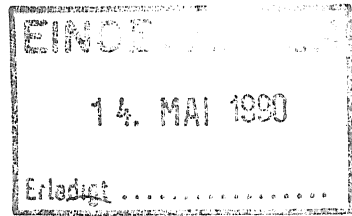


- Bibl. - Zool.



Xc 436



**ALBUMIN-IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR
PHYLOGENIE DER PALÄARKTISCHEN GROSSVIPERN
(REPTILIA: SERPENTES: VIPERIDAE)**

DIPLOMARBEIT

am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn

von

HANS-WERNER HERRMANN

Marburg/Lahn, im Mai 1990

Inhalt

1. Einleitung.....	1
1.1. Historischer Überblick.....	2
1.2. Die systematische Situation.....	7
1.3. Die Neutralitätstheorie der molekularen Evolution...	14
1.3.1. Die Theorie.....	14
1.3.2. Die Molekularuhr.....	20
1.3.3. Die Evolution des Albumins.....	23
1.4. Molekulare Systematik.....	28
2. Zielsetzung.....	32
3. Material und Methoden.....	33
3.1. Material.....	33
3.2. Elektrophoretische Methoden.....	35
3.3. Immunologische Methoden.....	35
3.3.1. Antigenpräparation.....	35
3.3.2. Antiserenproduktion.....	37
3.3.3. Reinheitskontrollen.....	39
3.3.4. Titerbestimmung.....	40
3.3.5. Quantitativer Präzipitintest.....	41
3.4. Äquivalenzpunktfindung.....	42
3.5. Homologenkorrektur.....	52
3.6. Berechnung der immunologischen Distanzen.....	54
3.7. Statistische Behandlung der Daten und Ausschluß ungeeigneter Werte.....	55
3.8. Reziprozität der immunologischen Daten.....	57
3.9. Korrektur nichtzufälliger Abweichungen von der idealen Reziprozität ("nonrandom elements").....	59
3.10. Test auf unterschiedliche Evolutions- geschwindigkeiten ("relative rate test").....	60
3.11. Stammbaumrekonstruktion.....	61
3.12. Eichung der Zeitskala und Berechnung der Isolationszeiten.....	64
3.13. Methodenkritik.....	65

4. Ergebnisse.....	70
4.1. Immunologische Ergebnisse.....	70
4.1.1. Immunologische Distanzen.....	70
4.1.1.1. Anti- <u>Vipera xanthina</u> -Albumin.....	72
4.1.1.2. Anti- <u>Vipera raddei</u> -Albumin.....	72
4.1.1.3. Anti- <u>Vipera l. lebetina</u> -Albumin.....	73
4.1.1.4. Anti- <u>Vipera mauritanica deserti</u> Albumin.....	73
4.1.1.5. Anti- <u>Vipera palaestinae</u> -Albumin.....	74
4.1.1.6. Anti- <u>Pseudocerastes p. persicus</u> Albumin.....	74
4.1.1.7. Anti- <u>Echis leucogaster</u> -Albumin.....	74
4.1.1.8. Diskussion der immunologischen Distanzen.....	75
4.1.2. Korrektur der immunologischen Distanzen.....	78
4.1.2.1. Korrektur der unterschiedlichen Differenzierungs- fähigkeit der Antiseren.....	78
4.1.2.2. Relative Evolutionsgeschwindigkeit der Albumine.....	81
4.1.2.3. Diskussion der Korrekturen.....	84
4.1.3. Eichung der linearen Zeitskala.....	86
4.1.4. Stammbaumrekonstruktion	88
4.1.4.1. Stammbaumrekonstruktion nach der Methode von FITCH & MARGOLIASH (1967).....	88
4.1.4.2. Stammbaumrekonstruktion durch hierarchisches Zusammenfassen ("Clusteranalyse").....	95
4.2. Elektrophoretische Ergebnisse.....	100
4.2.1. Interspezifische Variabilität.....	100
4.2.2. Intraspezifische Variabilität.....	101
4.3. Diskussion der serologischen Ergebnisse.....	102
5. Phylogenie und mögliche Verbreitungsgeschichte aufgrund der immunologischen Ergebnisse.....	114
6. Zusammenfassung.....	120
7. Danksagung.....	123
8. Literatur.....	125
9. Anhang.....	132

1. Einleitung

Die Giftschlangen der Gattung Vipera Laurenti, 1768 waren und sind seit jeher ein Gegenstand intensiven Interesses und eingehender Erforschung. Dazu beigetragen hat zum einen sicherlich der von Giftschlangen ausgehende besondere Reiz, der sich schon in den Schriften Francesco Redis (1670, in KNOEFEL, 1988) widerspiegelt, zum anderen ihre für den Menschen beträchtliche Bedeutung durch ihre Giftigkeit. Weltweit und von allen Giftschlangen zusammen verursacht zählt man mehr als 40.000 Todesfälle pro Jahr (MEBS & KORNALIK, 1981). Die Mitglieder der Gattung Vipera waren aufgrund ihrer Verbreitung dem europäischen Naturwissenschaftler schon immer am ehesten zugänglich, was sich in der Fülle der Arbeiten über diese Gruppe ausdrückt. Trotz dieser vielfältigen Behandlung der Gruppe kann man z.Z. weder die Alpha- noch die Beta-Taxonomie als weitgehend geklärt betrachten.

Gerade in der Herpetologie sieht sich der Bearbeiter systematischer Gruppen vielen Problemen gegenüber, die mit den konventionellen Methoden der Systematik nur begrenzt zu lösen sind (DESSAUER 1974). Die Seltenheit brauchbarer Fossilien, die ausgeprägte Merkmalsreduktion (z. B. der Gliedmaßen) in vielen Gruppen und die z. T. extreme Modifikation und Spezialisierung (z.B. bei Schlangen) verlangen nach neuen Methoden, die unabhängig von den genannten Faktoren die Rekonstruktion der Phylogenie der untersuchten Taxa erlauben (siehe Zielsetzung, Abschnitt 2.).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist nicht die Gesamtheit der Gattung Vipera, sondern nur ein größerer Ausschnitt, nämlich die sogenannten paläarktischen Großvipern. Sie werden heute vielfach unter folgenden Gattungsnamen geführt:

Daboia GRAY, 1842 (sensu OBST, 1983)

Pseudocerastes BOULENGER, 1896

Eristicophis ALCOCK & FINN, 1897

Zu allen Zeiten wurden mindestens Teile der zugehörigen Arten (Formenübersicht siehe Abschnitt 1.2.) der Gattung Vipera zugerechnet. Dies ist einer der Gründe für eine außerordentlich wechselvolle Geschichte der Klassifikation und Nomenklatur der Großvipern. Darauf soll zunächst eingegangen werden.

1.1. Historischer Überblick

Im Folgenden soll die wechselhafte Geschichte der Klassifikation z.T. in der Gattung Vipera vereinigter paläarktischer Großvipern dokumentiert werden.

GRAY schuf 1842 die Gattung Daboia mit den Arten D. xanthina, D. mauritanica, D. superciliaris und der Typusart D. russelli. Die heutige monotypische Gattung Pseudocerastes stellt er zu den afrikanischen Viperiden der heutigen Gattung Bitis und nennt diese Sammelgruppe Clotho.

STRAUCH (1869) betrachtet Daboia und Clotho als Synonyme der Gattung Vipera. Er erkennt überhaupt nur drei verschiedene Gattungen innerhalb der Viperinae, nämlich Atheris, Echis und Vipera an. Vipera ist in diesem Sinne ein Sammelbecken, dessen Mitglieder später in verschiedene andere Gattungen überführt wurden.

In den Jahren 1924-1935 produziert REUSS eine wahre Flut von neuen Unterart-, Art- und Gattungsnamen, die später vorwiegend in der Synonomie verschwinden. Unter anderem kreiert er die Gattung Macrovipera Reuß, 1927 mit der Typusart M. lebetina. Diese Gattung zitiert er später (REUSS, 1935) in einer Art systematischer Liste.

In seiner Arbeit zur Systematik der europäischen und mediterranen Ottern zählt SCHWARZ (1936) Macrovipera als Synonym wieder zu Vipera und schlägt die Taxa xanthina, raddei, deserti, mauritanica als Unterarten zu lebetina. Die heute validen Taxa bornmuelleri und obtusa sind bei SCHWARZ Synonyme von lebetina.

WERNER (1938) beschreibt V. palaestinae und trennt diese dabei von V. xanthina. Er vertritt die Meinung, "daß V. lebetina, mauritanica und deserti als Rassen derselben Art V. lebetina anzusehen sind, dagegen die vorliegende (palaestinae) ebenso wie V. xanthina und raddei besondere Arten vorstellen".

MERTENS (1951) folgt seiner Meinung, erkennt aber im Falle von V. lebetina noch die Unterarten obtusa, turanica und schweizeri an. Ein Jahr später allerdings revidiert er diese Ausführungen und bezeichnet aus geographischen Gründen sowohl raddei als auch palaestinae wieder als Unterarten von xanthina (MERTENS, 1952).

KRAMER & SCHNURRENBERGER (1959) werten das Taxon mauritanica als gute Art mit der Nominatform und deserti als Subspezies. Sie meinen eine gewisse Ähnlichkeit mit V. palaestinae feststellen zu können.

KLEMMER (1963) folgt der Mertensschen Auffassung, revalidiert aber sogar die bis dahin als Synonym betrachtete V. lebetina euphratica. In der Gattung Pseudocerastes nennt er die vier Arten bicornis, fieldi, latirostris und persicus. Eristicophis ist eine monotypische Gattung in seiner Liste. Für V. russelli existieren vier Subspezies.

Pseudocerastes latirostris wird allerdings 1965 von MARX & RABB als gleichbedeutend mit Eristicophis erkannt. Ebenfalls wird P. bicornis mit P. persicus synonymisiert, und P. fieldi wird als Unterart von persica angesehen. In dieser Arbeit vertreten MARX & RABB aufgrund ihrer osteologischen und morphologischen Untersuchungen die

Meinung, daß die nunmehr monotypische Gattung Pseudocerastes deutliche Ähnlichkeit mit der Vipera-lebetina-Gruppe aufweist und daher zur Gattung Vipera zu rechnen ist. Eristicophis erscheint ihnen allerdings auf Gattungsebene von Vipera getrennt zu sein.

EISELT & BARAN (1970) bezweifeln in ihrer Arbeit die Validität von V. lebetina euphratica.

OBST (1983) erkennt die Gattung Vipera in ihrer derzeitigen Zusammensetzung als sehr heterogen. Er trennt die Großformen der Gattung von Vipera und revalidiert den alten Grayschen Gattungsnamen Daboia. Die Gattung Daboia s. str. beinhaltet nach OBST D. lebetina (mit deserti, lebetina, mauritanica, obtusa, schweizeri und turanica), D. persicus (mit fieldi und persicus) sowie D. palaestinae und D. russelli (mit limitis, pulchella, siamensis und russelli). Erweiternd faßt er zu Daboia s. l. die Arten D. xanthina und D. raddei (mit bornmuelleri, latifii und raddei). Unsicherheit äußert er allerdings in den Fragen der Validität von D. lebetina euphratica und des Status von mauritanica.

GROOMBRIDGE (1980, 1986) (Abb. 1) zeigt mit seinen Untersuchungen, daß Pseudocerastes und Eristicophis untereinander und auf Gattungsniveau enge Beziehungen aufweisen. Nach seiner Ansicht sind beide hinreichend von Vipera separiert. Das Gattungskonzept sensu OBST wird von ihm nicht übernommen.

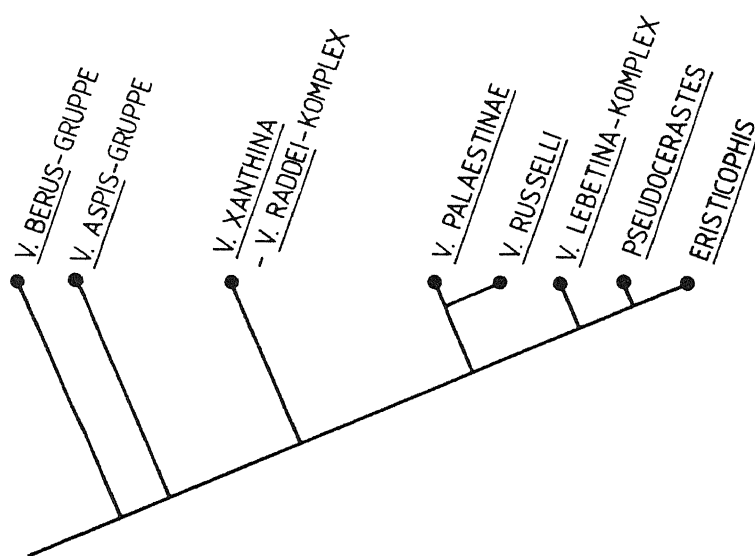


Abb. 1. Diagramm der phylogenetischen Beziehungen euroasiatischer Viperinae aufgrund von morphologischen, anatomischen und osteologischen Merkmalen (umgezeichnet nach GROOMBRIDGE 1986).

In seiner Arbeit über die Giftschlangen des Nahen und Mittleren Ostens vertritt JOGER (1984) die Auffassung, daß es eventuell gerechtfertigt erscheint, V. russelli, lebetina und palaestinae in die Gattung Daboia zu stellen. Trotzdem benutzt er den Gattungsnamen Vipera für die genannten Fälle. Eristicophis und Pseudocerastes betreffend folgt er GROOMBRIDGE. Etwas vereinfachend erscheint es, wenn JOGER der Art lebetina nur drei Unterarten, nämlich lebetina, obtusa und schweizeri, zurechnet. Die Namen euphratica und turanica sind mit obtusa synonymisiert. Im xanthina-Komplex vereint er bornmuelleri, latifii, palaestinae, raddei, xanthina und eine bisher unbeschriebene Form aus dem Cilikischen Taurus. Bezüglich palaestinae vermerkt er allerdings, daß dieses Taxon ebensogut nähere Beziehungen zu russelli oder lebetina aufweisen kann.

