gültig. Zwei davon sind Inselformen, *N. n. cetti* auf Sardinien und *N. n. corsa* auf Korsika, die anderen beiden Unterarten, *N. n. helvetica* und *N. n. natrix*, trennen die Populationen auf dem eurasischen Festland westlich und östlich einer schmalen Kontaktzone. Diese verläuft von Norditalien über West-Deutschland zur Nordsee.

In der Fossilgeschichte taucht die Gattung *Natrix* erstmals im frühen Oligozän auf. Der früheste Vertreter wurde als *N. mlynarski* (RAGE 1988) beschrieben und stammte aus Frankreich (IVANOV 2001, RAGE & AUGE 1994). Eine Reihe weiterer Arten ist aus dem Frühen Miozän bekannt. Eine Ausnahme bildet ein Fund aus dem Mittleren Miozän, bei dem es sich nach Meinung von IVANOV (1999, 2002) bereits um einen frühen Vertreter von *N. natrix* handeln könnte. Alle anderen eindeutig den rezenten Arten zuzuordnenden Fossilien der Gattung *Natrix* sind erst aus dem Oberen Pliozän und dem Pleistozän bekannt.

Außer diesen Fossilfunden gab es bislang wenige Informationen, die Licht auf die Evolutionsgeschichte der Gattung hätten werfen können. Basierend auf seinen morphologischen Analysen stellte THORPE (1979, 1984a, 1984b) die Hypothese auf, dass sich die zwei von ihm auf dem eurasischen Festland unterschiedenen Unterarten von *N. natrix* durch Überdauerung in unterschiedlichen Refugien während des Pleistozäns voneinander differenziert haben könnten. Ein ähnliches Szenario wurde allgemein auch für die Differenzierung von *N. maura* und *N. tessellata* diskutiert, die gemeinhin als Schwesterarten betrachtet wurden.

Wir haben mithilfe von DNA-Sequenzen von vier mitochondrialen Genen (1.) die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den drei anerkannten *Natrix*-Arten untersucht, (2.) die innerartliche Differenzierung der Arten analysiert und (3.) unter Verwendung einer molekularen Uhr eine Hypothese zur zeitlichen Einordnung der wichtigsten Divergenzereignisse und zur Evolutionsgeschichte der Gattung aufgestellt (GUICKING et al. 2006). In der hier vorliegenden Darstellung fassen wir die wichtigsten Ergebnisse aus dieser Studie zusammen. Dabei stehen die Phylogenie und Evolutionsgeschichte der Gattung sowie die innerartliche Differenzierung von *N. natrix* im Vordergrund.

2 Material und Methoden

Das verwendete Probenmaterial (Tab. 1) wurde so gewählt, dass von jeder Art Individuen von möglichst weit voneinander entfernt liegenden Fundorten berücksichtigt wurden, um die intraspezifische Variabilität der Arten bestmöglich zu erfassen (Abb. 1). Eine Sequenz von *Nerodia fasciata* diente bei der phylogenetischen Rekonstruktion als Außengruppe. Von *N. megalcephala* sowie aus den östlichsten Regionen des Verbreitungsgebietes und zahlreichen Inselpopulationen von *N. natrix* standen keine Proben zur Verfügung. Allerdings könnte es sich bei den zwei als *N. natrix* bestimmten Proben aus Armenien und Georgien aufgrund des Herkunftsortes theoretisch auch um *N. megalcephala* handeln. Beide Arten kommen in der südlichen Kaukasusregion syntop

vor (ORLOV & TUNIJEV 1999) und sind phänotypisch nur schwer zu unterscheiden, eine Fehlbestimmung wäre demnach denkbar. Uns lagen jedoch keine Belegexemplare vor. Die nach unseren Daten fehlende Differenzierung zwischen diesen beiden und den anderen Tieren von *N. natrix* würde die ohnehin umstrittene Existenz von *N. megalocephala* weiter in Frage stellen.

Da ausführliche Beschreibungen zu den verwendeten Labor- und Auswertemethoden bei GUICKING et al. (2006) nachgelesen werden können, soll hier nur ein kurzer Überblick mit den wichtigsten Informationen gegeben werden. Als Probenmaterial dienten in Ethanol bzw. Puffer aufbewahrte Gewebe- oder Blutproben, die im Freiland gesammelt oder von Museumstieren entnommen worden waren. Die DNA wurde nach Standardrezepten isoliert. Anschließend wurden die gewünschten Zielfragmente der vier untersuchten mitochondrialen Gene (Cytochrom b, 1117 Nukleotide; NADH-Dehydrogenase Untereinheit 1, 964 Nukleotide; NADH-Dehydrogenase Untereinheit 2, 1029 Nukleotide, und eine Teilsequenz der NADH-Dehydrogenase Untereinheit 4, 696 Nukleotide) mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und anschließend auf automatischen Sequenzierern sequenziert. Die Sequenzen der dabei verwendeten Primer sind bei GUICKING et al. (2006) aufgelistet. Ein wesentlicher Teil der Sequenzierungen wurde von R. LAWSON am Osher Foundation Laboratory in San Francisco erstellt. Alle Sequenzen wurden auf ihre Richtigkeit kontrolliert und anschließend manuell aligniert (beim Alignieren werden homologe Positionen der DNA-Sequenzen untereinander geschrieben, damit sie bei der computergestützten Analyse als solche zu erkennen sind).

Da sich die Daten der vier Gene nicht wesentlich hinsichtlich ihrer phylogenetischen Information unterschieden (GUICKING et al. 2006), wurden die Sequenzen für die Stammbaumrekonstruktion kombiniert. Das den hier gezeigten Stammbäumen zugrunde liegende Sequenz-Alignment hatte damit eine Gesamtlänge von 3806 Nukleotiden. Die phylogenetischen Rekonstruktionen wurden mit den kriteriums-basierten Methoden Maximum Parsimony (MP) und Maximum Likelihood (ML) unter Verwendung des Programms PAUP 4.0b10 (SWOFFORD 2001) durchgeführt sowie nach der Bayes'schen Inferenz-Methode mit dem Programm MrBAYES v. 3.0b4 (HUELSENBECK & RONQUIST 2001). Für die Rechnungen nach Bayes'scher Inferenz und Maximum Likelihood wurde das Evolutionsmodell TrN+I+G mit den von dem Programm MODELTEST v. 3.06 (POSADA & CRANDALL 1998) spezifizierten Parameterwerten zugrunde gelegt. Die Verlässlichkeit der gefundenen Gruppen wurde mithilfe von Bootstrap-Werten überprüft (1000 Wiederholungen bei Maximum Parsimony, 500 bei Maximum Likelihood). Genetische Distanzen zwischen den Arten sowie zwischen evolutiven Linien innerhalb von *N. natrix* wurden mithilfe des Software-Programms MEGA v. 2.1 (KUMAR et al. 2001) berechnet. Als Distanzmaß werden die unkorrigierten p-Distanzen angegeben, da diese den zeitlichen Datierungen zugrunde liegen und sich am ehesten mit Werten anderer Arbeiten vergleichen lassen.

