

Proteinelektrophoretische Untersuchungen zur Systematik der südgriechischen Blindschleichen (Squamata: Anguidae: *Anguis*)

Proteinelectrophoretic investigations on the systematic level of the Slow Worms (Squamata: Anguidae: *Anguis*) of Southern Greece

WERNER MAYER & HEINZ GRILLITSCH & ANTONIA CABELA

KURZFASSUNG: Proteinelektrophoretische Untersuchungen an Blindschleichen (*Anguis*) der Peloponnes und der Insel Kefalinia liefern den Beweis für die anderenorts (GRILLITSCH & CABELA 1990) aus morphometrischen Analysen abgeleitete artliche Eigenständigkeit von *A. fragilis peloponnesiacus* STEPANEK. Die Untersuchungsergebnisse unterstützen auch die dort geäußerte Ansicht über die artliche Identität dieses Taxons mit *A. f. var. cephallonica* WERNER.

ABSTRACT: Proteinelectrophoretic investigations in *Anguis* specimens of the Peloponnese and the island of Kefalinia established *A. fragilis peloponnesiacus* STEPANEK to rank species level, which was already asserted elsewhere (GRILLITSCH & CABELA 1990) based on morphometric analyses. Furthermore the results presented support the opinion of the authors cited above, *A. f. peloponnesiacus* STEPANEK and *A. f. cephallonica* WERNER being conspecific.

KEYWORDS: *Anguis*, *A. fragilis*, *A. f. fragilis*, *A. f. colchicus*, *A. f. peloponnesiacus*, *A. cephallonicus*, *A. fragilis* var. *cephallonica*; taxonomy; proteinelectrophoresis; Greece, Peloponnese, Kefalinia

EINLEITUNG

Wie erst seit kürzerem (BRINGSOE 1985) bekannt, leben auf der nördlichen Peloponnes zwei Blindschleichen-Formen z. T. sympatrisch, im Becken von Feneos sogar auf engstem Raum nebeneinander (MAYER & al. 1990). Nicht zuletzt wegen des Fehlens morphologischer Übergänge zu *Anguis fragilis/colchicus* betrachten GRILLITSCH & CABELA (1990) die bis dahin als *Anguis fragilis peloponnesiacus* STEPANEK bezeichnete Form als eigenständige Art, die sie für identisch mit der von den südlichen Ionischen Inseln beschriebenen *A. fragilis* var. *cephallonica* WERNER halten.

Erste elektrophoretische Proteinuntersuchungen an Blindschleichen der Peloponnes wurden bereits 1989 durchgeführt (erwähnt in GRILLITSCH &

CABELA 1990). Nun bietet neuerdings aufgesammeltes Material von der Insel Kefalinia und der Peloponnes die Gelegenheit, die systematischen Verhältnisse südgriechischer Blindschleichen anhand proteinelektrophoretischer Merkmale zu überprüfen und die Korrelation von eidonomischen und Protein-Merkmalen zu untersuchen.

MATERIAL UND METHODEN

Für die elektrophoretischen Untersuchungen standen insgesamt 10 Blindschleichen von der Peloponnes, 2 Exemplare von Kefalinia und für Vergleichszwecke 6 Tiere aus Ost-Österreich und 2 aus der Nordost-Türkei zur Verfügung (Tab. 1).

Nach Tötung mit Äther wurde den Tieren Skelettmuskel aus dem proximalen Schwanzabschnitt sowie Herz und Leber entnommen. Die Verarbeitung der Proben erfolgte entweder nach 24stündigem Einfrieren bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder sie blieben bis zur Untersuchung bei $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Die Gewebeproben wurden vor der Elektrophorese mit einer adäquaten Menge destillierten Wassers homogenisiert und zentrifugiert, die Elektrophoresen auf 12%igem Stärkegel durchgeführt, wobei als Gel- und Brückenpuffer für die Leberproben Phosphatpuffer pH 7,4, für Herz und Skelettmuskel Tris-Citrat-Puffer pH 7 Verwendung fand. Die enzymespezifischen Anfärbungen erfolgten nach SHAW & PRASAD (1970) bzw. MURPHY & al. (1990). Insgesamt wurden 15 Enzyme untersucht: LDH-1, LDH-2, MDH-1, MDH-2, α GPDH, ADA, MPI, GPI, GOT-1, GOT-2, CPK, AK, ADH, PGM-1, PGM-2.