In ihrer Revision des V. xanthina-Komplexes äußern NILSON & ANDREN (1986), daß sie keine Synapomorphie finden konnten,

die ein Schwestergruppenverhältnis des xanthina- und des lebetina-Komplexes wirklich stützt. In diesem Zusammenhang erscheint die Einbeziehung des xanthina-Komplexes in Daboia nach OBST (1983) etwas hypothetisch. Der xanthina-Komplex besteht nach der Meinung der Autoren aus V. albicornuta, V. bornmuelleri, V. bulgardaghica, V. latifii, V. r. raddei, V. raddei kurdistanica, V. wagneri und V. xanthina.

HERRMANN et al. (1987) fanden anhand immunologischer Methoden eine deutliche Abgrenzung der "Großvipern" von den übrigen Mitgliedern der Gattung Vipera. Allerdings konnte auch hier nicht eindeutig entschieden werden, zu welcher der beiden Gruppen der xanthina-Komplex zu zählen ist.

In neuester Zeit wurde von NILSON & ANDREN (1988) ein neues Taxon aus der lebetina-Gruppe beschrieben. Es handelt sich um V. lebetina transmediterranea aus Nordafrika. Außerdem wird schweizeri erstmals Artrang zuerkannt und euphratica und peilei als "nominal taxa" Validität als Unterarten von lebetina zugestanden.

ASHE et al. (1988) kamen in ihrer Analyse zu einer "fragmentation of the species hithero included in the genus Vipera". Die Gattung Vipera s. l. ist nach ihren Ergebnissen mit Sicherheit nicht monophyletisch. Der Gattungstatus von Eristicophis und Pseudocerastes scheint gesichert. Beide Gattungen sind untereinander und mit Cerastes nah verwandt. Die Gattung Vipera weist eine "fundamental polyphyly" auf und "has been composed of taxa which are united by the shared presence of primitive character states". Sie kommen zu dem Ergebnis, daß "our data provide absolutely no support for the traditional concept of the genus Vipera".

Zur Klärung der Beziehungen zwischen den Mitgliedern der Gattung Vipera scheint es angeraten, andere als die bisher verwandten morphologischen und osteologischen Merkmale und Methoden zu erschließen.

1.2. Die systematische Situation

Aufgrund der in 1.1. dargestellten Geschichte der Taxa wird derzeit die folgende Klassifikation der pläarktischen Großvipern von den meisten Autoren (z.B. ASHE et al., 1988; BRODMANN, 1987; HERRMANN et al., 1987; JOGER, 1984; NILSON & ANDREN, 1986; NILSON et al., 1988; etc.) akzeptiert oder mangels eines besseren Konzeptes teilweise bzw. vollständig in der unten dargestellten Form benutzt.

In der folgenden Aufzählung sind keine vollständigen Synonymielisten angegeben. Zusätzlich (ohne Unterstreichung) aufgeführte Namen sind lediglich unsichere nominelle Taxa, also solche, die hier nicht als valide Taxa erscheinen.

Eristicophis macmahoni Alcock & Finn, 1897 (Abb. 2, 3, 19)
Pseudocerastes latirostris Guibé, 1957
 Verbreitung: Afghanistan, Pakistan.

Pseudocerastes persicus Boulenger, 1896
Pseudocerastes bicornis Wall, 1913
Pseudocerastes persicus persicus (Duméril, Bibron & Dumeril, 1854) (Abb. 19)
 Verbreitung: Iran, Pakistan.

Pseudocerastes persicus fieldi Schmidt, 1930 (Abb. 4, 19)
 Verbreitung: Irak, Jordanien, Israel, Saudi-Arabien, Sinai.

Vipera-lebetina-Komplex:

Vipera mauritanica (Duméril & Bibron in Guichenot, 1848)
Vipera mauritanica mauritanica (Abb. 5, 18)
 Verbreitung: Marokko, Algerien, Tunesien
Vipera mauritanica deserti Anderson, 1892 (Abb. 6, 18)
 Verbreitung: Algerien, Tunesien, Libyen.

Vipera lebetina (Linnaeus, 1758)
Vipera lebetina lebetina (Abb. 7, 18)
 Verbreitung: Zypern
Vipera lebetina obtusa Dwigubskij, 1832 (Abb. 8, 18)
Vipera euphratica Martin, 1838
 Verbreitung: UdSSR, Türkei, Iran, Syrien, Pakistan, Libanon.

Vipera lebetina schweizeri Werner, 1935 (Abb. 10, 11, 18)
 Verbreitung: Griechenland (Cycladen: Milos, Kimolos, Polinos, Siphnos).

Vipera lebetina transmediterranea Nilson & Andrén, 1988 (Abb. 18)
 Verbreitung: Algerien, Tunesien.

Vipera lebetina turanica Chernov, 1940 (Abb. 9, 18)
Vipera peilei Murray, 1892
 Verbreitung: UdSSR, Iran, Afghanistan, Pakistan, Indien.

Vipera palaestinae Werner, 1938 (Abb. 12, 18)
 Verbreitung: Syrien, Libanon, Jordanien, Israel.

Vipera russelli (Shaw, 1802)
Vipera russelli russelli (Abb. 13, 19)
 Verbreitung: Pakistan, Indien, Bangladesch.
Vipera russelli formosensis Maki, 1931 (Abb. 19)
 Verbreitung: Taiwan
Vipera russelli limitis Mertens, 1927 (Abb. 19)
 Verbreitung: Java, Komodo, Flores, Ende, Lomblen.
Vipera russelli pulchella (Gray, 1842) (Abb. 19)
 Verbreitung: Sri Lanka
Vipera russelli siamensis Smith, 1917 (Abb. 14, 19)
 Verbreitung: Burma, Thailand, China.

Vipera-xanthina-Komplex:

Vipera albicornuta Nilson & Andrén, 1985 (Abb. 20)
 Verbreitung: Iran.

Vipera bornmuelleri Werner, 1898 (Abb. 20)
 Verbreitung: Libanon.

Vipera bulgardaghica Nilson & Andrén, 1985 (Abb. 20)
 Verbreitung: Türkei.

Vipera latifii Mertens, Darevsky & Klemmer, 1967 (Abb. 20)
 Verbreitung: Iran.

Vipera raddei Boettger, 1890
Vipera raddei raddei (Abb. 15, 20)
 Verbreitung: Türkei, UdSSR, Iran.
Vipera raddei kurdistanica Nilson & Andrén, 1986 (Abb. 20)
 Verbreitung: Türkei, Iran.

Vipera wagneri Nilson & Andrén, 1984 (Abb. 20)
 Verbreitung: Türkei, Iran.

Vipera xanthina (Gray, 1849) (Abb. 16, 20)
 Verbreitung: Griechenland, Türkei.

Alternativ zu dieser Einteilung setzt sich in jüngerer Zeit vermehrt die von OBST (1983) vorgeschlagene Nomenklatur durch, nach der die oben genannten Arten der Gattung Vipera und die Gattung Pseudocerastes den revalidierten Gattungsnamen Daboia erhalten. GRUBER (1989) benutzt Daboia sensu OBST als Untergattung und schließt somit einen Kompromiß.

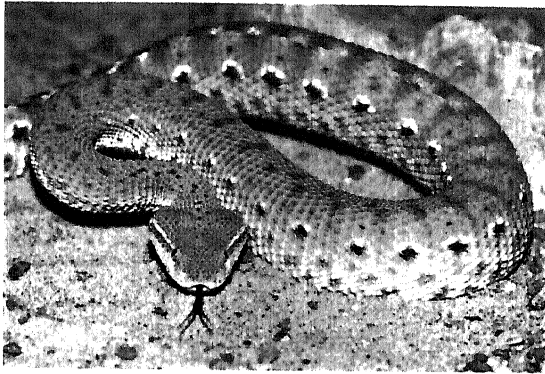


Abb. 2. Eristicophis macmahoni
(Aufn. M. Lehmann)

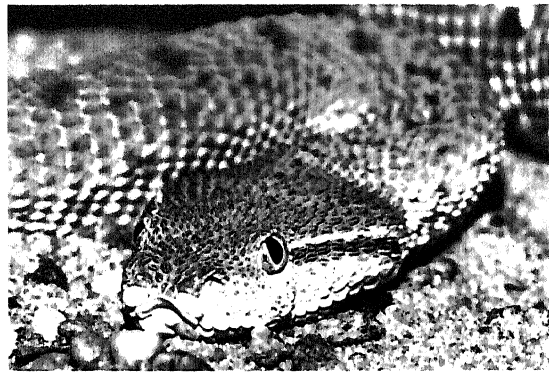


Abb. 3. E. macmahoni
(Aufn. M. Lehmann)



Abb. 4. Pseudocerastes
persicus fieldi

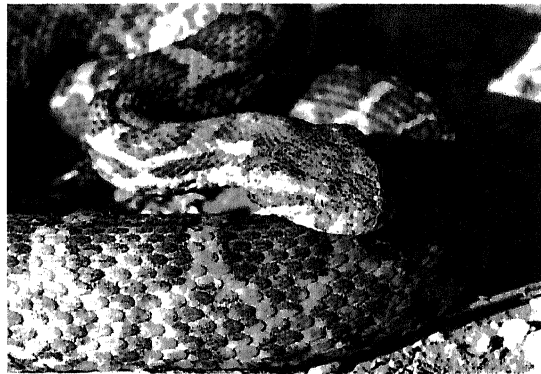


Abb. 5. Vipera m. mauritanica
(Aufn. U. Joger)

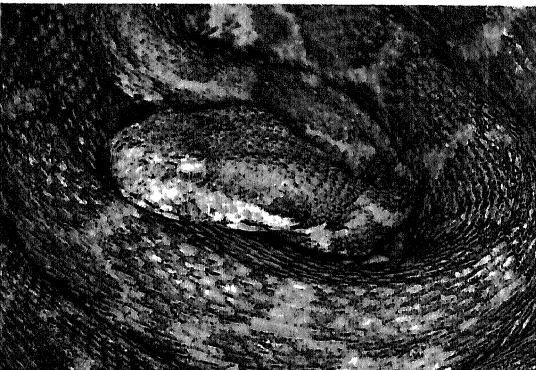


Abb. 6. V. m. deserti

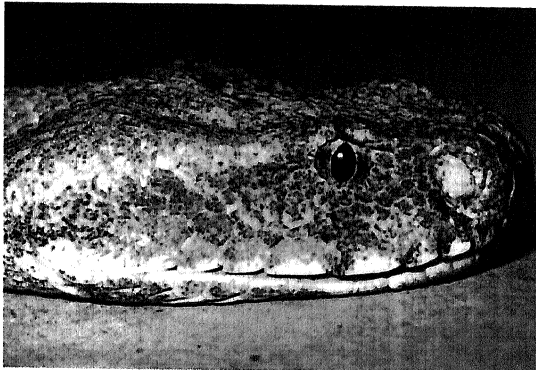


Abb. 7. V. l. lebetina

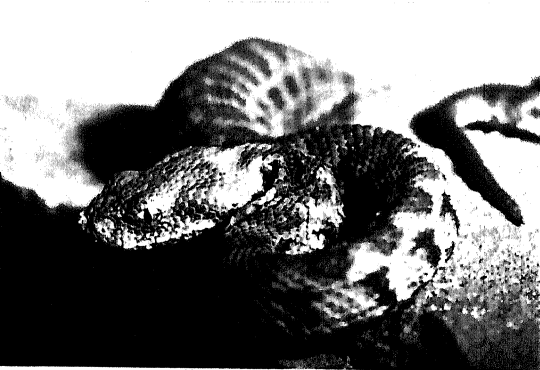


Abb. 8. V. l. obtusa (juv.)

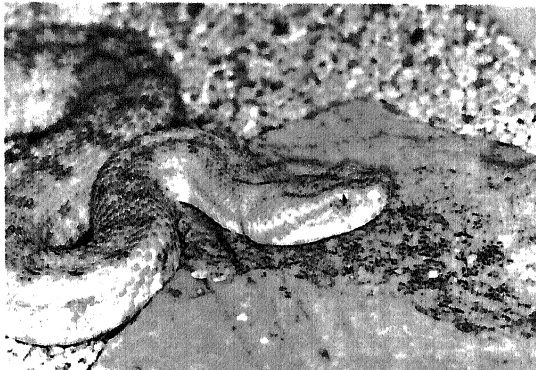


Abb. 9. V. l. turanica
(Aufn. U. Joger)

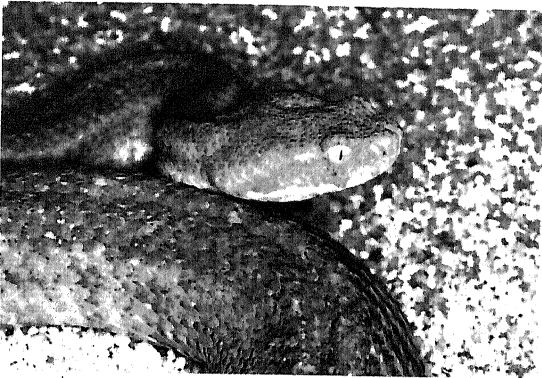


Abb. 10. V. l. schweizeri
(rote Form)



Abb. 11. V. l. schweizeri



Abb. 12. V. palaestinae

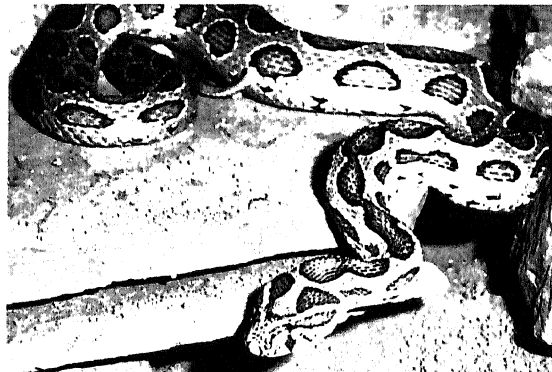


Abb. 13. V. r. russelli

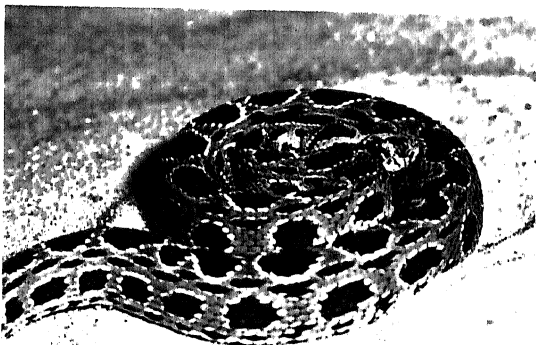


Abb. 14. V. r. siamensis
(juv.)