Um die wichtigsten Divergenzereignisse mithilfe einer „molekularen Uhr“ zeitlich einordnen zu können, musste diese Uhr zunächst kalibriert werden. Dafür wurden verschiedene Methoden verwendet, denen entweder Fossildaten oder paläogeographische Informationen zugrunde lagen. Eine genaue Darstellung dieser Berechnungen ist in GUICKING et al. (2006) beschrieben und diskutiert worden. Für die vorliegende Arbeit soll es ausreichen, die errechneten Evolutionsraten zu nennen. Sie betragen für die drei Arten *N. maura*, *N. natrix* und *N. tessellata* 1 %, 1,25 % und 1,35 % Sequenzdivergenz pro eine Million Jahre unabhängiger Evolution und liegen damit in einer ähnlichen Grö-

Tab. 1. Probenliste mit Angaben zur Art und Herkunft der berücksichtigten Proben. Die Nummern beziehen sich auf die Angaben in Abb. 1. In der zweiten Spalte sind die in den Abb. 2 und 3 verwendeten Bezeichnungen aufgeführt. List of sample localities of this study. Numbers refer to those given in Fig. 1. In the second column the IDs used in Fig. 2 and 3 are indicated.

| Nr. | Bezeichnung in Abb. 2 und 3 | Art | Herkunft |
|-----|--------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| | <i>Nerodia fasciata</i> | <i>Nerodia fasciata</i> | USA, Florida, Citrus Co. |
| 1 | Nm Marokko | <i>Natrix maura</i> | Marokko, Tétuan Prov. |
| 2 | Nm Tunesien | <i>Natrix maura</i> | Tunesien, Tameghza |
| 3 | Nm Spanien S | <i>Natrix maura</i> | Spanien, Cadiz Prov. |
| 4 | Nm Spanien NO | <i>Natrix maura</i> | Spanien, Katalonien, Osona Dist. |
| 5 | Nm Frankreich | <i>Natrix maura</i> | Frankreich, Dept. Herault |
| 6 | Nm Italien | <i>Natrix maura</i> | Italien, Voghera |
| 7 | Nt Iran W | <i>Natrix tessellata</i> | Iran, Kermanshah |
| 8 | Nt Griechenland S | <i>Natrix tessellata</i> | Griechenland, Ioánnina |
| 9 | Nt Ägypten | <i>Natrix tessellata</i> | Ägypten |
| 10 | Nt Jordanien | <i>Natrix tessellata</i> | Jordanien, Jarash |
| 11 | Nt Armenien | <i>Natrix tessellata</i> | Armenien, Geolazar |
| 12 | Nt Tschetschenien | <i>Natrix tessellata</i> | Tschetschenien, Schelkovskaya Dist. |
| 13 | Nt Georgien | <i>Natrix tessellata</i> | Georgien, Agara |
| 14 | Nt Usbekistan | <i>Natrix tessellata</i> | Usbekistan, Kungrad |
| 15 | Nt Kasachstan O | <i>Natrix tessellata</i> | Kasachstan, Ili Fluss |
| 16 | Nt Türkei NW | <i>Natrix tessellata</i> | Türkei, Yenicaga |
| 17 | Nt Kreta | <i>Natrix tessellata</i> | Griechenland, Kreta |
| 18 | Nt Bulgarien | <i>Natrix tessellata</i> | Bulgarien, Sozopol |
| 19 | Nt Rumänien | <i>Natrix tessellata</i> | Rumänien, Cluj-Napoca |
| 20 | Nt Italien NO | <i>Natrix tessellata</i> | Italien, Grado |
| 21 | Nt Italien S | <i>Natrix tessellata</i> | Italien, Torre de Lato |
| 22 | Nn Spanien S | <i>Natrix natrix</i> | Spanien, Cadiz Prov. |
| 23 | Nn Spanien NO | <i>Natrix natrix</i> | Spanien, Katalonien, Osona Dist. |
| 24 | Nn Italien S | <i>Natrix natrix</i> | Italien, Torre San Gennaro |
| 25 | Nn Italien N | <i>Natrix natrix</i> | Italien, Ticino |
| 26 | Nn Frankreich | <i>Natrix natrix</i> | Frankreich, bei Paris |
| 27 | Nn England S | <i>Natrix natrix</i> | England, Kent |
| 28 | Nn Deutschland W | <i>Natrix natrix</i> | Deutschland, Kelkheim/Taunus |
| 29 | Nn Deutschland S | <i>Natrix natrix</i> | Deutschland, Radolfzell |
| 30 | Nn Schweden S | <i>Natrix natrix</i> | Schweden, Småland |
| 31 | Nn Dänemark | <i>Natrix natrix</i> | Dänemark |
| 32 | Nn Griechenland S | <i>Natrix natrix</i> | Griechenland, Ioánnina |
| 33 | Nn Rumänien O | <i>Natrix natrix</i> | Rumänien, Tulcea |
| 34 | Nn Rumänien NW | <i>Natrix natrix</i> | Rumänien, Cluj-Napoca |
| 35 | Nn Slowenien | <i>Natrix natrix</i> | Slowenien, Zalec |
| 36 | Nn Bulgarien | <i>Natrix natrix</i> | Bulgarien, Malko Turnovo Dist. |
| 37 | Nn Türkei NW | <i>Natrix natrix</i> | Türkei, Yenicaga |
| 38 | Nn Türkei Z | <i>Natrix natrix</i> | Türkei, Sarkale |
| 39 | Nn Armenien | <i>Natrix natrix</i> | Armenien, Ankavan |
| 40 | Nn Georgien | <i>Natrix natrix</i> | Georgien, Batumi |
| 41 | Nn Russland 1 | <i>Natrix natrix</i> | Russland, Tula Dist. |
| 42 | Nn Russland 2 | <i>Natrix natrix</i> | Russland, Rybachy |
| 43 | Nn Russland 3 | <i>Natrix natrix</i> | Russland, Samara Region |
| 44 | Nn Kasachstan NW | <i>Natrix natrix</i> | Kasachstan, Emba Fluss |