Unabhängig davon wurden alle verfügbaren Exemplare von Feneos und Kefalinia hinsichtlich der in CABELA & GRILLITSCH (1989) und GRILLITSCH & CABELA (1990) verwendeten relevanten eidonomischen Parameter untersucht (sofern dies nicht schon anderenorts erfolgte) und dementsprechend *A. fragilis/colchicus* bzw. *A. cephalonicus* zugeordnet (Tab. 2, 3).

Die 8 elektrophoretisch untersuchten Tiere von Feneos sowie weitere 8 Exemplare aus früheren Aufsammlungen (von denen zwar keine elektrophoretischen Befunde erhoben werden konnten, die jedoch anhand eidonomischer Merkmale determiniert wurden und zum größten Teil in der Arbeit von GRILLITSCH & CABELA (1990) aufgeführt sind) stammen aus einem

Untersuchungen zur Systematik südgriechischer Blindschleichen

Tab. 1: Das für elektrophoretische Untersuchungen verfügbare *Anguis*-Material, die beobachteten Elektromorphen (s = langsam, m = mittel, f = schnell) der Enzyme GPI, GOT-1, CPK, PGM-1 und die systematische Bewertung des Untersuchungsmaterials (F = *A. f. fragilis*, C = *A. f. colchicus*, CEP = *A. cephalonicus*); NMW = Naturhistorisches Museum Wien, MTKD = Staatliches Museum für Tierkunde Dresden.

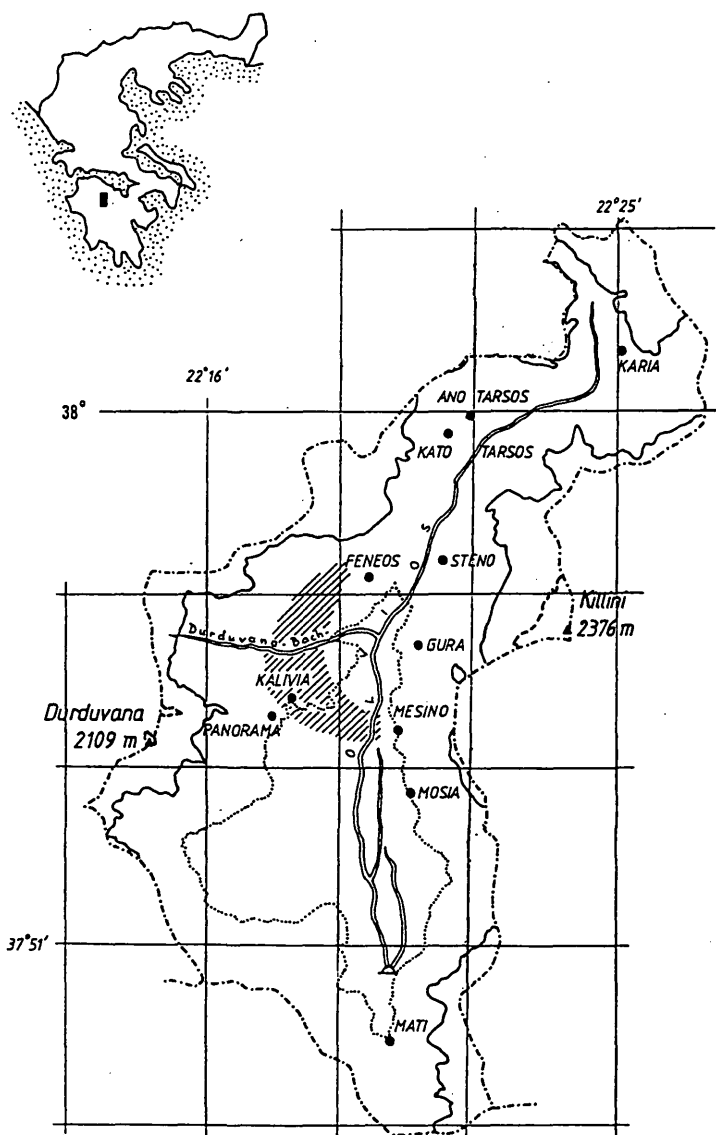
Table 1: *Anguis* specimens subject to present electrophoretic analysis, the electromorphs (s = slow, m = medium, f = fast) of the enzymes GPI, GOT-1, CPK, PGM-1, and taxonomic assignment of the specimens (F = *A. f. fragilis*, C = *A. f. colchicus*, CEP = *A. cephalonicus*); NMW = Naturhistorisches Museum Wien, MTKD = Staatliches Museum für Tierkunde Dresden.