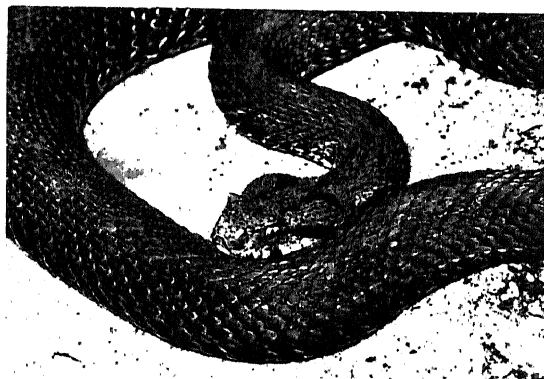


Abb. 15. V. r. raddei
(Aufn. U. Joger)

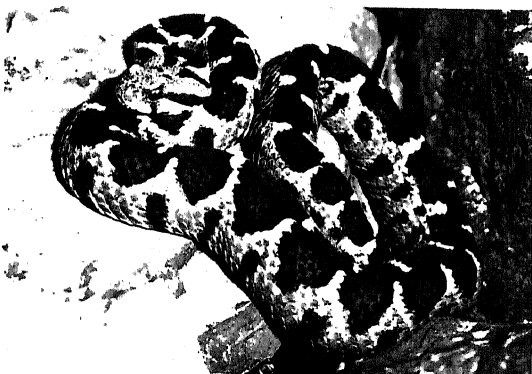


Abb. 16. V. xanthina



Abb. 17. Echis multisquamatus

Abb. 18. Verbreitung der Arten des *Vipera lebetina*-Komplexes und von *V. palaestinae* (nach BRODMANN 1987, JOGER 1984 und NISLON & ANDREN 1988).

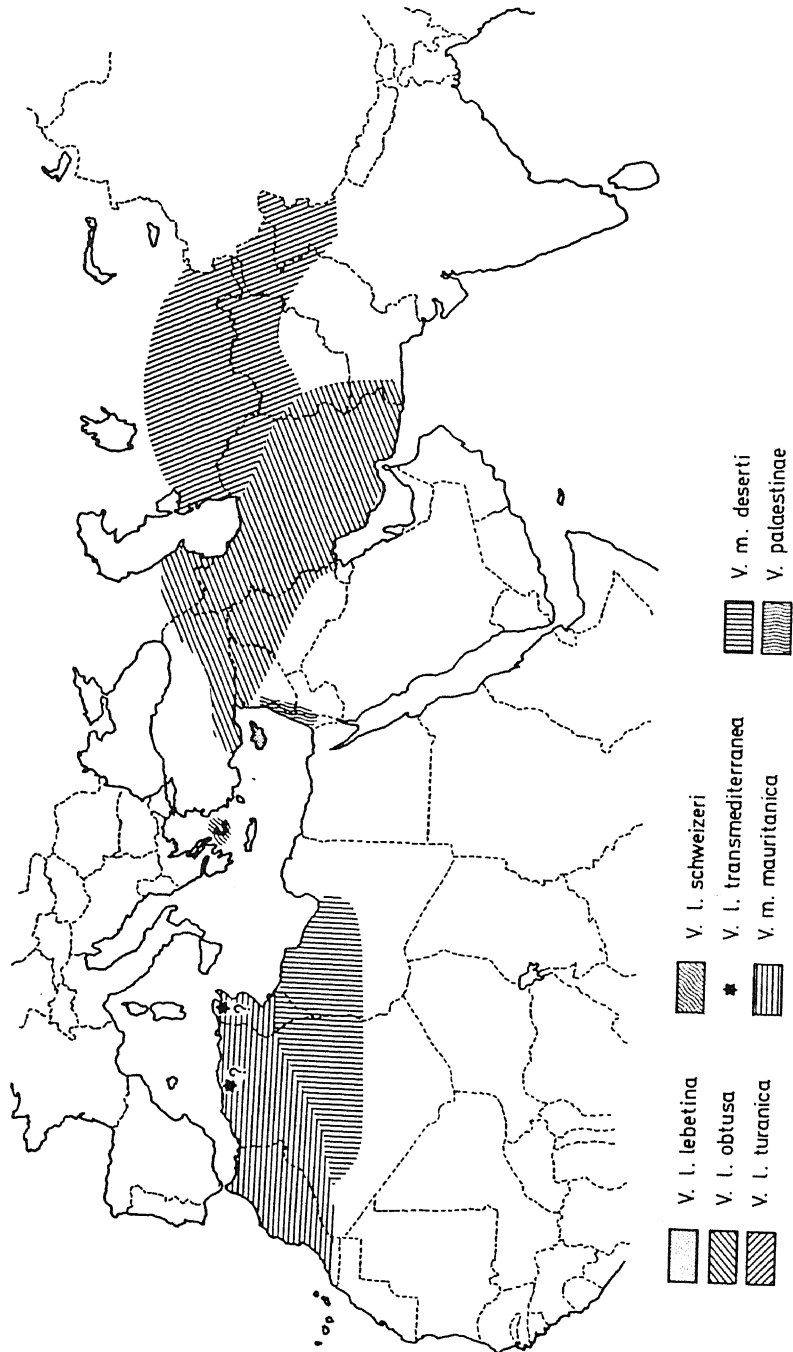
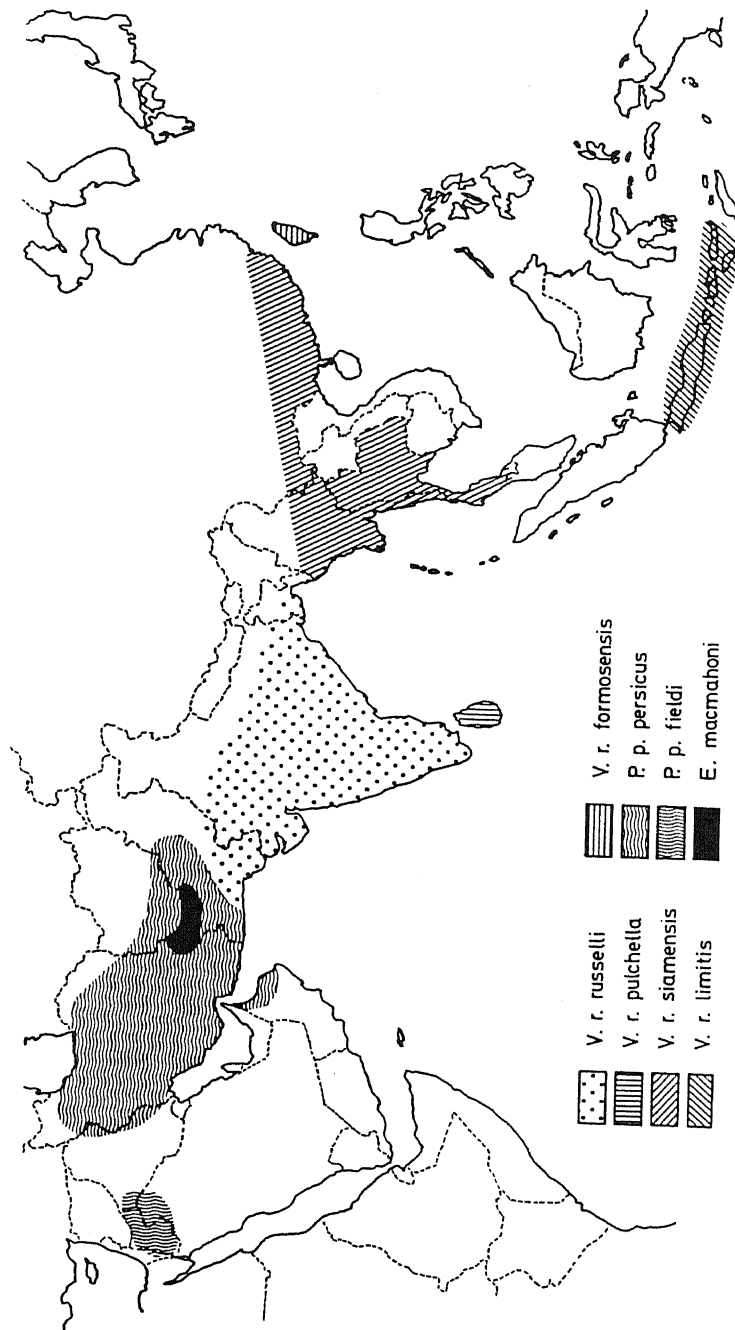


Abb. 19. Verbreitung von Vipera russelli, Pseudocerastes und Eristicophis (nach HARDING & WELCH 1980 und JOGER 1984).



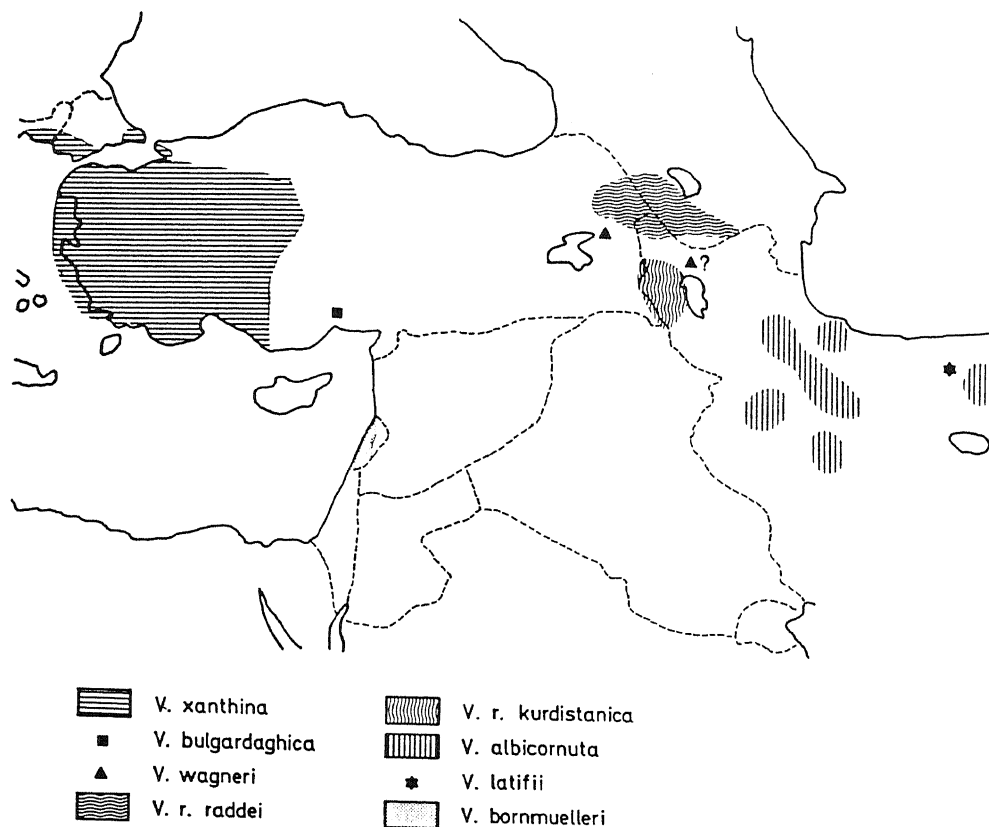


Abb. 20. Verbreitung der Arten des *Vipera xanthina*-Komplexes (nach NILSON & ANDREN 1986).

1.3. Die Neutralitätstheorie der molekularen Evolution

1.3.1. Die Theorie

Wurden ursprünglich im Rahmen evolutionsbiologischer Untersuchungen nur phänotypische Merkmale berücksichtigt, so stieg die Anzahl der Arbeiten, die modernere Techniken der Biochemie und Molekulargenetik anwenden (z.B. elektrophoretische und immunologische Methoden oder Sequenzanalysemethoden auf DNA- und Proteinniveau bis hin zur DNA-DNA Hybridisierung) in den letzten Jahrzehnten deutlich an. Zunächst erkannte man die außerordentlich polymorphe Natur vieler Enzyme. Indirekt schloß man auf eine erstaunliche genetische Variabilität. Durch weiterentwickelte Methoden gelang es, die Aminosäuresequenzen einiger Proteine unter-

einander und mit den dazugehörigen Basensequenzen der DNA zu vergleichen.

Nach einer Hochrechnung KIMURAS (1968) beträgt die Gesamtevolutionsrate eine mutationswirksame Nukleotidsubstitution alle zwei Jahre pro haploider DNA-Menge bei Säugetieren. Für eine selektive Fixierung einer Substitution sind zwei Jahre allerdings bei weitem zu kurz, da höchstens eine selektive Allelsubstitution alle 300 Generationen tolerierbar ist (HALDANE 1957). Zur Erklärung dieses Phänomens boten sich selektionsneutrale oder fast selektionsneutrale Mutationen an, die zufällig fixiert werden oder wieder verloren gehen (KIMURA 1968, KING & JUKES 1969). In der folgenden Darstellung der Zusammenhänge folge ich KIMURA (1987). Die Fixierung einer solchen Mutation erfolgt in der Driftzeit (in Generationen):

$$t_F = 4N$$

wobei N der effektiven Populationsgröße, d. h. der Zahl der am Fortpflanzungsgeschehen beteiligten Individuen, entspricht.

Es sind die Evolutionsfaktoren Mutation und Zufallsdrift, die auf molekularer Ebene überwiegend für die Entstehung, das Verschwinden oder die Fixierung eines mutierten Allels verantwortlich sind, und nicht Mutation und Selektion, die auf phänetischer Ebene wirken.