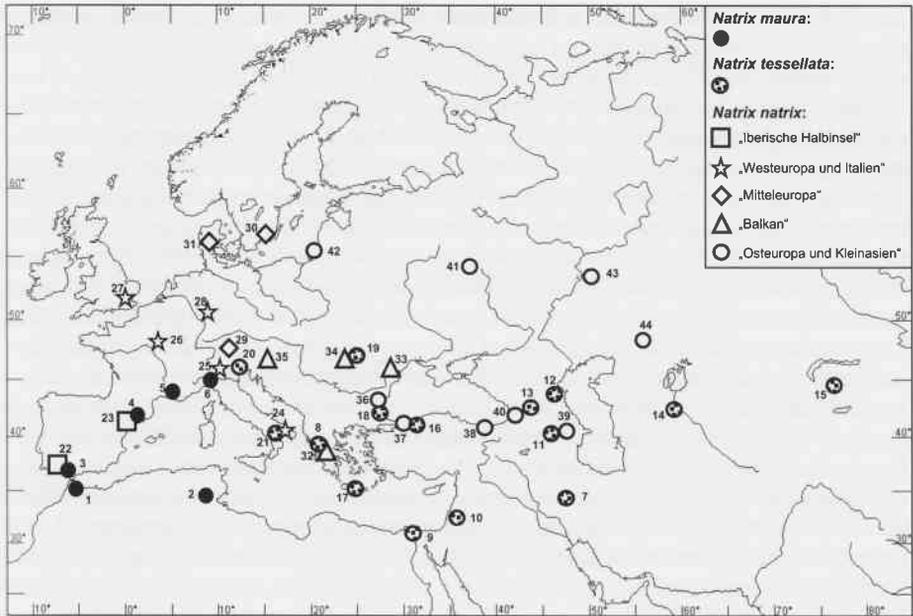


Abb. 1. Fundorte der Proben von *N. maura* (schwarze Symbole), *N. tessellata* (gepunktete Symbole) und *N. natrix* (offene Symbole). Für *N. natrix* ist die Zugehörigkeit der Proben zu den fünf in dieser Arbeit definierten Evolutionslinien durch unterschiedliche Symbolformen angegeben. Die Zahlen entsprechen der Zuordnung in Tab. 1.

Localities for samples of *N. maura* (black symbols), *N. tessellata* (dotted symbols) and *N. natrix* (open symbols). For *N. natrix*, different symbols identify samples belonging to the five evolutionary lineages defined in this study. Numbers refer to samples indicated in Tab. 1.

benennung wie für andere Squamaten angenommen wird (z. B. OLIVEIRO et al. 2000, NAGY et al. 2004). Da das Verfahren der molekularen Uhr nicht unproblematisch ist, sollten die angegebenen Divergenzzeiten nur als Schätzwerte verstanden werden.

3 Ergebnisse

Von insgesamt 45 untersuchten Individuen wiesen 44 unterschiedliche Sequenzen auf. Lediglich bei zwei Tieren von *N. natrix* aus England und Nordwest-Frankreich waren alle 3806 sequenzierten Basenpositionen identisch. Mit 1300 Positionen waren 34,2 % des gesamten Datensatzes variabel. Zusätzlich wiesen alle Sequenzen von *N. tessellata* nahe des Anfangs vom ND 1 Gen eine Deletion von drei Basen auf.

Die Topologie der phylogenetischen Bäume unterschied sich nur geringfügig in Abhängigkeit von der verwendeten Rekonstruktionsmethode. Alle Bäume unterstützten zweifelsfrei die Monophylie der drei Arten und wiesen eindeutig und entgegen bisheriger Hypothesen *N. natrix* und *N. tessellata* als Schwesterarten aus (Bootstrapunterstützung MP: 93 %, ML: 100 %). *N. maura* erschien hingegen in allen Bäumen an basaler Position (Abb. 2). Die innerartliche Variation war bei allen drei Arten sehr groß

und ließ deutlich die Existenz mehrerer klar voneinander getrennter Evolutionslinien erkennen. Ein umfangreicherer Datensatz zur innerartlichen genetischen Variation von *N. maura* und *N. tessellata*, der auf mitochondrialen Cytochrom b Sequenzen und nukleären Inter Simple Sequence Repeats-PCR Fingerprint-Daten beruht, ist in GUICKING (2004) ausgewertet worden. Danach können in *N. maura* mindestens drei Linien unterschieden werden, die jeweils Populationen aus Marokko, Tunesien und Europa einschließen. Da die afrikanischen Linien an basaler Position erscheinen, liegt der Ursprung der Art höchstwahrscheinlich in Nordafrika. In *N. tessellata* lassen sich mindestens neun genetische Hauptlinien unterscheiden. Die drei basalsten Linien umfassen Populationen aus dem Iran, aus Ägypten und Jordanien und aus Süd-Griechenland. Weitere Linien schließen die Populationen von der türkischen Halbinsel, aus dem Kaukasus sowie den nördlich angrenzenden Steppengebieten, vom Aralsee und aus dem östlichen Verbreitungsgebiet ein. Ein Schwestergruppenverhältnis wurde zwischen zwei Linien gefunden, von denen eine auf Kreta und die andere auf dem europäischen Festland verbreitet ist. Innerhalb von *N. natrix* lassen sich nach den bislang zur Verfügung stehenden Daten mindestens fünf geographisch gut getrennte Linien auf dem europäischen Festland unterscheiden (Abb. 1 und Abb. 2). Diese Linien umfassen Tiere von (1) der Iberischen Halbinsel, aus (2) Italien und Westeuropa, (3) Mitteleuropa und Skandinavien, (4) den Balkanländern und Süd-Griechenland sowie (5) der Türkei, den Kaukasusländern, Russland und Kasachstan. Zu der letzten Gruppe wurde auch ein Tier von der bulgarischen Schwarzmeerküste gezählt, das von den anderen Tieren der Linie jedoch deutlich differenziert war. Die basale Position im phylogenetischen Baum nahm die Linie der Iberischen Halbinsel ein. Für alle fünf Linien lag die Bootstrapunterstützung bei 100 %, sowohl nach dem MP- als auch nach dem ML-Kriterium.