Nr.	NMW Inv. Nr.	Fundort	Elektromorphen der Enzyme				chemosyst. eidonom.	
			GPI	GOT-1	CPK	PGM-1	Bewertung	
1	31835:1	Feneos/GR	s	f	f	s	Form 1	F/C
2	31835:2	Feneos/GR	s	f	f	s	1	F/C
3	32436	Feneos/GR	s	f	f	s	1	F/C
4	32435:3	Feneos/GR	f	f	m/s	f	Form 2	CEP
5	32435:4	Feneos/GR	f	f	m/s	f	2	CEP
6	32435:5	Feneos/GR	f	f	m	f	2	CEP
7	32435:6	Feneos/GR	f/m	f	m	f	2	CEP
8	32435:7	Feneos/GR	f	f	m/s	f	2	CEP
9	32090	Kalavrita/GR	f/m	f	s	f	2	CEP
10	31836	Taigetos/GR	f	f	s	f	2	CEP
11	32435:1	Poros, Kefalinea/GR	m	f	m	f	Form (2)	CEP
12	32435:2	Poros, Kefalinea/GR	m	f	m	f	(2)	CEP
13	MTKD	Hopa/TR	s	s	f	f		C
14	MTKD	Hopa/TR	s	s	f	f		C
15	31834:1	Kindberg/A	s	f	f	f		F
16	31834:2	Kindberg/A	s	f	f	f		F
17	31834:3	Kindberg/A	s	f	f	f		F
18	32089:1	Hinterbrühl/A	s	f	f	f		F
19	32089:2	Wechsel/A	s	f	f	f		F
20	32434	Steinwandklamm/A	s	f	f	f		F

relativ eng begrenzten Gebiet entlang des Durduvana-Baches und des mittleren Olvios-Flusses sowie einem Gebiet dazwischen (Abb. 1).

ERGEBNISSE

Bei 11 Enzymen konnte keine elektrophoretische Variabilität im Untersuchungsmaterial festgestellt werden, bei 4 Enzymen (GPI, GOT-1, CPK, PGM-1) fand sich mehr als eine Elektromorphe (Tab. 1).



800 m Schichtenlinie
 1400 m ..
 2000 m ..

0 1 2 4 6 8 10 km

Während die Stichproben aus Ost-Österreich, Kefalinia und der Nordost-Türkei in sich völlig einheitlich sind, ist die Stichprobe der Peloponnes bemerkenswert variabel. Im wesentlichen lassen sich bei ihr 2 Formen abgrenzen:

* Form 1: die Exemplare Nr. 1, 2, 3;

* Form 2: die Exemplare Nr. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 aus Tabelle 1 u. 2;

Die beiden Formen sind voneinander konstant in der Mobilität von 3 Proteinen verschieden.

Die Form 1 (eidonomisch identisch mit *A. fragilis/colchicus*) unterscheidet sich von österreichischen Blindschleichen in einem einzigen untersuchten Protein, von der Stichprobe aus der Nordost-Türkei in der Mobilität von 2 Enzymen.