Für die Evolutionsgeschwindigkeit gilt:

- allgemein: $k = 2Nv$

wobei: $v = \text{Mutationshäufigkeit}$
 $u = \text{Wahrscheinlichkeit der Fixierung}$

- für Mutationen mit kleinem Selektionsvorteil:

$$k = 4Nsv$$

da: $u = 2s$

wobei: $s = \text{Selektionsvorteil}$

- für neutrale Mutationen:

$$k = v$$

da: $u = 1/(2N)$

Die Evolutionsgeschwindigkeit ist nach der letztgenannten Formel bei neutralen Mutationen also nur von der Mutationsrate abhängig. Es handelt sich um "Mutationsinput" und zufällige Fixierung bzw. zufälligen Verlust des betreffenden Allels (Abb. 21.).

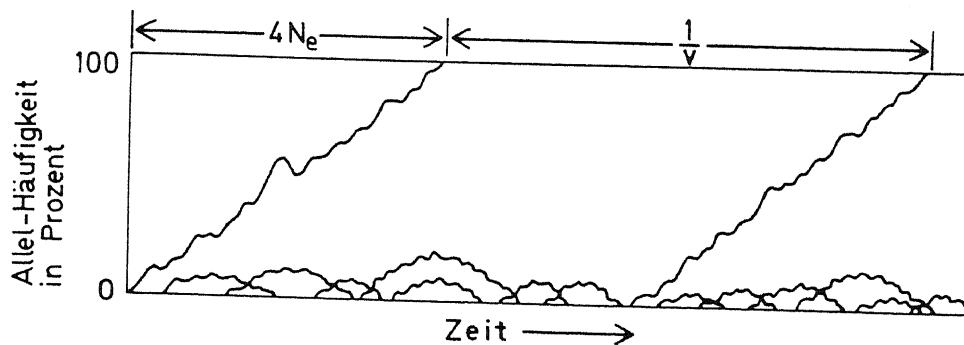


Abb. 21. Auftreten und Verbleib mutierter Gene in einer endlichen Population (nach KIMURA 1988). N_e : effektive Populationsgröße, v : Mutationsrate.

Kommt es in einigen Fällen zur schnellen Anhäufung von fixierten Mutationen, so ist nach KIMURA (1987) nicht ein stärkerer positiver Selektionsdruck, sondern die Verringerung des funktionellen Zwanges im betreffenden Molekül bzw. Molekülteil wirksam. Die Verringerung des funktionellen Zwanges bewirkt eine größere Plastizität des Moleküls oder anders formuliert: Leicht nachteilige Substitutionen haben

nicht die gleichen schwerwiegenden Konsequenzen wie vorher bei höherem funktionellem Zwang (Abb. 22.). Aus diesem Grund werden auch synonyme Nucleotidsubstitutionen besonders häufig fixiert. Die Ursache hierfür ist die Redundanz des genetischen Codes. Es stehen 43 verschiedene Codons nur 20 verschiedenen Aminosäuren gegenüber. Die meisten der Aminosäuren werden durch mehrere Codons kodiert. Besonders häufig erfolgen synonyme Substitutionen an der dritten Codonstelle. Die dritte Codonstelle ist im Vergleich zur ersten und zweiten besonders dazu geeignet, trotz Nucleotidsubstitution nicht in einer Aminosäuresubstitution zu resultieren, sondern "stumm" zu bleiben (Abb. 23.). Statistisch werden für eine Aminosäuresubstitution ca. 1.2 Basensubstitutionen im Genom benötigt (KIMURA 1968). Sehr hohe Substitutionsraten lassen sich bei den sogenannten Introns und Pseudogenen finden, in denen der funktionelle Zwang niedrig ist oder völlig fehlt.

Selektiv neutral heißt im hier gebrauchten Sinne selektiv äquivalent. Die Neutralitätstheorie behauptet nicht, daß es keine selektiv positiven Mutationen gibt. Sie kommen jedoch so selten vor, daß sie im Gesamtzusammenhang unbedeutend sind.

KIMURA (1983) unterscheidet die folgenden wesentlichen Merkmale der molekularen Evolution:

1. Für jedes Protein ist die Evolutionsrate in Form von Aminosäuresubstitutionen pro Jahr und Position über verschiedene Linien hinweg annähernd konstant, solange Funktion und Tertiärstruktur des Moleküls im wesentlichen unverändert bleiben.

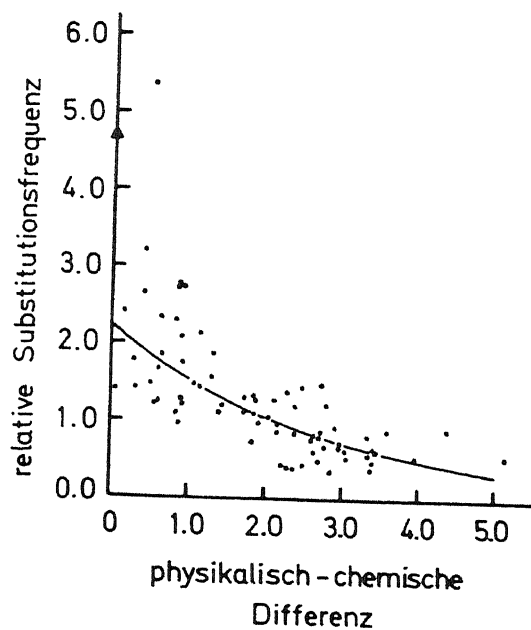


Abb. 22. Verhältnis von physikalisch-chemischer Differenz zur Substitutionshäufigkeit der Aminosäuren während der Proteinevolution (nach KIMURA 1987). Das \blacktriangle auf der Ordinate zeigt die erwartete Frequenz für synonyme Substitutionen, die keine physikalisch-chemische Veränderung bewirken.

2. Funktionell weniger festgelegte Aminosäure- oder Nukleinbasensequenzen evolvieren schneller (d.h. ihre Substitutionsrate ist höher) als Moleküle mit zahlreichen für spezifische Funktionen benötigten Sequenzanteilen.
3. Die Substitutionen, die weniger in die Struktur und Funktion eines Moleküls eingreifen (konservative Substitutionen), treten in der Evolution häufiger auf als solche, die tief eingreifen.
4. Eine Genduplikation ist immer die Voraussetzung dafür, daß ein Gen eine neue Funktion bekommen kann.

Aminosäure-Position	2	4	5	10	11	19					
Menschliches β -Globin	His	Thr	Pro	Ala	Val	Asn					
Nukleotid-Sequenz	oo●	●oo	●●o	oo●	oo●	oo●					
Kaninchen- β -Globin	His	Ser	Ser	Ala	Val	Asn					
	21	33	36	42	47	50	51	52	56	57	66
Asp	Val	Pro	Phe	Asp	Thr	Pro	Asp	Gly	Asn	Lys	
oo●	oo●	oo●	oo●	oo●	●oo	●oo	●oo	●●o	oo●	oo●	
Glu	Val	Pro	Phe	Asp	Ser	Ala	Asn	Asn	Asn	Lys	
	68	69	71	73	74	76	82	86	87	90	111
Leu	Gly	Phe	Asp	Gly	Ala	Lys	Ala	Thr	Glu	Val	
oo●	o●o	oo●	oo●	oo●	●●o	oo●	oo●	oo●	oo●	oo●	oo●
Leu	Ala	Phe	Glu	Gly	Ser	Lys	Ala	Lys	Glu	Val	
	112	115	117	123	124	125	132	138	142	144	145
Cys	Ala	His	Thr	Pro	Pro	Lys	Ala	Ala	Lys	Tys	
●●o	●●o	oo●	oo●	oo●	oo●	oo●	oo●	oo●	oo●	oo●	oo●
Ile	Ser	His	Thr	Pro	Gln	Lys	Ala	Ala	Lys	Tyr	

Abb. 23. Die Beziehung von Nukleotidsubstitutionen zu Aminosäuresubstitutionen am Beispiel des β -Globins von Mensch und Kaninchen (nach KIMURA 1987). Der große Anteil synonyme Substitutionen (an der dritten Codonstelle) wird deutlich. Es sind nur Codons dargestellt, bei denen mindestens eine Substitution vorliegt. ●: Nukleotidsubstitutionen, □: Aminosäuresubstitutionen.

5. Selektive Eliminierung eindeutig nachteiliger Mutationen und zufällige Fixierung selektiv neutraler oder leicht nachteiliger Mutationen treten in der Evolution wesentlich häufiger auf als positive Darwinsche Selektion für eindeutig vorteilhafte Mutationen.

Trotz der relativ geringen Bedeutung der Darwinschen Selektion im Rahmen der molekularen Evolution erscheinen mir Bezeichnungen wie "Non-Darwinian Evolution" (KING & JUKES 1969) als ungerechtfertigt, da schon Darwin, ohne Kenntnisse über Mutationen, Pseudogene und Ähnliches gehabt zu haben, erkannt hatte: "A structure which has been developed through longcontinued selection, when it ceases to be of service to a species, generally becomes variable, as we see

with rudimentary organs; for it will no longer be regulated by this same power of selection"(Darwin 1872, zit. nach CROW 1985).

1.3.2. Die Molekularuhr

Eines der umstrittensten Produkte der Neutralitätstheorie ist zweifellos die "molekulare Uhr". Diese Bezeichnung geht auf ZUCKERKANDL & PAULING (1965) zurück, die von einer Ratenkonstanzhypothese ausgingen.

Für KIMURA (1987) ist die Uhr die logische Konsequenz neutraler Mutationen, die pro Zeiteinheit in konstanter Anzahl auftreten. Es handelt sich um eine lineare Uhr, die der oben beschriebenen Beziehung $k = v$ folgt. Die Globine der Vertebratenlinien zeigen z. B. eine beinahe konstante Rate von 10^{-9} Aminosäuresubstitutionen pro Stelle und Jahr. Die Molekularuhr ist abhängig von der absoluten Zeit (z. B. Jahren) und nicht von Generationen.

Es handelt sich nicht um eine metronomische Uhr, sondern um eine statistische Uhr die einen stochastischen Fehler aufweist. KIMURA & OHTA (1971) ermittelten, daß die Varianzen der Evolutionsraten für Hämoglobin und Cytochrom c bei Säugtieren etwa 1.5-2.5 mal größer sind als die Varianzen, die man theoret erwartet, wenn die Variation bloß vom Zufall abhängt. FITCH & LANGLEY (1976) ermittelten einen Wert der Variation von zweimal der einer Poisson-Verteilung. Dies entspricht der doppelten Varianz des radioaktiven Zerfalls.

Die Molekularuhr folgt einer stochastischen Linearität und stellt darum nach Meinung vieler Autoren ein geeignetes Werkzeug der Systematik dar (THORPE 1982, WILSON et al. 1977). Der rein empirische Nachweis der relativen Ratenkonstanz reicht zur Rechtfertigung des Gebrauchs der Molekularuhr als Hilfsmittel zur Lösung systematischer Problemfälle aus.

Für einige Proteine ist die beobachtete Varianz allerdings etwas größer, als statistisch zu erwarten wäre. Der Index aus beobachteter Varianz / erwarteter Varianz schwankt zwischen 1.3 und 3.3 und liegt z.B. im Falle des Säugetier-Myoglobins bei 1.7.

Ein bekanntes Beispiel für eine abweichende molekulare Evolutionsrate sind die Primaten (Abb. 24.). Eine ausführliche Diskussion dieses Falles findet sich bei KIMURA (1987), WILSON et al. (1977) u.a. Sie kann hier nicht wiedergegeben werden. Fehlerquellen, die oftmals zur falschen Einschätzung molekularer Distanzen führen, sind z.B. bei der Eichung der Molekularuhr zu finden (CARLSON et al. 1978). Die Eichung erfolgt mittels geologischer Ereignisse oder paläontologischer Zeugnisse (Fossilien), deren Datierungen in den meisten Fällen nicht als wirklich gesichert gelten können oder zumindest sehr ungenau sind. Ebenso müssen mögliche experimentelle Fehler und Ungenauigkeiten sowie ein stochastischer Fehler berücksichtigt werden. Unter Berücksichtigung dieser Fehlerquellen handelt es sich bei einer solchen Molekularuhr um eine semiquantitative Uhr.

SARICH & WILSON (1967a, 1967b) und SARICH & CRONIN (1976) führen Unstimmigkeiten bezüglich der auf molekularer Ebene ermittelten Divergenzzeit Schimpanse-Mensch auf falsch datierte Fossilien zurück. Sie vertreten die Meinung, daß bei Berücksichtigung der oben genannten Fehlerquellen in Arbeiten und Diskussionen um die Molekularuhr sicherlich weniger Widersprüchlichkeiten und eine höhere Präzision die Folge seien.

Weiterhin muß bedacht werden, daß wenn Aminosäuresequenzen verglichen werden, bei denen mehr als 10 % der Aminosäuren ausgetauscht wurden, eine erhöhte Wahrscheinlichkeit multipler Substitutionen, d.h. Mehrfach austausche an einer Aminosäurestelle, vorliegt. Diese multiplen Substitutionen lassen die Zahl der Austausche niedriger erscheinen als sie

tatsächlich ist, und können ebenfalls zur Vergrößerung der Abweichungen der molekularen Uhr beitragen.

Unter Nennung der oben angeführten Abweichungen von der erwarteten Varianz wurde die Molekularuhr auch oft als Gegenargument zur Neutralitätstheorie gebraucht. Die beobachtete Ratenkonstanz wurde von manchen Autoren kritisch als das Ergebnis der "Verwechslung von Konstanz und Durchschnitt" oder als das "Gesetz der großen Zahlen" bezeichnet (LEWONTIN 1974; STEBBINS & LEWONTIN 1972). Nach FITCH & LANGLEY (1976) ist die Uhr von einem zum anderen Augenblick völlig unberechenbar und arbeitet erst bei der Betrachtung über längere Zeiträume zufriedenstellend. READ (1975) formulierte eine Hypothese, nach der die Proteinuhr nicht einen linearen, sondern einen exponentiell Verlauf zeigen soll. SARICH (1976) diskutiert READs Hypothese und weist sie zurück.