Paarweise genetische Distanzen zwischen den drei Arten sowie zwischen den fünf innerhalb von *N. natrix* unterschiedenen Linien sind in Tab. 2 zusammengestellt. Die zwischenartlichen genetischen Distanzen lagen für alle drei Artenpaare dicht beieinander. Der geringste Wert wurde zwischen *N. maura* und *N. natrix* gefunden (13,4 %), der größte Werte zwischen *N. maura* und *N. tessellata* (14,5 %). Die mittlere genetische Distanz der Gattung *Natrix* zur Außengruppe *Nerodia fasciata* betrug 17,2 %. Die innerartliche Variabilität war bei *N. tessellata* mit einem Maximalwert von 8,9 % Sequenzdivergenz am höchsten und bei *N. maura* mit 5,3 % am niedrigsten. *N. natrix* nahm bei diesem Vergleich mit einer maximalen innerartlichen Distanz von 7,5 % die Mittelposition ein. Die durchschnittliche Distanz zwischen den fünf Evolutionslinien von *N. natrix* lag zwischen 4,7 % und 7,3 % Sequenzdivergenz (Tab. 2).

Um die zeitliche Einordnung der Divergenzereignisse zwischen den Arten bzw. innerartlichen Linien zu veranschaulichen, wurde mithilfe der Maximum-Likelihood-Methode ein Chronogramm berechnet. In einem Chronogramm ist die Astlänge proportional zur Zeit, weswegen eine Zeitskala angelegt werden kann. Bei der in Abb. 3 gezeigten Darstellung wurde diese Skala mithilfe paläogeographischer Ereignisse kalibriert. Dabei wurde die Trennung der afrikanischen und europäischen Populationen von *N. maura* auf etwa 5 Mio. Jahre geschätzt (dies entspricht dem Ende der messinischen Salinitätskrise) und die Abspaltung von *N. maura* von den anderen beiden Arten auf maximal 20 Mio. Jahre (entsprechend der erstmaligen Kollision des afrikanischen und eurasischen Kontinents, s. Diskussion). Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten, wenn die Divergenzzeiten mithilfe der genetischen Distanzen und den geschätzten Evolutionsraten von 1 %, 1,25 % und 1,35 % Sequenzdivergenz pro eine Million Jahre für *N. maura*, *N. natrix* und *N. tessellata* berechnet wurden.

4 Diskussion

4.1 Eine Hypothese zur Evolutionsgeschichte der Gattung *Natrix*

Die hier dargestellten, auf molekularen Methoden beruhenden Daten zur Phylogenie und Divergenzzeiten von *N. natrix*, *N. maura* und *N. tessellata* widersprechen den früheren Hypothesen zur Evolutionsgeschichte der Gattung (vgl. Einleitung). Während bislang *N. maura* und *N. tessellata* als Schwesterarten galten, unterstützen die genetischen Daten klar eine Gattungsphylogenie, in der *N. maura* an basaler Stelle steht und *N. natrix* und *N. tessellata* Schwesterarten darstellen. Außerdem sprechen die molekularen Daten dafür, dass sich die drei *Natrix*-Arten bereits seit dem Mittleren Miozän unabhängig voneinander entwickelt haben. Diese zeitliche Einordnung wird zusätzlich gestützt durch die von IVANOV (1999, 2002) aufgestellte Hypothese, dass es sich bei einem zunächst als *N. longivertebra* (SZYNDLAR, 1984) beschriebenen Fossil aus dem mittleren Miozän bereits um eine fossile Unterart von *N. natrix* handeln könnte. Die innerartliche Differenzierung setzte nach unserer Datierung bei allen drei Arten am Übergang vom Miozän zum Pliozän ein. Eine wesentlich spätere pleistozäne Aufspaltung wie sie THORPE (1979, 1984a, 1984b) für die zwei großen Festlandunterarten von *N. natrix* vorgeschlagen hatte und wie sie für die Auftrennung der beiden Arten *N. maura* und *N. tessellata* diskutiert wurde, scheint nach unseren Daten äußerst unwahrscheinlich.

Paläontologische Daten (IVANOV 2001, RAGE & AUGÉ 1994) und die derzeitigen Verbreitungsgebiete der rezenten *Natrix*-Arten sprechen dafür, dass die Gattung ihren Ursprung im südlichen Asien hatte (vgl. auch HECHT 1930). Des Weiteren lassen die heu-

Tab. 2. Paarweise genetische Distanzen (unkorrigierte p-Distanzen; Mittelwert \pm Standardabweichung) für den kombinierten Datensatz von vier mitochondrialen Genen a) zwischen den drei *Natrix*-Arten und b) zwischen den fünf innerhalb von *N. natrix* unterschiedenen Evolutionslinien. Die Werte auf der Diagonalen geben maximale genetische Distanzen innerhalb der Arten/Linien an.

Pairwise genetic distances (uncorrected p-distances; mean \pm standard deviation) of the combined data set of four mitochondrial genes a) between the three *Natrix* species and b) between the five evolutionary lineages identified in *N. natrix*. Values on the diagonal represent maximum values of within species/lineages divergence.

a)

| | <i>N. maura</i> | <i>N. tessellata</i> | <i>N. natrix</i> |
|----------------------|-------------------|----------------------|------------------|
| <i>N. maura</i> | 0,053 | | |
| <i>N. tessellata</i> | 0,145 \pm 0,005 | 0,089 | |
| <i>N. natrix</i> | 0,134 \pm 0,005 | 0,139 \pm 0,005 | 0,075 |

b)

| <i>N. natrix</i> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------|
| 1 Iberische Halbinsel | 0,005 | | | | |
| 2 West-Europa und Italien | 0,068 \pm 0,004 | 0,025 | | | |
| 3 Balkan | 0,068 \pm 0,004 | 0,057 \pm 0,004 | 0,012 | | |
| 4 Mittel-Europa | 0,073 \pm 0,004 | 0,065 \pm 0,004 | 0,052 \pm 0,004 | 0,002 | |
| 5 Ost-Europa und Kleinasien | 0,069 \pm 0,004 | 0,060 \pm 0,004 | 0,047 \pm 0,003 | 0,052 \pm 0,004 | 0,029 |