Die Form 2 (eidonomisch identisch mit *A. cephalionicus* WERNER = *A. f. peloponnesiacus* STEPANEK) zeigt einen Polymorphismus der Enzyme GPI und CPK und ist den Exemplaren von Kefalinia (Nr. 11, 12) elektrophoretisch überaus ähnlich. Die beiden bei Peloponnes-Form-2-Tieren dimorphen Enzymloci sind im Kefalinia-Material monomorph und identisch mit jeweils einer der zwei für Peloponnes-Form-2-Tiere typischen Varianten.

Beide Schleichenformen leben im Becken von Feneos sympatrisch, alle 8 elektrophoretisch untersuchten Exemplare von dort zeigen an allen drei diagnostischen Loci die für die jeweilige Form typischen Merkmale.

Die eidonomische Untersuchung der elektrophoretisch bearbeiteten südgriechischen Tiere (Tab. 2, 3) erbrachte nur ausnahmsweise Werte, die außerhalb der in GRILLITSCH & CABELA (1990) angegebenen Grenzen liegen (in Tab. 3 durch Unterstreichung gekennzeichnet). Eindeutig ließen sich alle Exemplare anhand der skalierten Merkmalsausprägungen (Schuppenlängsreihen-Zahl, Ohr, Pileus-Typ, Halszeichnung, Dorsolateralcontrast und Vertebrallinie) zwei Typen zuordnen, wobei die Exemplare Nr. 3-12 mit *A. ce-*

Abb 1: Das Fundgebiet (schraffiert) der Exemplare Nr. 1 - 8 und weiterer 8 Blindschleichen (*Anguis*) im Becken von Feneos (Peloponnes, Griechenland).

Fig. 1: Chart of the Basin of Feneos (Peloponnes, Greece). The area where the specimens no. 1 - 8, and 8 other Slow Worms (*Anguis*) were found is hatched.

phallonicus WERNER (= *A. f. colchicus* STEPANEK) und die mit den Nummern 1-3 mit *A. fragilis/colchicus* identisch sind. Letztere erwiesen sich mit einheitlicher Boniturstufe 6 (0 = typisch *fragilis*, 12 = typisch *colchicus*) als ausgesprochen intermediär.

DISKUSSION

Wie aus den Tabellen 1 und 2 ersichtlich korrelieren die elektrophoretischen Befunde völlig mit den Bewertungen auf eidonomischer Grundlage, ermöglichen aber im vorliegenden Fall eine zuverlässigere Aussage über das

Tab. 2: Die Exemplare Nr. 1-12 aus Tabelle 1, ihre meristischen, Farb- und Zeichnungsmerkmale sowie die daraus resultierende taxonomische Bewertung. (SQU = Anzahl der Rumpfschuppen-Längsreihen; Ohr = Ausbildung der Ohröffnung: ++ = beidseitig deutlich, -- = beidseitig fehlend; PK = Präfrontalia-Konstellation nach LAC (1967), (An) = Anomalie; HZ = Trennlinie im vorderen Halsseitenbereich: f = flammig, g = gerade; BF = Blaufleckung; VL = dunkle Vertebraallinie: + = durchgehend stark, (+) = durchgehend schwach, v± = vorne aufgelöst, hinten fehlend; DK = Dorsolateralkontrast: + = stark, (+) = mäßig, - = schwach bis fehlend; F = *A. f. fragilis*; C = *A. f. colchicus*; CEP = *A. cephalonicus*)

Table 2: The specimens no. 1-12 from table 1, their meristic characters, colour and pattern, and the taxonomic evaluation resulting (SQU = number of longitudinal series of squamae; Ohr = aspect of ear openings: ++ = present on either side, -- = absent on either side; PK = type of disposal of prefrontals according to LAC (1967), (An) = abnormal; HZ = line of demarcation in the lateral neck area: f = strongly undulate, g = straight; BF = blue dots; VL = dark vertebral line: + = distinctly continuous, (+) = indistinctly continuous, v± = discontinuous before, missing behind; DK = dorsolateral contrast: + = striking, (+) = moderate, - = weak or missing; F = *A. f. fragilis*; C = *A. f. colchicus*; CEP = *A. cephalonicus*)