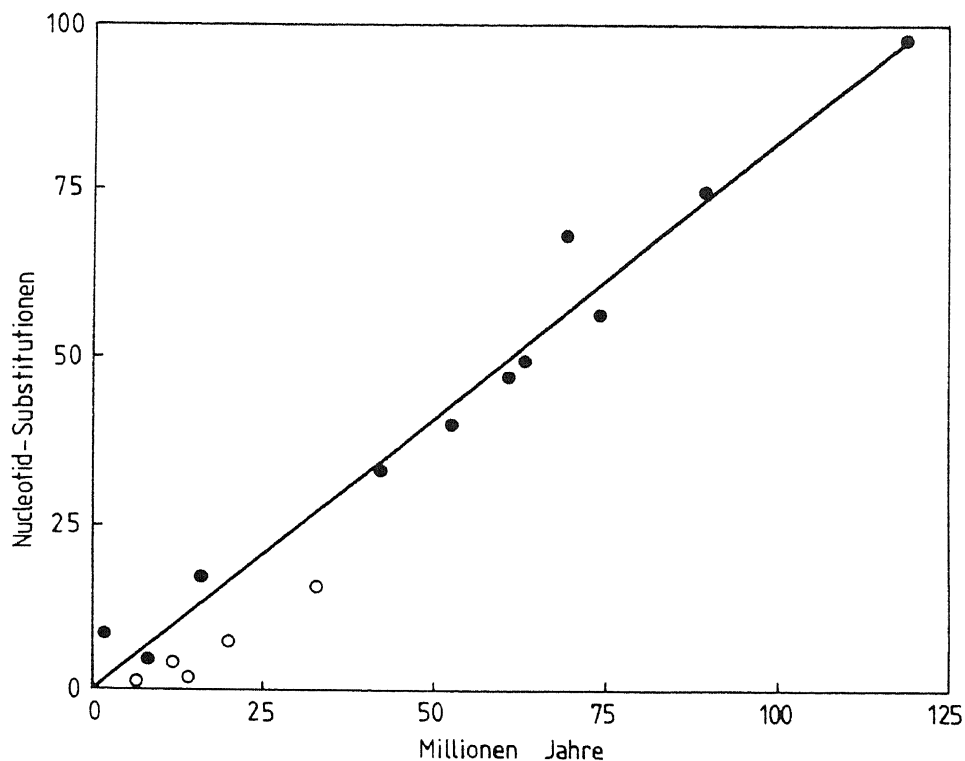


Abb. 24. Nukleotidsubstitutionen im Genom 16 verschiedener Säugetierartenpaare, basierend auf 7 unterschiedlichen Proteinen (nach KIMURA 1988). Die Substitutionen wurden gegen die Divergenzzeit der einzelnen Paare aufgetragen. Mit Ausnahme der Primaten (o) zeigen die anderen Paare (●) eine lineare Beziehung im Verhältnis der beiden Parameter.

WILSON et al. (1977) vertreten eine ähnliche Position wie vorher schon ZUCKERKANDL & PAULING (1965). Sie halten die Entdeckung der molekularen Uhr für "eines der herausragendsten Ergebnisse der molekularevolutionären Forschung". Nicht der theoretische Hintergrund der Uhr ist am interessantesten, sondern vielmehr die Existenz der molekularen Uhr an sich.

1.3.3. Die Evolution des Albumins

Albumin ist ein leicht isolierbares, im Blutplasma der Wirbeltiere vorhandenes Polypeptid. Sein Anteil am Gesamtproteingehalt des Blutserums beträgt bei Squamaten, wie z.B. Tarentola (Reptilia: Gekkonidae), 20-40 % (DeSMET 1978a)

und erreicht im Humanserum ca. 60 % (WEIS 1985). Humanalbumin hat ein Molekulargewicht von 69000 (WEIS 1985) und besteht aus ca. 582 Aminosäuren (BENJAMIN et al. 1984). DeSMET (1978b) gibt für das Albumin einiger Squamaten ein Molekulargewicht von 74000 an, was JOGER (1984) zu einer Hochrechnung mit dem Ergebnis von ca. 640 Aminosäuren im Squamatenalbumin veranlaßt. Die Funktion des Albumins ist im wesentlichen die des Osmoregulators, Reserveeiweißes und Transportproteins (WEIS 1985).

Diese Aufgaben sind relativ unspezifisch, und man kann aufgrund dieser Tatsache von einem relativ geringen funktionellem Druck ausgehen.

WILSON et al. (1977) ermittelten aus Daten verschiedener Autoren die Albuminevolutionsrate von 3×10^6 Jahren für 1% Aminosäureaustausch (Tab. 1.). JOGER (1984) gibt eine Rate von 3.9×10^6 Jahren an.

Die relativ hohe Substitutionsrate befindet sich in einen geeigneten "Auflösungsbereich" für systematische Fragestellungen bezüglich der Vertebratenevolution. Das Albumin eignet sich zur Untersuchung von Taxa, deren Aufspaltungszeit bis zu ca. 100 Mio. Jahre zurückliegt (CARLSON et al. 1978).

Diese Evolutionsrate wurde in guter Näherung von einer Vielzahl von Arbeiten verschiedener Autoren für Säuger, Reptilien und Amphibien bestätigt (SARICH & WILSON 1966, SARICH & WILSON 1967, SARICH 1970a, SARICH 1972, WALLACE et al. 1971, WALLACE et al. 1973, MAXSON & WILSON 1974, PRAGER & WILSON 1971, CADLE & GORMAN 1981, DOWLING et al. 1983, u.v.a.).

Trotzdem beobachtete man immer wieder Albumine, deren Evolutionsrate nicht gut ins Bild der Molekularuhr paßten. So scheint das Albumin der Vögel generell langsamer zu evolvieren (PRAGER et al. 1984). Auch in den oben genannten Gruppen finden sich konservative Albumine bei z.B. Primaten

(Aotus (SARICH 1970b)), Carnivoren (Ursus (SARICH 1970a)), Marsupialiern (Caluromys und Marmosa (MAXSON et al. 1975)), Echsen (Uromastyx (JOGER 1986), Agama (JOGER & ARANO 1987)) und bei Schlangen (Elapidae (CADLE 1982), Viperidae (DESSAUER et al. 1987, CADLE 1988), Vipera (HERRMANN et al. 1987)). Ebenso sind signifikant schneller evolvierende Albumine bei z.B. Echsen (Tarentola, JOGER 1984) und Fröschen (Litoria, MAXSON et al. 1975) bekannt.

Das Auftreten solcher konservativer Albumine erklärt SARICH (1970b) als normale Abweichung im Sinne der Poisson-Verteilung. Dieses Argument würde auch den gegensätzlichen Fall progressiver Albumine bei Tarentola und Litoria zwanglos erklären.

WILSON et al. (1977) fanden beim Vergleich der Aminosäureaustauschrate von Säugetieralbuminen und der paläontologisch ermittelten Aufspaltungszeit eine strenge Korrelation ($r = 0.96$; Abb. 25.).

Die Molekularuhrhypothese steht im Einklang mit den oben genannten Beobachtungen. Die Frage nach der Genauigkeit der Uhr bzw. den statistischen Abweichungen, mit denen die Uhr "tickt", muß nach wie vor Gegenstand eingehender Prüfung bleiben.

Um die phylogenetische Wertigkeit eines Proteins (wie z.B. Albumin) zu verdeutlichen, sollen einige Anmerkungen zur Homologie auf molekularer Ebene folgen.

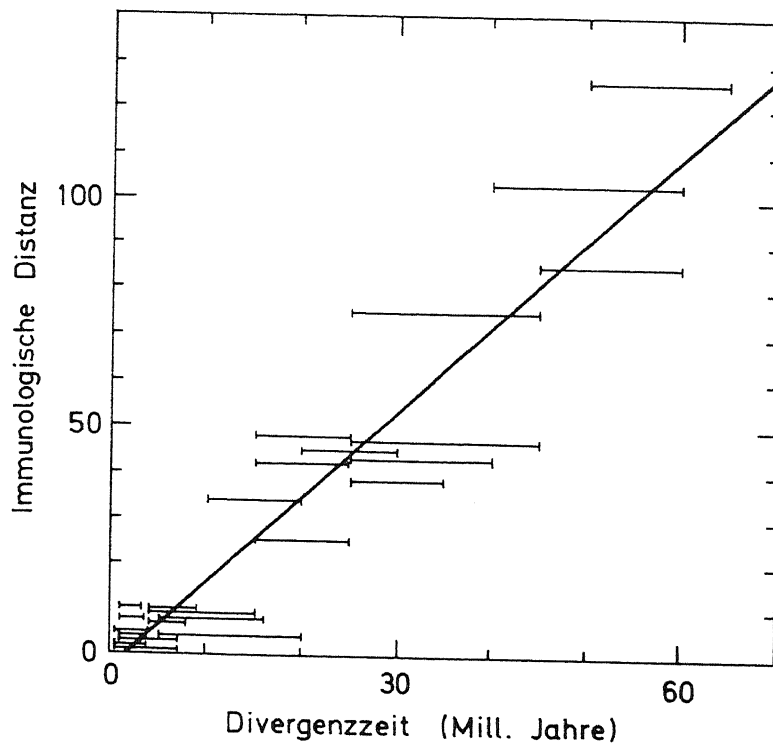


Abb. 25. Die zwischen Albuminen verschiedener Vertreter der Carnivoren und Ungulaten gemessene immunologische Distanz und deren durch fossile Zeugnisse belegte Divergenzzeit (nach WILSON et al. 1977). Die horizontalen Balken zeigen die Unsicherheit bei der Datierung des Spaltungszeitraumes mit Hilfe von Fossilien.

Betrachtet man ein Molekül unter phylogenetischen Aspekten, sollte man über dessen Homologie in zwei verglichenen Taxa größtmögliche Gewißheit erlangen. Homologiekriterium auf molekularer Ebene ist "a high level of physical congruence between compared polypeptides" (THROCKMORTON 1968). Je höher die Übereinstimmung, umso sicherer die Homologie. Die Erfäßbarkeit der Homologie molekularer Strukturen unterscheidet sich in der Sicherheit bei der Bestimmung einer Homologie leider nicht von der auf phänotypischer Ebene (AX 1984). Sind zwei Proteine einander homolog, so heißt das nicht, daß automatisch zwei an gleicher Position befindliche Aminosäuren ebenfalls einander homolog sein müssen (Abb. 26.). FITCH (1976) definiert Homologie im molekularen Zusammenhang als "similarity arising by virtue of common ancestry" und unterscheidet "paralogous and orthologous homology". Unter paralogischer Homologie ver-

steht er z.B. die Homologie von Genprodukten, die sich durch Genduplikation oder Translokation völlig unabhängig, parallel, entwickeln, obwohl sie von gemeinsamer Abstammung sind. Orthologische Homologie liegt nach FITCH dann vor, wenn "an exact phyletic correspondence between the history of the genes and the history of the taxa from which they derive" besteht. Zur Untersuchung phylogenetischer Beziehungen sind folglich nur orthologisch homologe Moleküle geeignet.

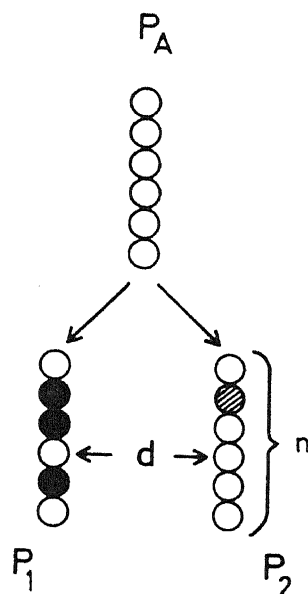


Abb. 26. Dargestellt sind die homologen Polypeptidketten P_1 und P_2 sowie deren "letzter gemeinsamer Vorfahre" P_A (nach KIMURÁ 1987). P_1 und P_2 haben im Laufe der Zeit "autapomorphe" Aminosäuren (volle und schraffierte Kreise) erworben. n : Anzahl der Aminosäuren pro Polypeptidkette ($n = 6$), d : Anzahl unterschiedlicher Aminosäuren bei P_1 und P_2 ($d = 3$).

JOGER (1990b) diskutiert Remanes Homologie-Kriterien bezogen auf biochemische Merkmalskomplexe. Er kommt zu dem Ergebnis, daß sowohl das Kriterium der Lage als auch das Kriterium der spezifischen Qualität auf molekularer Ebene volle Gültigkeit besitzen. Das Kriterium der Kontinuität aber trifft nur bedingt zu. Zwischenformen bei rezenten Arten sind bei Berücksichtigung der Molekularuhr nicht zu erwarten, abgestufte Verwandtschaftsgrade sind die Regel.

Zur Prüfung auf Homologie schlägt er die Konvergenztests (1) "triangle inequality test", (2) "Prinzip der wechselseitigen Erhellung" (Hennig) und (3) den Test auf gleichsinnige funktionelle Adaptation vor (siehe Abschnitt 4.3.).

1.4. Molekulare Systematik

Die Anwendung molekularer Methoden hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen und ist in Fällen nicht eindeutig interpretierbarer bzw. reduzierter phänotypischer Merkmale von besonderer Bedeutung (DESSAUER 1974).

In der molekularen Systematik ist die quantitative Ermittlung genetischer Distanzen zwischen phylogenetischen Einheiten möglich. Zugrunde liegen informative Moleküle, die ein hohes Maß der in der DNA gespeicherten, primären genetischen Information beinhalten (FRELIN & VUILLEUMIER 1979). Abb. 27. zeigt die graduelle Abstufung an genetischem Informationsgehalt. Sie erlauben den Vergleich von Taxa auf "unterster, genetischer Ebene".

Die molekulare Systematik ist unabhängig von traditionellen Merkmalen und Klassifikationen und verfügt aus diesem Grund über einen ausgezeichneten "Testcharakter". Die Bewertung von Merkmalen ist nicht nötig. Das garantiert eine relativ große Objektivität. Vieles spricht für die Existenz einer kontinuierlichen evolutiven Änderung im Sinne der Molekularuhr. Wechselnde Evolutionsgeschwindigkeiten, die während der phänotypischen Evolution häufig auftreten (z.B. bei adaptiven Radiationen) erschweren die phylogenetische Interpretation äußerlicher Merkmale.