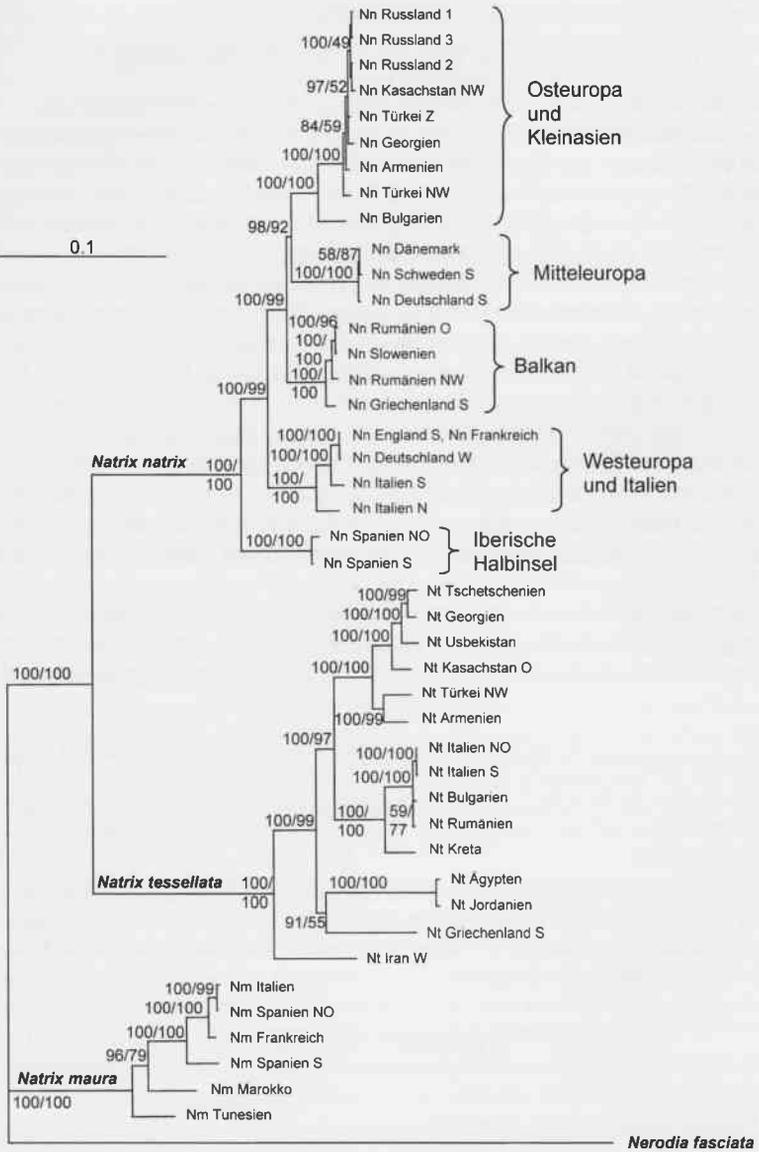


Abb. 2. Bayes'sches Inferenz-Phylogramm für die Gattung *Natrix*, basierend auf den Sequenzen von vier mitochondrialen Genen (cyt b, ND1, ND2, ND4). *Nerodia fasciata* diente als Außen-gruppe. Die Zahlen geben die Bayes'schen Wiederfindungswahrscheinlichkeiten gefolgt von Bootstrap-Werten der Maximum Likelihood-Analyse an (500 Wiederholungen). Die Baumtopologie änderte sich in Abhängigkeit von der Rekonstruktionsmethode kaum.

Bayesian inference phylogram for the genus *Natrix*, based on sequences from four mitochondrial genes (cyt b, ND1, ND2, ND4). *Nerodia fasciata* was used for outgroup rooting. Numbers are clade credibility values from the Bayesian analysis followed by maximum likelihood bootstrap values (500 replicates). Phylogram topologies were very similar independent of the reconstruction method used.

tigen Verbreitungsgebiete der basalen Linien darauf schließen, in welchen Regionen sich die drei rezenten Arten entwickelt haben. Danach kann für *N. maura* ein afrikanischer Ursprung angenommen werden, *N. tessellata* hat sich wahrscheinlich in Südwestasien entwickelt und *N. natrix* ist wahrscheinlich durch Fragmentierung aus einer früheren europäischen Population hervorgegangen. Basierend auf diesen Daten und Annahmen haben wir ein alternatives Szenario zur Evolutionsgeschichte der Gattung *Natrix* entworfen (GUICKING et al. 2006).

Dieser Hypothese zufolge hat sich eine frühere, in Südasien lokalisierte Ursprungspopulation über eine Landbrücke, die in Folge der erstmaligen Kollision der afroarabischen und eurasischen Platten vor etwa 18-20 Mio. Jahren zwischen Afrika und Asien entstanden war, nach Afrika ausbreiten können. Als sich der Seeweg vom Mittelmeer zum Indischen Ozean im Mittleren Miozän erneut öffnete, wurden die afrikanischen und eurasischen Populationen getrennt und begannen sich unabhängig voneinander zu entwickeln. Während die afrikanische Population die Linie hervorbrachte, aus der die rezente *N. maura* entstand, entwickelte sich die eurasische Population zu *N. natrix* und *N. tessellata*. Die Differenzierung von *N. natrix* und *N. tessellata* könnte Folge einer Fragmentierung der ursprünglichen Population nördlich und südlich der Paratethys gewesen sein. Dieser Meeresteil erstreckte sich über große Zeiträume des Miozäns zwischen Zentraleuropa und Mittelasien (RÖGL & STEININGER 1984). Während sich die nördliche Population nach Europa ausbreitete und dort die rezente *N. natrix* hervorbrachte, blieb die südliche Population in Südwestasien und entwickelte sich zu *N. tessellata*.

Das Einsetzen der innerartlichen Differenzierung der drei *Natrix*-Arten könnte eine Folge der sich ändernden Klimabedingungen am Übergang vom Miozän zum Pliozän gewesen sein (CROWLEY & NORTH 1991). Im Zuge dieser Klimaschwankungen kam es wahrscheinlich zu großflächigen Aussterbeereignissen sowie zur Fragmentierung vieler Populationen, die nur in klimatisch begünstigten Refugien überleben konnten. Diese Auswirkungen waren im Norden wahrscheinlich stärker ausgeprägt als im wärmeren Süden, was eine mögliche Erklärung dafür liefern würde, dass sich die weiter nördlich verbreitete *N. natrix* hinsichtlich ihrer ökologischen und morphologischen Merkmale stärker differenzierte als die beiden anderen Arten. Arealexpansionen über das während der messinischen Salinitätskrise vor 5-6 Mio. Jahren (HSÜ et al. 1977) ausgetrocknete Mittelmeerbecken und die anschließende Isolation der Populationen, nachdem das Mittelmeer vor etwa 5,3 Mio. Jahren wieder überflutet wurde, führten wahrscheinlich zu einer weiteren Aufspaltung der ursprünglichen Populationen (STEININGER et al. 1985). Während der messinischen Salinitätskrise haben afrikanische *N. maura* wahrscheinlich die Iberische Halbinsel erreicht und europäische Populationen von *N. natrix* könnten nach Korsika und Sardinien vorgedrungen sein.