Nr.	SQU	Ohr	PK	HZ	BF	VL	DK	Bewertung
1	26	++	A	g	+	(+)	-	F/C
2	26	++	A	g	-	+	+	F/C
3	26	++	A	g	+	+	-	F/C
4	32	--	C	f	-	v±	+	CEP
5	32	--	C	f	-	v±	+	CEP
6	34	--	C	f	-	v±	+	CEP
7	32	--	C(An)	f	-	v±	+	CEP
8	32	--	C	f	-	v±	(+)	CEP
9	32	--	C	f	-	v±	+	CEP
10	36	--	C	f	-	v±	+	CEP
11	32	--	C	f	-	v±	+	CEP
12	34	--	C(An)	f	-	v±	+	CEP

 Untersuchungen zur Systematik südgriechischer Blindschleichen

Tab. 3: Beschreibende Statistik der Exemplare 1 - 12 aus Tabelle 1. (KRL = Kopf-Rumpf-Länge; SL = Schwanzlänge; PL = Pileuslänge; PH = Parietalhöhe; SNL = Schnauzenlänge; PB = Parietalbreite; RU = Rumpfumfang; GL = Gesamtlänge; n = Anzahl Exemplare; min = Minimum; \bar{x} = Mittelwert; max = Maximum).

Table 3: Descriptive statistics of the specimens no. 1 - 12 from table 1. (KRL = snout-vent-length; SL = tail length; PL = length of pileus; PH = parietal height; SNL = length of snout; PB = parietal width; RU = circumference of trunk; GL = total length; n = sample size; min = minimum value; \bar{x} = mean value; max = maximum value).

KRL/SL PL/PH KRL/PL KRL/SNL KRL/PB PL/PB PB/PH SNL/PH KRL/RU PL/SNL GL/(RU/1)

Exemplare Nr. 4 - 10 "peloponnesiacus"

n	6	7	7	7	7	7	7	6	7	5	
min	0,67	3,68	10,17	33,06	22,80	2,17	1,55	1,05	5,67	3,15	42,49
\bar{x}	0,70	4,04	11,06	38,48	26,14	2,36	1,72	1,16	6,01	3,48	46,53
max	0,75	4,82	11,75	41,36	28,37	2,50	2,09	1,33	6,81	3,79	<u>52,21</u>

Exemplare Nr. 11 - 12 "var. cephalonica"

n	0	2	2	2	2	2	2	2	2	0
min		3,58	10,38	37,13	24,19	2,23	1,47	1,00	5,29	<u>3,45</u>
\bar{x}		3,61	10,62	37,32	24,70	2,33	1,55	1,03	5,46	3,51
max		3,63	10,87	37,50	25,20	2,43	1,63	1,05	<u>5,63</u>	3,58

Exemplare Nr. 4 - 12 "peloponnesiacus + var. cephalonica"

n	6	9	9	9	9	9	9	9	8	9	5
min	0,67	3,58	10,17	33,06	22,80	2,17	1,47	1,00	5,29	3,15	42,49
\bar{x}	0,70	3,94	10,97	38,22	25,82	2,35	1,68	1,13	5,87	3,49	46,53
max	0,75	4,82	11,75	41,36	28,37	2,50	2,09	1,33	6,81	3,79	<u>52,21</u>

Exemplare Nr. 1 - 3 "nicht peloponnesiacus" von der Peloponnes

n	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2
min		3,04	12,36	39,48	29,08	2,24	1,11	<u>0,85</u>	4,94	2,93	<u>22,44</u>
\bar{x}		3,16	12,97	43,49	31,74	2,44	1,31	0,95	5,48	3,36	30,85
max		3,36	13,48	46,03	36,85	2,73	1,50	1,04	5,80	3,64	39,27