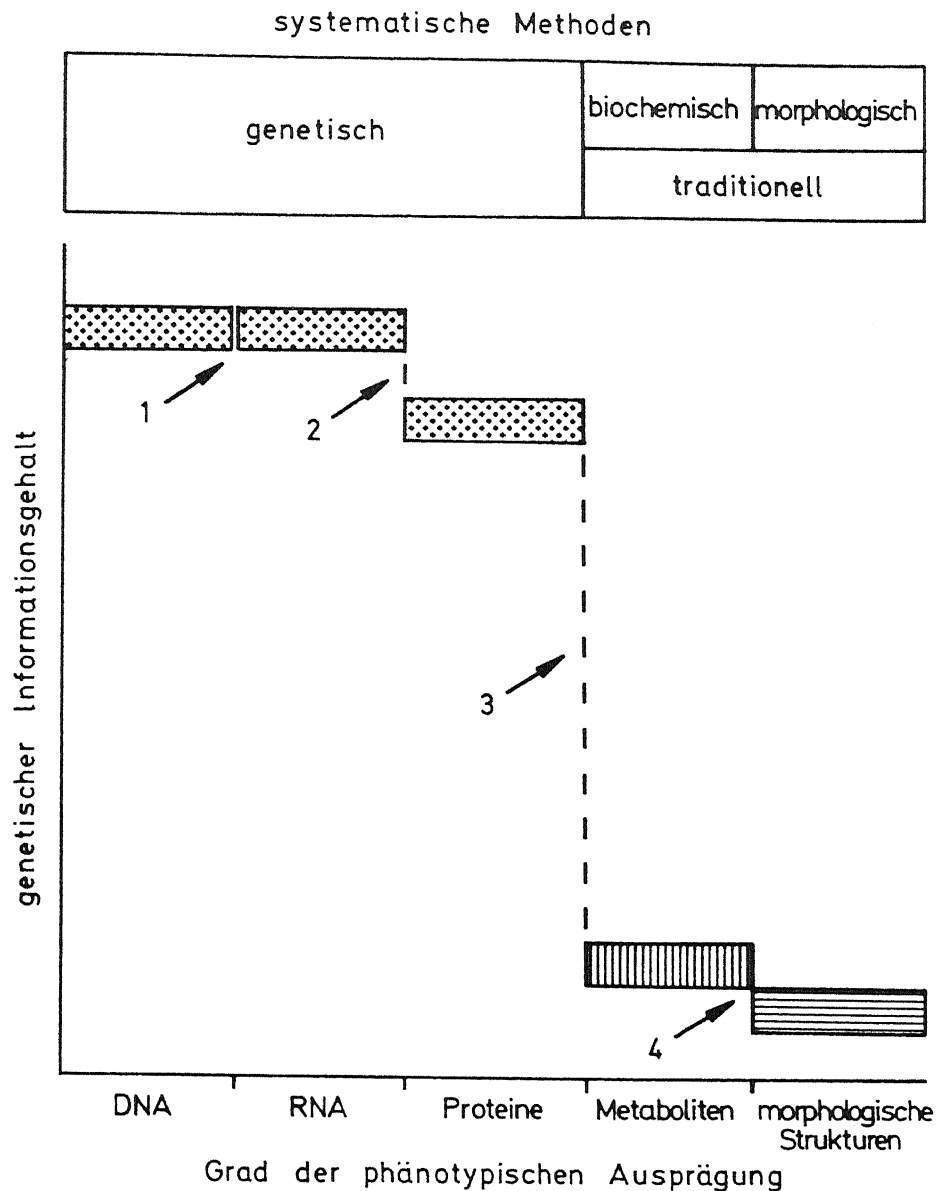


Abb. 27. Graphische Darstellung des genetischen Informationsgehaltes verschiedener systematischer Methoden (nach FRELIN & VUILLEUMIER 1979). Die Zahlen kennzeichnen den Verlust an genetischer Information bezogen auf die unterschiedlichen Merkmalskomplexe. Besonders groß ist der Verlust bei Stufe 3.

Die Einheit der evolutiven Änderung bei Proteinen ist die Aminosäuresubstitution. Damit ist diese Einheit exakt definiert. Homologe Moleküle sind in verschiedenen, relativ weit verwandten Taxa direkt vergleichbar (z.B. Albumin bei Fröschen und Säugetieren (MAXSON et al. 1975)). Es existiert "an ideal situation of continual divergence" (SARICH & CRONIN 1976).

Methoden der molekularen Systematik sind u.a. die Aminosäuresequenzanalyse, die DNA-Sequenzanalyse, die DNA-DNA-Hybridisierung, sowie immunologische und elektrophoretische Techniken.

Unter den genannten Methoden sind die Aminosäure- und die DNA-Sequenzanalyse die einzigen direkten Methoden. Sie erlauben die unmittelbare Detektion substituierter Aminosäuren bzw. Nukleotide. Immunologische Methoden (Mikrokomplementfixierung und quantitativer Präzipitintest) und DNA-DNA-Hybridisierung sind indirekte Methoden.

Sie erlauben die Messung der Ähnlichkeit (und somit indirekt die Rate der insgesamt ausgetauschten Aminosäuren bzw. Nukleinsäuren) im betrachteten Protein bzw. Teil der DNA zwischen verschiedenen Taxa. Diese indirekten quantitativen Techniken zeichnen sich durch ihre große Sparsamkeit und Aussagekraft für zeitliche Abfolgen aus und sind daher die hauptsächlich gebräuchlichen Methoden.

Signifikante Korrelationen bestehen zwischen der Anzahl substituierter Aminosäuren und den zwischen den entsprechenden Proteinen ermittelten immunologischen Distanzen (z.B. CHAMPION et al. 1975, PRAGER & WILSON 1976). Immunologische Distanzen und elektrophoretisch gewonnene Ergebnisse korrelieren ebenfalls signifikant (SARICH & CRONIN 1976, MAXSON & WILSON 1974, MAXSON & WILSON 1979, u.a.).

Quantitative molekulare Methoden resultieren in Distanzwerten und erscheinen daher als phenetisch (THROCKMORTON 1968). Unter Voraussetzung einer im großen und ganzen gleichmäßigen Evolutionsrate werden die vermeintlich phenetischen Distanzwerte zu phylogenetisch relevanten Werten. Somit ermöglicht die molekulare Systematik Informationen über (a) die Kladogenese phylogenetischer Linien, (b) die absolute Zeit seit der Aufspaltung und (c) evolutive Veränderung in den einzelnen Tochterlinien (SARICH 1970a). Diese Informationen stammen aus einer von konventionellen

Methoden völlig unabhängigen Quelle und haben dadurch besonderen Prüfcharakter.

Durch einige Vertreter der kladistischen Theorie erfolgt die Zurückweisung der molekularen Systematik u.a. mit dem Argument, daß Distanzwerte keine Merkmalsbeurteilung (i.S. von apo- und plesiomorph) zulassen und deshalb phylogenetisch irrelevant sind. Neuerdings werden Termini wie Plesio- und Apomorphie, die dem kladistischen Wortschatz zugehörig sind, in progressiver Weise auf Merkmale der molekularen Evolution angewendet (JÖGER 1990). Es wird theoretisch gezeigt, daß auch auf molekularer Ebene Plesio- und Apomorphien definierbar sind. Lediglich die von Kladi- sten geforderte explizite Benennung von Apomorphien bei der Stammbaumrekonstruktion im Sinne Hennigs (HENNIG 1982, AX 1984) erfolgt bei den genannten indirekten Methoden nicht (quantitative Distanzwerte). Diese Tatsache wird den Kladi- sten wohl auch weiterhin Anlaß zur Kritik bieten. Trotzdem zeigen in vielen Fällen sowohl molekulare als auch mit Methoden der phylogenetischen Systematik ermittelte Verwandtschaftsdiagramme ein hohes Maß an Kongruenz (SARICH 1988).

Der Einsatz der Methoden der molekularen Systematik bei der Untersuchung phylogenetisch bisher nicht eindeutig interpretierbarer Taxa hat sich in vielen Fällen bewährt. Als Beispiele für albumin-immunologische Untersuchungen seien hier genannt: die Aufdeckung konvergenter morphologischer Evolution bei Hyla exima und Hyla regilla (MAXSON & WILSON 1974) und bei den Schlangen der Gattung Atractaspis und den Viperidae (CADLE 1982) sowie die systematische Einordnung des Großen Pandas (Ailuropoda melanoleuca) als spezialisierter Vertreter der Ursidae (SARICH 1973).

2. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll mit Hilfe immunologischer Untersuchungen des Albumins versucht werden, Fragen zur (a) molekularen Evolution und zur (b) Phylogenie der paläarktischen Großvipern zu beantworten.

Das allgemeine Anliegen der Arbeit ist es, zu überprüfen, ob sich die Albuminevolution bei den paläarktischen Großvipern mit statistisch konstanter Rate vollzieht, und somit zur Stützung der Molekularuhrhypothese beitragen kann.

Die speziellen, die Phylogenie der paläarktischen Großvipern betreffenden Fragen gliedern sich wie folgt:

- Ist die Gattung Daboia (sensu OBST 1983) monophyletisch?
- In welchem Verwandtschaftsverhältnis stehen die paläarktischen Großvipern zur Gattung Vipera s.str. (sensu OBST 1983)?
- Wohin gehört die monotypische Gattung Eristicophis im System der paläarktischen Großvipern?
- Wie sieht die zeitliche Dimension der Stammesgeschichte der paläarktischen Großvipern aus?
- Wie erfolgte die Ausbreitung der paläarktischen Großvipern, und wie ist die heutige Verbreitung zu verstehen?

Die Beantwortung dieser Fragen und deren kritische Reflexion im Vergleich zu den konventionell erworbenen Vorstellungen der Phylogenie der untersuchten Taxa werden angestrebt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Blutserumproben der in Tab. 2. aufgeführten Arten und Unterarten standen für die immunologischen und elektro-phoretischen Untersuchungen zur Verfügung.

Der weitaus größte Teil der Blutseren wurde Tieren entnommen, die aus der Lebendsammlung von Herrn Dr. G. Nilson (Göteborg) stammen. Die betreffenden Schlangen wurden von Dr. Nilson bestimmt. Andere Blutproben wurden Tieren entnommen, die entweder von kommerziellen Importeuren oder aus privater Terrarienhaltung stammen. Bei diesen Tieren wurde die Bestimmung von Herrn Dr. U. Joger oder mir vorgenommen.

Genügten kleinere Serummengen, wurde das Blut aus der Caudalvene der Tiere entnommen. Wenn größere Serummengen zur Herstellung eines Antiserums benötigt wurden (in Tab. 2. mit (♦) gekennzeichnet), erfolgte die Blutentnahme aus einem Aortenbogen oder einer Carotis, nachdem das betreffende Tier kurz vorher mittels Chloroform oder Äther getötet worden war. Nach der Entnahme wurden die Proben bei 4 °C in einer Heraeus-Christ-Minifuge 10 Minuten bei 5500 U/min zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde anschließend abpipettiert, aliquotiert (ca. 100 µl/Probe) und bei -30 °C eingefroren.

Die Auswahl der zur Antiserenproduktion verwendeten Albumine erfolgte so, daß die Antiseren einen möglichst guten Querschnitt der untersuchten Taxa repräsentierten. Dies geschah unter Berücksichtigung der z.Z. gebräuchlichen Klassifikationen und der jeweils verfügbaren Serummenge.

Tabelle 2. Übersicht der verfügbaren Blutseren.
 Mit Ausnahme der mit ⁽¹⁾ gekennzeichneten Taxa, von denen Blutseren von je 2 Exemplaren zur Verfügung standen, wurden Blutseren von jeweils einem Exemplar verwendet. Gegen die Albumine der mit (♦) gekennzeichneten Formen wurden Antiseren hergestellt. Die Herkunft der Tiere ist mit der mir bekannten Genauigkeit angegeben (mehrere Ortsnamen hinter einem Taxon sind Erläuterungen eines Fundortes). Autorennamen sind nur für diejenigen Taxa angegeben, die nicht bereits in Abschnitt 1.2. genannt wurden.

Art / Unterart		Herkunft
<u>Eristicophis macmahoni</u>		Pakistan
<u>Pseudocerastes p. persicus</u>	(♦)	Pakistan
<u>P. p. fieldi</u>		Israel
<u>Vipera m. mauritanica</u>		Marokko: Sousse, Aoulouz
<u>V. m. deserti</u>	(♦)	Libyen: Djebel Nefusa
<u>V. l. lebetina</u>	(♦)	Zypern: Limassol
<u>V. l. obtusa</u> ¹		Türkei: Ararat
<u>V. l. schweizeri</u> ¹		Türkei: Gaziantep Griechenland: Kykladen, Milos
<u>V. l. turanica</u>		UdSSR: Kopet-Dagh, Aschchabad
<u>V. palaestinae</u>	(♦)	Israel: Tel Aviv
<u>V. r. russelli</u>		Pakistan
<u>V. r. siamensis</u>		Thailand
<u>V. xanthina</u> ¹	(♦)	Türkei: Ciglikara
<u>V. r. raddei</u> ¹	(♦)	Türkei: Xanthos
<u>V. berus sachalinensis</u> Zarewskij		Türkei: Ararat
<u>V. nikolskyi</u> Vedmederja, Grubant & Rudajeva		Türkei: Digor
<u>V. a. aspis</u> (Linnaeus)		UdSSR: Sachalin
<u>V. a. atra</u> Meisner		UdSSR: Charkow
<u>V. a. francisciredi</u> Laurenti		Frankreich: La Licamarie, südl. Saint Etienne
<u>V. a. hugyi</u> Schinz		Schweiz: Maggiatel Corgello
<u>V. a. ammodytes</u> (Linnaeus)		Italien: Monte Geove, Terracina
<u>V. a. meridionalis</u> Boulenger		Italien: San Giovanni, Lago Argo, Kalabrien
<u>V. a. transcaucasiana</u> ¹ Boulenger		Jugoslawien: Gracac
<u>Echis leucogaster</u> Roman	(♦)	Griechenland: Eubea
<u>E. pyramidum</u> (Geoffroy Saint-Hilaire)		UdSSR: Boschumi, Georgien
<u>E. multisquamatus</u> Cherlin (Abb. 17.)		Türkei: Borcka, Artvin
		Algerien: Hoggar
		Ägypten: El Fayum
		UdSSR: Turkmenien

3.2. Elektrophoretische Methoden

Es wurden diskontinuierliche, vertikale Polyacrylamidgel-Plattenelektrophoresen (PAGE) durchgeführt (HEIMES 1982, JOGER 1984).