4.2 Die genetische Differenzierung von *N. natrix* im Vergleich mit bestehenden Unterart-Konzepten

Von den drei *Natrix*-Arten ist *N. natrix* aufgrund ihrer starken phänotypischen Variation die einzige, für die eine Reihe von Unterarten beschrieben wurden. Dabei werden zurzeit zwei alternative Konzepte diskutiert. Ursprünglich wurden 13 Unterarten bei *N. natrix* unterschieden (KABISCH 1999), davon sieben auf dem eurasischen Festland: *N. n. astreptophora* (SEOANE, 1884) auf der Iberischen Halbinsel und in Nordwest-Afrika, *N. n. helvetica* (LACÉPÈDE, 1789) in England, West-Europa, Norditalien, *N. n. lanzai* (KRAMER, 1970) in Mittelitalien, *N. n. sicula* (CUVIER, 1829) in Kalabrien und auf Sizi-

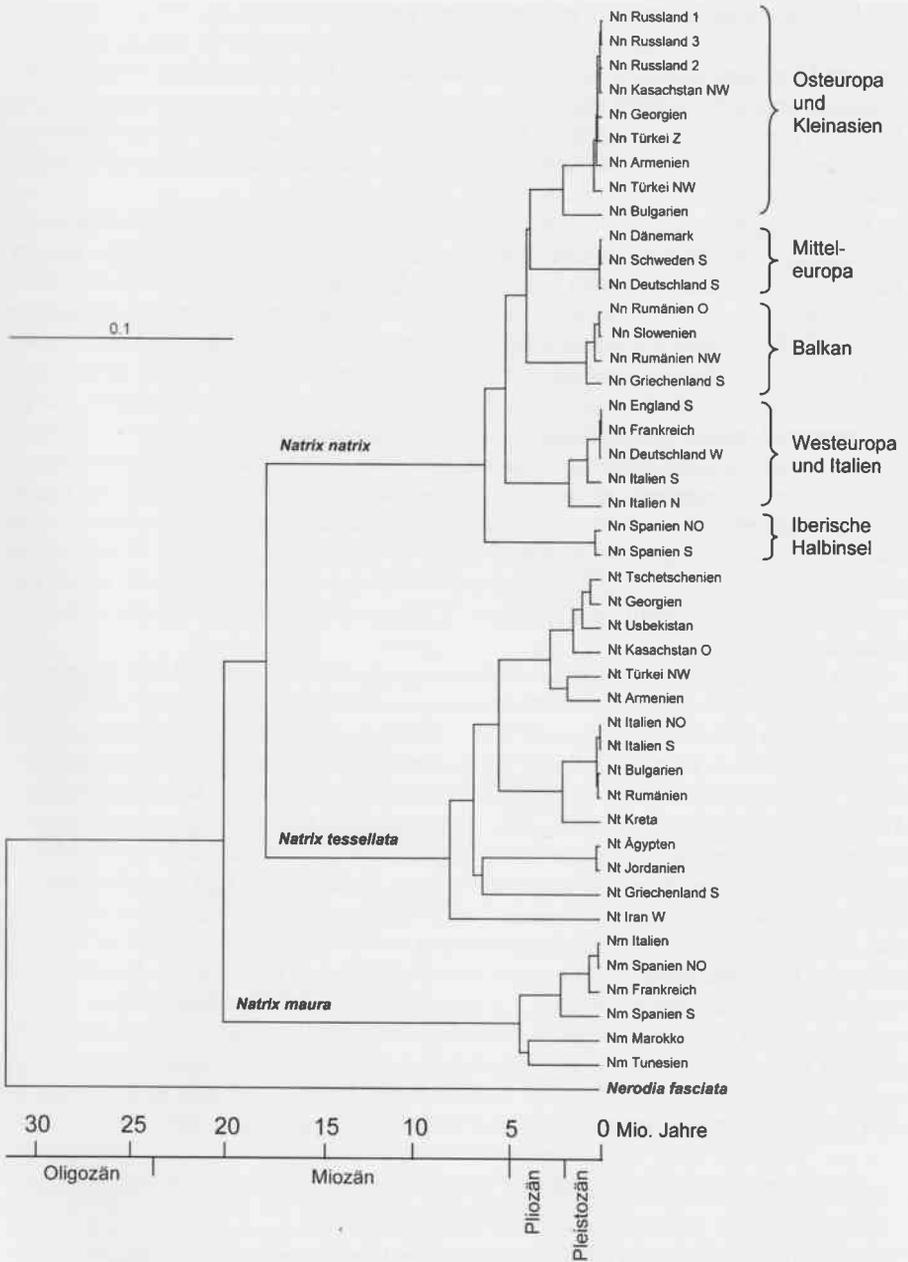


Abb. 3. Maximum Likelihood-Chronogramm zur zeitlichen Einordnung von Divergenzereignissen innerhalb der Gattung *Natrix*. Die Kalibrierung der Zeitskala erfolgte mithilfe paläogeographischer Informationen (s. Text).

Maximum likelihood chronogram for estimation of divergence times within the genus *Natrix*. Calibration of time scale was based on palaeogeographical evidence (see text).

lien, *N. n. natrix* (LINNAEUS, 1758) in Skandinavien und Mitteleuropa etwa vom Rhein im Westen bis zum Dnjepr im Osten, *N. n. persa* (PALLAS, 1814) auf dem Balkan, in Kleinasien und in Transkaukasien und *N. n. scutata* (PALLAS, 1771) östlich des Dnjepr bis in die Mongolei hinein. Die übrigen sechs Unterarten sind auf Inseln beschränkt bzw. im Fall von *N. n. syriaca* (HECHT 1930) auf das östlichste Mittelmeergebiet. Da wir von den entsprechenden Fundorten kein Probenmaterial für unsere Untersuchungen zur Verfügung hatten, können keine Aussagen hinsichtlich der Übereinstimmung dieser sechs Unterarten mit molekularen Daten gemacht werden. Nach Einschätzung von THORPE (1979) sind auf dem eurasischen Festland nur zwei Unterarten zu unterscheiden, *N. n. helvetica* und *N. n. natrix*. Deren Populationen befinden sich westlich und östlich einer engen Kontaktzone, die sich von Nordost-Italien durch West-Deutschland bis zur Nordsee erstreckt (THORPE 1984b). Um endgültige Aussagen darüber treffen zu können, wie viele und welche Unterarten bei *N. natrix* zu unterscheiden sind, ist der derzeitige Wissensstand nicht ausreichend (KABISCH 1999).