Differenzierungsniveau der beiden Formen, indem die Wahrscheinlichkeit abgeschätzt werden kann, mit der eine bestehende Panmixie nicht erkannt worden wäre. Die Wahrscheinlichkeit (p), in einem tatsächlich panmiktischen

System bei der Betrachtung von drei diagnostischen Loci unter 8 Exemplaren zufällig nur solche ohne Anzeichen einer Vermischung zu finden, ist stark von der Häufigkeitsverteilung der diagnostischen Merkmale (=Morphen) abhängig; bei einem Verhältnis von 50:50 beträgt $p \approx 10^{-12}$, bei 75:25 - $p \approx 10^{-6}$, bei 90:10 - $p \approx 6 \times 10^{-3}$. Von insgesamt 16 im Gebiet von Feneos aufgesammelten Blindschleichen gehören (nach elektrophoretischen und/oder eidonomischen Kriterien) 5 der Form 1 an (ca. 30%). Betrachtet man diese Häufigkeitsverteilung von 30:70 im Untersuchungsgebiet als repräsentativ und legt sie der oben angestellten Berechnung zugrunde, ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von $p \approx 10^{-8}$ für die Annahme, daß hier eine unrepräsentative Zufallsstichprobe von durchwegs jeweils Homozygoten der beiden Formen aus einem tatsächlich panmiktischen, im HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht stehenden System vorliegt.

Die Ergebnisse stellen somit einen Beweis für die artliche Eigenständigkeit der beiden *Anguis*-Formen der Peloponnes dar. Darüberhinaus unterstützt die große elektrophoretische Ähnlichkeit der Form 2 von der Peloponnes mit den Tieren von Kefalinia die Annahme der artlichen Identität dieser beiden.

DANKSAGUNGEN: Die Autoren danken den Herrn H. WEISSINGER (St. Andrä/Wörtern), Dipl.-Biol. F.-J. OBST (Leipzig) und Mag. P. F. KEYMAR (Wien) für die Bereitstellung von Blindschleichenmaterial sowie Herrn W. ADAM (Wien) für die Anfertigung der Karte.

LITERATUR

- BRINGSOE, H. (1985): A check-list of Peloponnesian amphibians and reptiles, including new records from Greece.- Ann. Mus. Goulandris, Kifissia; 7: 271-318.
- CABELA, A. & GRILLITSCH, H. (1989): Zum systematischen Status der Blindschleiche (*Anguis fragilis* LINNAEUS, 1758) von Nordgriechenland und Albanien (Squamata: Anguidae).- Herpetozoa, Wien; 2(1/2): 51-69.
- GRILLITSCH, H. & CABELA, A. (1990): Zum systematischen Status der Blindschleichen (Squamata: Anguidae) der Peloponnes und der südlichen Ionischen Inseln (Griechenland).- Herpetozoa, Wien; 2(3/4): 131-153.
- LAC, J. (1967): K systematike slépúcha lámaveho (*Anguis fragilis* L.) a jeho rozsirenie na Slovensku.- Biologia, Bratislava; 22: 908-921.
- MAYER, W. & RICHTER, K. & KAMMEL, W. (1990): Kartierung der Herpetofauna des Beckens von Feneos (Griechenland: Nord-Peloponnes).- Herpetozoa, Wien; 2(3/4): 87-106.
- MURPHY, R. W. & SITES, J. W. & BUTH, D. G. & HAUFLE, C. H. (1990): Proteins I. Isozyme electrophoresis. In: HILLIS, D. M. & MORITZ, C. (Ed.): Molecular systematics. Sinauer Ass. Inc., Sunderland, Massachusetts; pp. 45-126.

Untersuchungen zur Systematik südgriechischer Blindschleichen

SHAW, J. & PRASAD, R. (1970): Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes.- *Biochem. Genet.*; 4: 297-330.

EINGANGSDATUM: 5. September 1991

AUTOREN: Dr. Werner MAYER, Dr. Heinz GRILLITSCH, Dr. Antonia CABELA,
Naturhistorisches Museum Wien, Erste Zoologische Abteilung, Burgring 7, A-1014 Wien,
Österreich.