Pro Gelplatte konnten sechs Proben aufgetragen werden, die je aus 1.0 - 2.0 μ l Serum und 15 μ l mit Bromphenolblau angefärbter, konzentrierter Saccharoselösung bestanden. Die Gelplatte bestand aus einem 2.5%-igen Sammelgel (pH 7.8), gefolgt von einem 7.5%-igen Trenngel (pH 8.4). Als Puffer wurde ein Tris-Glycin-Puffer (pH 8.7) verwendet. Die Laufstrecke der Bromphenolblau-Front im Trenngel betrug 4.5 cm. Zu Beginn der Laufzeit wurde die Elektrophorese zunächst 20 min lang mit 50 V und ca. 60 mA betrieben, dann auf 75 V und ca. 80 mA erhöht bis die Bromphenolblau-Front das Trenngel erreichte und schließlich mit 100 V und ca. 115 mA bis zum Erreichen der Endmarke ausgeführt.

Anschließend wurden die Gel-Platten in einem auf 60 °C erwärmten Serva Blau G-Bad (0.025% Serva Blau G in Äthanol, Aqua dest., Essigsäure im Verhältnis 5:5:1) fixiert und gefärbt. Die Differenzierung erfolgte in 7.5%-iger Essigsäure auf einem Rüttler (1-2 Tage).

Die so erhaltenen PAGE-Platten wurden gezeichnet, fotografiert und in 7.5%iger Essigsäure aufbewahrt.

3.3. Immunologische Methoden

3.3.1. Antigenpräparation

Aufgrund seiner relativ großen Quantität im Blutserum der Vertebraten und der hohen elektrophoretischen Mobilität ist Albumin ein leicht zu isolierendes Protein.

Für die vorliegende Arbeit wurde Albumin mittels präparativer Elektrophorese (MAXSON et al. 1979, CADLE & SARICH 1981, JOGER 1984) aus den für die Antiserenproduktion vor-

gesehenen Blutseren isoliert. Verwendet wurde eine wie in Abschnitt 3.2. beschriebene PAGE. Die zu trennende Serumprobe wurde anstelle einer Einbringung in die sechs Einzel-fächer in eine durchgehende Rinne gegeben. Dies ermöglichte das Auftragen von 20 μl Serum gemischt mit 60 μl Bromphenolblau-Saccharose-Lösung pro Gelplatte.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Albumin mit einer 0.001%-igen Anilinonaphthalin-Sulfonat-Lösung (ANS) in Natriumphosphat-Puffer (pH 6.8) angefärbt (HARTMAN & UDENFRIEND 1969). ANS bindet an den hydrophoben Stellen des Albumins und fluoresziert dann unter UV-Beleuchtung. Falls der Färbevorgang zeitlich kurz gehalten wird, kommt es nur zu geringfügigen Denaturationserscheinungen an den im Gel exponiert liegenden Molekülen. Kurze Färbezeit ist auch notwendig, um größere Diffusionseffekte zu vermeiden. Nach 3-5 Minuten im ANS-Bad waren die Albuminbanden gut zu erkennen und wurden herausgeschnitten. Die Gelstücke mit der Albuminbande wurden anschließend in Tris-Glycin-Puffer (pH 8.7) überführt.

Mit einer bei JOGER (1984) beschriebenen Elektrophorese-apparatur wurde das Albumin aus den Gelstücken eluiert und in Kollodiumhülsen angereichert. Aus den Kollodiumhülsen konnte man nun das konzentrierte, im Elektrophoresepuffer gelöste Albumin entnehmen.

In diesen Proben wurde die Proteinkonzentration nach der Methode von BRADFORD (1976) bestimmt. Mittels einer Humanalbumin-Stammlösung (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde eine Eichkurve als Proteinstandard erstellt. Bei der Durchführung der Proteinbestimmung wurden 800 μl Aqua dest., 200 μl BIORAD^R Protein Assay (Farbstoff-Konzentrat, verdünnt) und 20 μl der Albuminlösung gut gemischt und nach 10 min bis 1 h die Extinktionsmessung gegen einen Blindwert durchgeführt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen für jede Verdünnungsstufe gemacht. Der entsprechende Proteingehalt wurde der Eichkurve entnommen. Die Albuminausbeuten waren durchweg sehr hoch.

Die dann folgende Durchführung der Reinheitskontrollen ist in Abschnitt 3.3.3. näher ausgeführt.

Nach JOGER (1984) ist die präparative Elektrophorese der Albuminisolation mit Sepharose-blue (TRAVIS & PANNEL 1973; TRAVIS et al. 1976) sowie der Polyäthylen-Glykol-Methode (GAMBAL 1971) bezüglich der Reinheit und der Quantität des isolierten Albumins überlegen.

3.3.2. Antiserenproduktion

Antiseren wurden durch die Immunisierung von je zwei Kaninchen pro Albumin bzw. Vollserum erhalten. Es erfolgten alternierend Injektionen in die linke oder rechte Oberschenkelmuskulatur. Jedes Kaninchen erhielt insgesamt 1 mg Protein injiziert.

Grundsätzlich ist zwischen zwei verschiedenen "Qualitäten" von Antiseren zu unterscheiden:

1. Polyvalentes Antiserum zur Reinheitskontrolle der isolierten Albumine. Hier geht es darum, ein Antiserum zu gewinnen, welches möglichst viele und selbst kleinste Mengen an Antigenen detektieren kann und somit in der Lage ist, die Reinheit der isolierten Albumine anzuzeigen. Für die Produktion dieses Antiserums wurde das Vollserum von Vipera ammodytes meridionalis verwendet. 1mg gelöster Vollserumproteine wurden in 9 Aliquoten zu je 200 μ l plus 100 μ l komplettes Freundsches Adjuvans¹ verwendet (JAGER 1984). Die Injektionen erfolgten am 1., 2., 3., 9., 16., 23., 37., 51., und 79. Tag. Am 65. Tag wurde eine Blutprobe zur Prüfung der Antiserumreaktionsfähigkeit entnommen. Am 89. Tag erfolgte die endgültige Blutentnahme.

¹Freundsches Adjuvans ist eine Mineralölsuspension und verstärkt die Immunreaktion insbesondere auf gelöste Antigene. Freundsches Adjuvans komplett enthält abgetötete Myobacterium tuberculosis zur zusätzlichen Verstärkung der Immunantwort.

2. Monovalente Antiseren für quantitative Präzipitintests. Ziel der Produktion dieser Antiseren ist es ebenfalls, eine gute Reaktionsfähigkeit zu erreichen. Dieser sollte aber eine spezifische Reaktion gegen Albumin zugrunde liegen. Eventuell vorhandene Verunreinigungen durch andere, sehr kleine Proteinfractionen sollten nicht unverhältnismäßig stark an der immunologischen Reaktion beteiligt sein. Zur Gewinnung derartiger monospezifischer Antiseren eignet sich erfahrungsgemäß das folgende Immunisierungsschema besonders. Jeweils 1 mg Albumin wurde zu 5 gleichen Teilen aliquotiert. Pro Injektion wurden 200 μ l Albuminlösung plus 200 μ l Freundsches Adjuvans (1. Injektion komplett, 2.-5. Injektion inkomplett²) eingesetzt (JAGER 1984). Die Injektionen erfolgten am 1., 21., 42., 63. und 84. Tag. Die Blutentnahme erfolgte am 91. Tag.

Das Kaninchenblut wurde nach der Entnahme zunächst ca. $\frac{1}{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur und danach über Nacht bei 4 °C der Gerinnung überlassen. Dann wurde der Blutkuchen von der Gefäßwand gelöst und das Serum mit einer Pipette entnommen. Das Serum wurde mit 2500 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert, um verbliebene zelluläre Bestandteile zu entfernen.

Die beiden jeweils gegen das Albumin derselben Art produzierten Antiseren wurden nach positiver Kontrolle auf Monospezifität (siehe Abschnitt 3.3.3.) vereinigt. Dies erschien notwendig, da die immunologische Antwort der einzelnen Kaninchen auf das Antigen individuell in der zeitlichen Abfolge, der Reaktivität und der Differenzierungsfähigkeit stark variieren kann (PRAGER & WILSON 1971a).

Die Seren wurden mit Merthiolat (Bakteriozid) versetzt (1:10.000), aliquotiert und bei -30 °C eingefroren.

²Freundsches Adjuvans inkomplett enthält keine Bakterien.

3.3.3. Reinheitskontrollen

Zur Kontrolle auf rein isolierte Albumine bzw. weitgehend monospezifisch reagierende Antiseren dienten Immunelktrophoresen.

Dazu wurde ein 1.25%-iger Agarosegel (mit Na-Azid (Bakteriozid) versetzt) auf Objektträger aufgebracht. Aus dem Gel wurden je nach Bedarf zwei Lochdepots und eine Rinne oder ein Lochdepot und zwei Rinnen ausgestanzt. In die Lochdepots wurden 10 μ l der Albuminlösung bzw. des Vollserums eingefüllt. Es folgte eine horizontale Elektrophorese unter Verwendung von Michaelis-Puffer (pH 8.6; 0.05 M Na-Acetat, 0,05 M Na-Diäthylbarbiturat). Die Laufzeit betrug ca. 5 h, die Spannung 140 V und die Stromstärke ca. 20 mA (bei Beginn). Nach Ende der elektrophoretischen Trennung der Proteine wurden 100 μ l poly- bzw. monovalentes Antiserum in die Rinne gefüllt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37 °C diffundieren gelassen. Anschließend wurden die Gele 2-3 Tage in 0,15 M NaCl gewässert, bei 50 °C getrocknet und $\frac{1}{2}$ Stunde in 0.2%-iger Serva Blau G-Lösung (Äthanol, Aqua dest., Essigsäure (40:55:5)) gefärbt. Differenziert wurde in der gleichen Lösung unter Weglassen des Farbstoffes.

Die Präzipitate waren gut sichtbar und gaben Aufschluß über die Brauchbarkeit der isolierten Albumine und Antiseren (Abb. 28.). Sowohl bei den Albuminen als auch bei den Antiseren war, gegen Vollserum bzw. Vollantiserum getestet, lediglich eine kräftige Albuminbande zu sehen. In einigen Fällen konnten sehr schwache Präzipitatbögen innerhalb des "Albuminbogens" ausgemacht werden. Dabei könnte es sich um durch die ANS-Behandlung oder aus anderen Gründen leicht denaturierte Albuminmoleküle handeln. Derartige Erscheinungen beeinträchtigen die Qualität der betreffenden Antiseren nicht (JÖGER 1984).

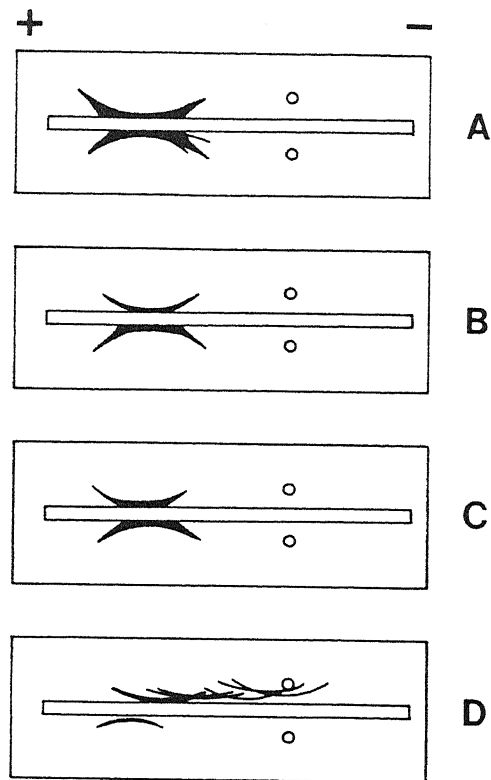


Abb. 28. Beispiele einiger Immunelektrophoresen zur Reinheitsüberprüfung isolierter Albumine. In den Rinnen befand sich jeweils Anti-V. ammodytes meridionalis-Vollserum.

- A oben: V. r. raddei-Albumin
 unten: V. xanthina-Albumin
 B oben: P. p. persicus-Albumin (Probe 1)
 unten: P. p. persicus-Albumin (Probe 2)
 C oben: E. leucogaster-Albumin (Probe 1)
 unten: E. leucogaster-Albumin (Probe 2)
 D oben: V. l. lebetina-Vollserum
 unten: V. l. lebetina-Albumin

Alle getesteten Antiseren erwiesen sich als für die quantitativen Präzipitintests geeignet.

3.3.4. Titerbestimmung

Die Titerbestimmung erfolgte nach der von JOGER (1984) beschriebenen Methode.

Auf die Durchführung der Präzipitintests wird in Abschnitt 3.3.5. näher eingegangen.

Der angegebene Präzipitin-Titer entspricht der photometrischen Extinktion $\times 1000$ am Äquivalenzpunkt bei homologer Reaktion und $50 \mu\text{l}$ Antiserum. Die Extinktion wurde mit einem BECKMAN Spectrometer Model 24 gemessen.

Die Titer der verschiedenen Antiseren sind der Tab. 3. zu entnehmen.

Tabelle 3. Reaktionsstärke der produzierten Antiseren.

Antialbuminserum	Titer
<u>V. xanthina</u>	626
<u>V. r. raddei</u>	540
<u>V. l. lebetina</u>	356
<u>V. mauritanica deserti</u>	508
<u>V. palaestinae</u>	695
<u>P. p. persicus</u>	586
<u>E. leucogaster</u>	451

3.3.5. Quantitativer Präzipitintest

Zur Durchführung des quantitativen Präzipitintests wurden pro Einzelansatz, d.h. pro "Antiserum-Antigen-Ansatz", 12 Reaktionsgefäße benötigt.