Alle bisherigen Arbeiten zur innerartlichen Gliederung von *N. natrix* beruhen fast ausschließlich auf phänotypischen Merkmalen. Die einzige Ausnahme stellt die Arbeit von HILLE (1997) dar, die auf einer Allozym-Analyse basiert. Seinen Daten zufolge wurde die Differenzierung der von THORPE postulierten östlichen und westlichen Festlandsunterarten klar unterstützt. Zusätzlich wiesen die Daten von HILLE auf eine deutliche Differenzierung der Tiere von Zypern (*N. n. cypriaca*, HECHT, 1930), Sardinien (*N. n. cetti*, GENÉ, 1883) und Spanien (*N. n. astreptophora*) hin. Keine Bestätigung wurde hingegen für die Eigenständigkeit der vierten postulierten *Natrix*-Art, *N. megalcephala*, gefunden.

Obwohl auch wir mit nur 23 berücksichtigten Individuen weit davon entfernt sind, umfassende Aussagen zur intraspezifischen Gliederung von *N. natrix* treffen zu können, scheint es interessant, die durch unsere Daten gefundenen Evolutionslinien auf ihre Übereinstimmung mit den phänotypisch unterschiedenen Unterarten zu überprüfen. Die geographische Verbreitung der mitochondrialen Linien ist in Abb. 1 durch unterschiedliche Symbole dargestellt. Vergleichen wir diese mit den oben aufgeführten geographischen Verbreitungsgebieten der historisch beschriebenen Unterarten, so lassen sich folgende Übereinstimmungen und Widersprüche finden:

Die mitochondriale Linie „Iberische Halbinsel“ entspricht der Unterart *N. n. astreptophora*. Die Linie „West-Europa und Italien“ würde drei der historisch beschriebenen Unterarten umfassen, *N. n. helvetica*, *N. n. lanzai* und *N. n. sicula*. Allerdings weisen unsere Daten auf große genetische Unterschiede insbesondere zwischen den italienischen Tieren dieser Linie hin. Eine weitere Unterteilung der Linie „West-Europa und Italien“ entsprechend der drei genannten Unterarten wäre insofern denkbar. Insbesondere die Unterart *N. n. helvetica* würde dann durch unsere vorläufigen Daten gut gestützt werden. Die Linie „Balkan“ entspricht dem westlichen Verbreitungsgebiet von *N. n. persa*, schließt aber die asiatischen Herkunftsorte der Unterart aus. Außerdem fällt nach unseren Daten ein Tier der bulgarischen Schwarzmeerküste nicht in diese Gruppe. Die Linie „Mittel-Europa“ fällt mit dem westlichen Verbreitungsgebiet von *N. n. natrix* zusammen, schließt jedoch wahrscheinlich die östlichen Fundorte der Unterart aus, da z. B. eine Probe von der Kurischen Nehrung (Probe 42, Abb. 1) einer anderen mitochondrialen Linie angehört. Proben aus den östlichen Verbreitungsgebieten, die nach der herkömmlichen Unterarten-Gliederung zu *N. n. persa* und *N. n. natrix* zu zählen sind, gehören nach mitochondrialen Daten einer gemeinsamen Linie „Ost-

Europa und Kleinasien“ an. Zusätzlich scheint diese Linie die Tiere aus dem Gebiet von *N. n. scutata* zu beinhalten.

Da uns leider kein Probenmaterial von *N. natrix* aus Korsika oder Sardinien zur Verfügung stand, können wir im Vergleich zu den vier von THORPE (1979, 1984a, 1984b) definierten Unterarten nur hinsichtlich der beiden Festlandsunterarten Aussagen treffen. Die von THORPE zu *N. n. helvetica* gezählten Populationen umfassen nach den zurzeit verfügbaren mitochondrialen Daten zwei Evolutionslinien, „Iberische Halbinsel“ und „West-Europa und Italien“. Die Unterscheidung dieser beiden Linien wird auch durch die von HILLE (1997) gefundene starke Differenzierung spanischer Tiere bestätigt. THORPES Unterart *N. n. natrix* würde nach unseren Daten mindestens drei Linien beinhalten, „Mittel-Europa“, „Balkan“ und „Ost-Europa und Kleinasien“. Entlang der von THORPE beschriebenen Kontaktzone zwischen der westlichen *N. n. helvetica* und der östlichen *N. n. natrix* erstreckt sich nach unserer Unterteilung die Grenze zwischen den Linien „West-Europa“ und „Mittel-Europa“. Die Existenz einer taxonomischen Grenze in Mitteleuropa wird also auch durch mitochondriale Daten bestätigt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die starke intraspezifische Variabilität von *N. natrix* nach unseren vorläufigen genetischen Daten durch ein stärker differenziertes Unterarten-Konzept taxonomisch zutreffender beschrieben würde als durch ein auf wenige Unterarten reduziertes Konzept wie es THORPE (1979) postuliert hat. Aber auch die frühere Aufteilung in 13 Unterarten scheint nach mitochondrialen Daten die genetische Diversität der Art nicht korrekt zu beschreiben. So wird z. B. der genetisch klar nachweisbaren Differenzierung der Populationen vom Balkan und aus Kleinasien nicht Rechnung getragen, wenn beide zu *N. n. persa* gezählt werden. Die große genetische und phänotypische Vielfalt innerhalb der Art sowie zahlreiche Widersprüche hinsichtlich der geographischen Verbreitung taxonomischer Einheiten weisen auf eine sehr komplexe Evolutionsgeschichte von *N. natrix* hin. Um diese endgültig aufzuklären, müssen weitere Daten erhoben werden. Dabei wäre eine Ausweitung genetischer Untersuchungen auf eine größere Probenzahl sowie der Einbezug nukleärer Marker wünschenswert. Eine erste Arbeit in dieser Richtung wird derzeit von R. LAWSON, San Francisco, und Kollegen vorbereitet. Weiterführende taxonomische Arbeiten an der Gattung *Natrix* werden sich zudem mit der Frage beschäftigen müssen, ob die verschiedenen Evolutionslinien von *N. natrix*, wie auch von *N. maura* und *N. tessellata*, taxonomisch zutreffender als Unterarten oder als eigenständige Arten anzusprechen sind (vgl. THORPE 1984a, GUICKING 2004). Auch um diese Entscheidung treffen zu können, sollten Informationen von mehreren unabhängigen Datensätzen herangezogen werden. Bis eine gut begründete Revision zur Taxonomie der Gattung *Natrix* vorliegt, sind sicher noch eine Reihe weiterführender Untersuchungen notwendig.

Danksagung

Unsere Arbeiten zur Phylogenie und innerartlichen Gliederung der eurasischen Wasserschlangen wären nicht möglich gewesen, wenn nicht zahlreiche Kollegen uns großzügig Probenmaterial zur Verfügung gestellt hätten. All ihnen sei dafür herzlich gedankt. Unser besonderer Dank gilt außerdem R. LAWSON, der zahlreiche Sequenzdaten und Diskussionsbeiträge zu dieser Arbeit beisteuerte. J. HALLERMANN danken wir für die Durchsicht des Manuskripts. Für die finanzielle Unterstützung bedanken wir uns bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Jo 134-7, Wi 719-18).

Schriften

- BÖHME, W. (1999): Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 3/IIA. Schlangen II. – Wiebelsheim (Aula).
- CROWLEY, T. J. & G. R. NORTH (1991): Paleoclimatology. – New York (Oxford University Press).
- GRUSCHWITZ, M., S. LENZ, K. MEBERT & V. LANKA (1999): *Natrix tessellata* (LAURENTI, 1768) – Würfelnatter. In: BÖHME, W. (Hrsg.): Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 3/IIA: Schlangen II. – Wiebelsheim (Aula): 581-644.
- GUICKING, D. (2004): Molecular phylogeography and evolution of western Palearctic water snakes (genus *Natrix*, Reptilia). – Dissertation, Universität Heidelberg, unveröff.
- 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.
- HECHT, G. (1930): Systematik, Ausbreitungsgeschichte und Ökologie der europäischen Arten der Gattung *Tropidonotus* (KUHLE) H. BOIE. – Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum Berlin 16: 244-393.
- HILLE, A. (1997): Biochemical variation between populations of the western and the eastern grass snake (*Natrix natrix*) from the transition zone in Nordrhein-Westfalen, Germany. – In: BÖHME, W., W. BISCHOFF & T. ZIEGLER (eds.): – Herpetologica Bonnensis (SEH). – Bonn: 177-184.
- HSÜ, K. J., L. MONTADERT, D. BERNOULLI, M. B. CITA, A. ERICKSON, R. E. GARRISON, R. B. KIDD, F. MÉLIERÉS, C. MÜLLER & R. WRIGHT (1977): History of the Mediterranean salinity crisis. – Nature 267: 399-403.
- HUELSENBECK J. P. & F. RONQUIST (2001): MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. – Bioinformatics Applications Note 17: 754-755.
- IVANOV, M. (1999): Quarternary evolution of the grass snake (*Natrix natrix*): new evidence. – Acta Musei Moraviae, Science Geologica 84: 153-160.
- IVANOV, M. (2001): Changes in the composition of the European snake fauna during the Early Miocene and at the Early / Middle Miocene transition. – Paläontologische Zeitschrift 74: 563-573.
- IVANOV, M. (2002): Fossil snake assemblages from the French Middle Miocene localities at La Grive (France). – The 7th European workshop of vertebrate palaeontology, Sibiu, Romania: 26-27.
- KABISCH, K. (1999): *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) – Ringelnatter. In: BÖHME, W. (Hrsg.): Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 3/IIA: Schlangen II. – Wiebelsheim (Aula): 513-580.
- KUMAR, S., K. TAMURA, I. B. JAKOBSEN & M. NEI (2001): MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. – Tempe, Arizona, USA (Arizona State University).
- NAGY, Z. T., LAWSON, R., JOGER, U. & M. WINK (2004): Molecular phylogeny and systematics of racers, whipsnakes and relatives (Reptilia: Colubridae) using mitochondrial and nuclear markers. – Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 42: 223-233.
- OLIVEIRO, M., BOLOGNA, M. A. & P. MARIOTTINI (2000): Molecular biogeography of the Mediterranean lizards *Podarcis* Wagler, 1830 and *Teira* Gray, 1838 (Reptilia, Lacertidae). – Journal of Biogeography 27: 1403-1420.
- ORLOV, N. L. & B. S. TUNIJEV (1999): *Natrix megaloccephala* ORLOV und TUNIJEV, 1987 – Großkopf-Ringelnatter. – In: BÖHME, W. (Hrsg.): Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 3/IIA: Schlangen II. – Wiebelsheim (Aula): 505-512.
- POSADA, D. & K. A. CRANDALL (1998): Modeltest: testing the model of DNA substitution. – Bioinformatics 14: 817-818.

- RAGE, J.-C. (1988): The oldest known colubrid snakes. The state of the art. – In: SZYNDLAR, Z. (ed.): Festschrift for Maryan Mlynarski. – Acta Zool. Cracov. 31: 457-474.
- RAGE, J.-C. & M. AUGE (1994): Squamates from the Cainozoic of the western part of Europe. A Review. In "Second Georges Cuvier Symposium, Montbeliard (France)", 1992 – Revue de Paléobiologie Volume Spécial 7: 199-216.
- RÖGL, F. & F. F. STEININGER (1984): Neogene Paratethys, Mediterranean and Indo-Pacific seaways. In: BRENCHLEY, P. (ed.): Fossils and Climate. – Chichester (John Wiley & Sons): 171-200.
- SCHÄTTI, B. (1999): *Natrix maura* (Linnaeus 1758) – Vipernatter. – In: BÖHME, W. (Hrsg.): Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 3/IIA: Schlangen II. – Wiebelsheim (Aula): 483-503.
- STEININGER, F. F., G. RABEDER & F. RÖGL (1985): Land mammal distribution in the Mediterranean Neogene: a consequence of geokinematic and climatic events. – In: STANLEY, D. J. & F.-C. WEZEL (eds.): Geological evolution of the Mediterranean basin. – New York (Springer): 559-571.
- SWOFFORD, D. L. (2001): PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4.ob10. – Sunderland (Sinauer Associates).
- THORPE, R. S. (1979): Multivariate analysis of the population systematics of the ringed snake *Natrix natrix* (L.). – Proceedings of the Royal Society of Edinburgh 78: 1-62.
- THORPE, R. S. (1984a): Geographic variation in the western grass snake (*Natrix natrix helvetica*) in relation to hypothesized phylogeny and conventional subspecies. – Journal of Zoology, London 203: 345-355.
- THORPE, R. S. (1984b): Multivariate patterns of geographic variation between the island and mainland populations of the eastern grass snake (*Natrix natrix natrix*). – Journal of Zoology, London 204: 551-561.

Verfasser: DANIELA GUICKING, Univ. Kassel, Systematik und Morphologie der Pflanzen, Heinrich-Plett-Straße 40, D-34132 Kassel, Deutschland, bis Juli 2004: Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Im Neuenheimer Feld 364, D-69120 Heidelberg, Deutschland; E-Mail: daniela.guicking@gmx.de; ULRICH JOGER, Staatliches Naturhistorisches Museum, Pockelsstraße 10, D-38106 Braunschweig, Deutschland; MICHAEL WINK, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Im Neuenheimer Feld 364, D-69120 Heidelberg, Deutschland.