Zunächst wurde Antigen mit einer Anfangskonzentration von $10-30 \mu\text{l}$ Vollserum in $150 \mu\text{l}$ physiologischer NaCl, das entspricht ca. $25 \mu\text{g}$ Albumin, angesetzt. $50 \mu\text{l}$ davon wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die Ausgangskonzentration wurde schrittweise mittels einer geometrischen Verdünnungsreihe bis auf eine Menge von $0,39 \mu\text{g}$ Albumin verdünnt. In jedes Reaktionsgefäß wurden $50 \mu\text{l}$ der entsprechenden Verdünnungsstufe gefüllt. Von den 7 Verdünnungsstufen wurde jeweils die erste und letzte einfach, die dazwischenliegenden doppelt angesetzt. Der Äquivalenzpunkt (siehe Abschnitt 3.4.) lag in den meisten Fällen innerhalb dieses Konzentrationsbereichs. Zu der Antigenlösung wurden jeweils $50 \mu\text{l}$ Antiserum gegeben.

Danach konnte die Antigen-Antikörper-Reaktion 18 h lang bei Zimmertemperatur ablaufen.

Nach dieser Zeit wurden die Reaktionsgefäße bei 4 °C und 6500 U/min 30 min zentrifugiert. Daraufhin war das Präzipitat als am Boden des Reaktionsgefäßes befindliches Zentrifugat gut sichtbar. Der Überstand wurde abpipettiert und 1 ml physiologische NaCl zugegeben. Mit Hilfe eines Rüttlers wurden Präzipitat und NaCl-Lösung gut gemischt und erneut bei 4 °C, 6500 U/min 30 min zentrifugiert. Die überstehende NaCl-Lösung wurde abpipettiert und der gesamte Vorgang wiederholt. Der Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt, um sicherzustellen, daß Proteine, die nicht an der Präzipitatbildung beteiligt waren, später nicht photometrisch mitgemessen wurden.

Nun wurden 300 µl 0,5 N NaOH auf das Pellet gegeben. Dies hat eine völlige Hydrolyse der Proteine in ihre Aminosäuren zur Folge. Diese Lösung wurde in reduzierte Quarzküvetten gefüllt und die relative Aminosäurekonzentration durch die photometrische Bestimmung der Extinktion mit einem Zeiss DMR-10 Photometer bei 280 nm gegen 0,5 N NaOH bestimmt.

Nach dieser Methode konnten pro "Antiserum-Ansatz" ein homologer³ und bis zu 12 heterologe Tests erfolgen.

3.4. Äquivalenzpunktfindung

Der im Abschnitt 3.3.5. dargestellte quantitative Präzipitintest ergab für jeden Einzelansatz 12 Extinktionswerte. Entsprechend der angesetzten Antigenkonzentration wurden für die erste und letzte Konzentrationsstufe je ein Extinktionswert, für die Verdünnungsstufen 2-6 je zwei Extinktionswerte gemessen. Trägt man die Antigenkonzentration

³Homolog bedeutet hier, daß es sich beim Antigen um das Albumin handelt, gegen welches das Antiserum produziert wurde.

logarithmisch auf der Abszisse gegen die Extinktion auf der Ordinate auf, so erhält man durch Interpolation eine für diese Reaktion typische eingipfelige Kurve ("Heidelbergerkurve") (BRANDIS 1972, Abb. 29.).

Anfangs, bei hoher Antigenkonzentration, liegt ein Antigenüberschuß im Reaktionsgemisch vor, der sich bei abnehmender Konzentration in einem fast linearen Anstieg der Kurve äußert. Hier sind alle Antikörpervalenzen vollständig abgesättigt. Es kann sich kein ausgeprägtes Netzwerk (Präzipitat) bilden, da überwiegend Komplexe vorliegen, die aus zwei Antigenen und einem Antikörper bestehen (ROITT 1984). Der abfallende Teil der Kurve verdeutlicht einen Antikörperüberschuß, bei dem die Antigenvalenzen vollständig abgesättigt sind. Das Antigen-Antikörper-Verhältnis hängt

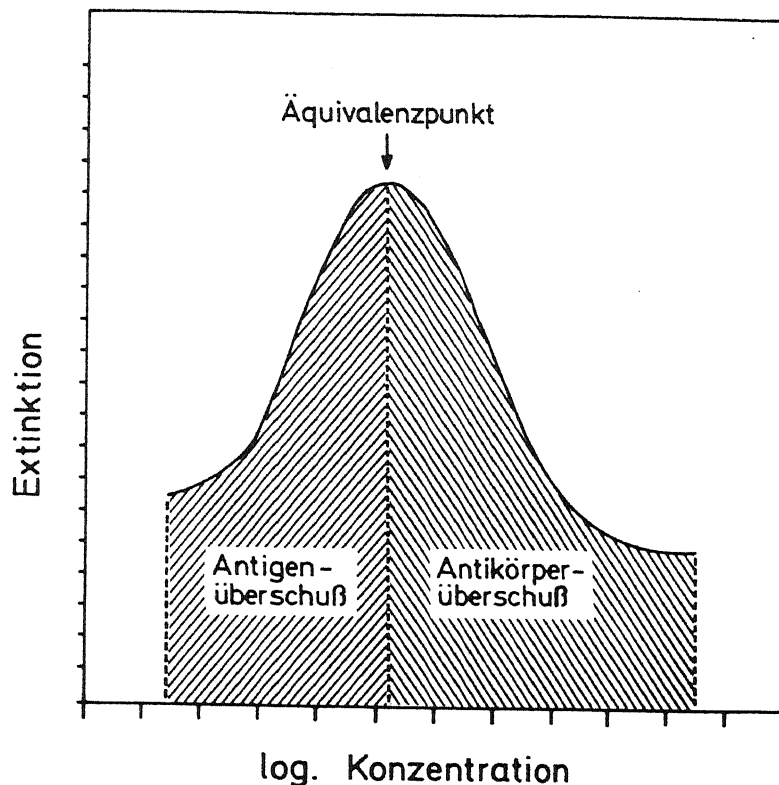


Abb. 29. Schematische Darstellung der Antikörper-Antigen-Relationen beim Präzipitintest. Die Antikörpermenge wird während des gesamten Tests konstant gehalten. Die Antigenmenge wird geometrisch verdünnt, was auf der Abszisse als logarithmische Konzentration angegeben ist. Am Äquivalenzpunkt entsprechen sich die Antikörper-Antigen-Bindungsstellen, so daß es zur optimalen Ausbildung eines Präzipitates kommt. Dort ist bei der photometrischen Bestimmung der Präzipitatenmenge die Extinktion am höchsten.

dabei von der Anzahl der Valenzen pro Antigen ab. Nur am Kurvengipfel ("Peak"), dem Äquivalenzbereich, ist das Verhältnis von Antigenvalenzen zu Antikörpervalenzen derart, daß sich ein großes dreidimensionales Gitter, ein typisches Immunpräzipitat, bilden kann.

Da man weder die genaue Anzahl der Antigenvalenzen des Albumins kennt, noch die Konzentration entsprechend der hohen Sensibilität der Antiseren genau auf den Äquivalenzpunkt einstellen könnte, behilft man sich mit der graphischen oder mathematischen Ermittlung des Äquivalenzpunktes.

- Graphische Ermittlung: Hierbei wurden die einzelnen Meßwerte in das weiter oben schon besprochene Koordinatensystem eingetragen. Dann wurden die typischen aufsteigenden bzw. abfallenden Schenkel der Kurve rekonstruiert und schließlich der Peak interpoliert (Abb. 30.-32.).
- Mathematische Ermittlung: Die Berechnung der Kurve wurde mit einem selbst entwickelten Computerprogramm durchgeführt, in das u.a. die Funktion "spline" aus der Turbo Pascal Graphix Toolbox^R (HEIMSOETH SOFTWARE 1985) eingebunden war. Zunächst wurden für doppelt existierende Meßwerte die Mittelwerte errechnet. Handelte es sich in seltenen Fällen bei einem der Werte um einen extremen "Ausreißer", so wurde dieser nicht berücksichtigt. Das Programm errechnete dann mittels Glättungs-Polynomen interpolierende Punkte zwischen den Meßwerten. Das Polynom ist in allen Punkten des definierten Intervalls stetig. Die Interpolationspunkte wurden durch die folgende Formel errechnet:

$$p_n(x) = y_1 \frac{(x-x_2) \dots (x-x_n)}{(x_1-x_2) \dots (x_1-x_n)} + y_2 \frac{(x-x_1)(x-x_3) \dots (x-x_n)}{(x_2-x_1)(x_2-x_3) \dots (x_2-x_n)} \\ + \dots + y_n \frac{(x-x_1) \dots (x-x_{n-1})}{(x_n-x_1) \dots (x_n-x_{n-1})}$$

Nach der Berechnung wurde die Kurve graphisch dargestellt, um sie auf eine typische "Heidelberger"-Kurvengestalt zu prüfen (Abb. 33.-35.).

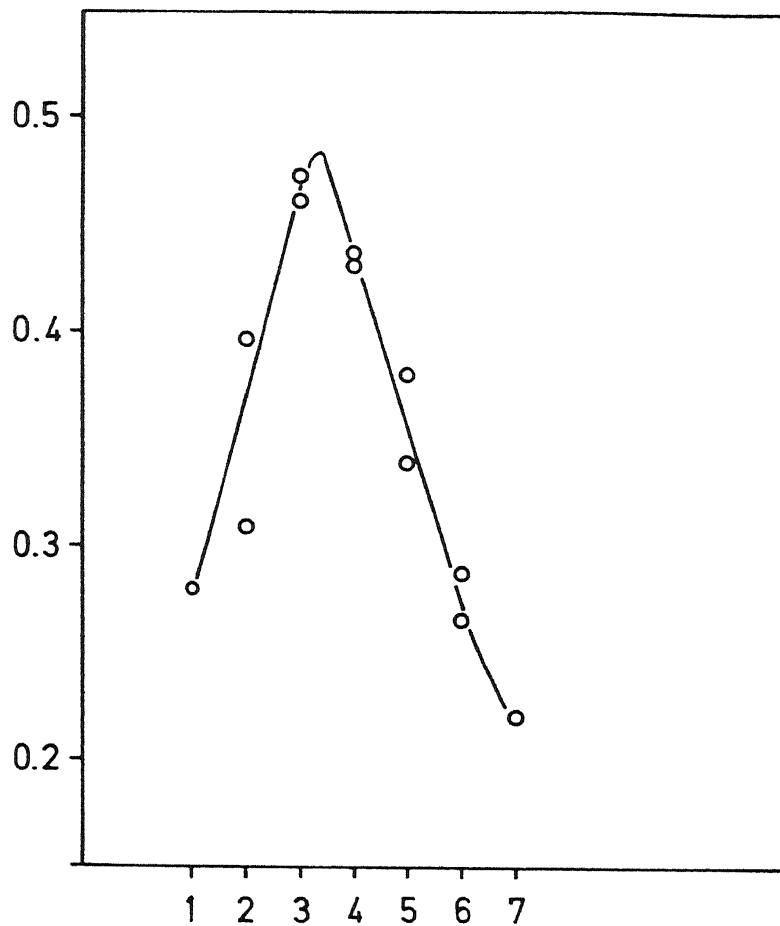


Abb. 30. Graphisch ermittelte Präzipitationskurve des Typs 1 (siehe Abschnitt 3.4.). Antiserum: P. p. persicus, Antigen: V. russelli siamensis. Abszisse: Verdünnungsstufen 1-7 (die Ausgangsmenge von ca. 25 μg Albumin wurde in 7 Stufen geometrisch auf ca. 0.4 μg Albumin verdünnt, siehe Abschnitt 3.3.5.), Ordinate: Extinktion.

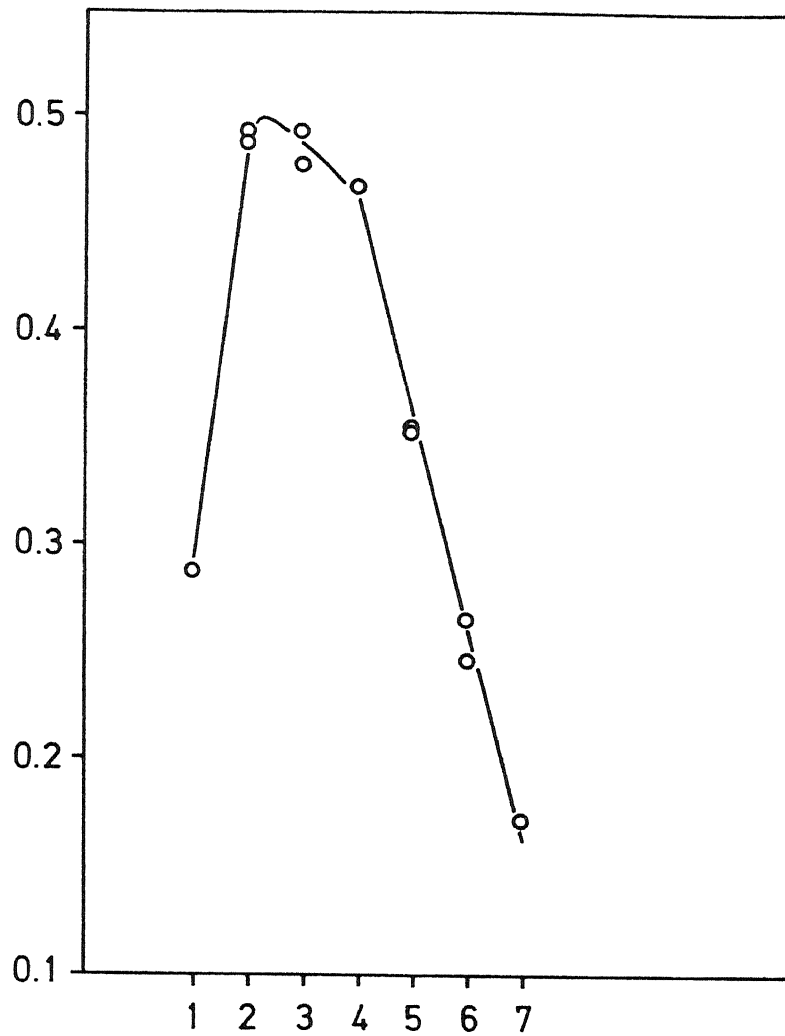


Abb. 31. Graphisch ermittelte Präzipitationskurve des Typs 2 (siehe Abschnitt 3.4.). Antiserum: V. palaestinae, Antigen: V. lebetina schweizeri. Sonst wie Abb. 30.

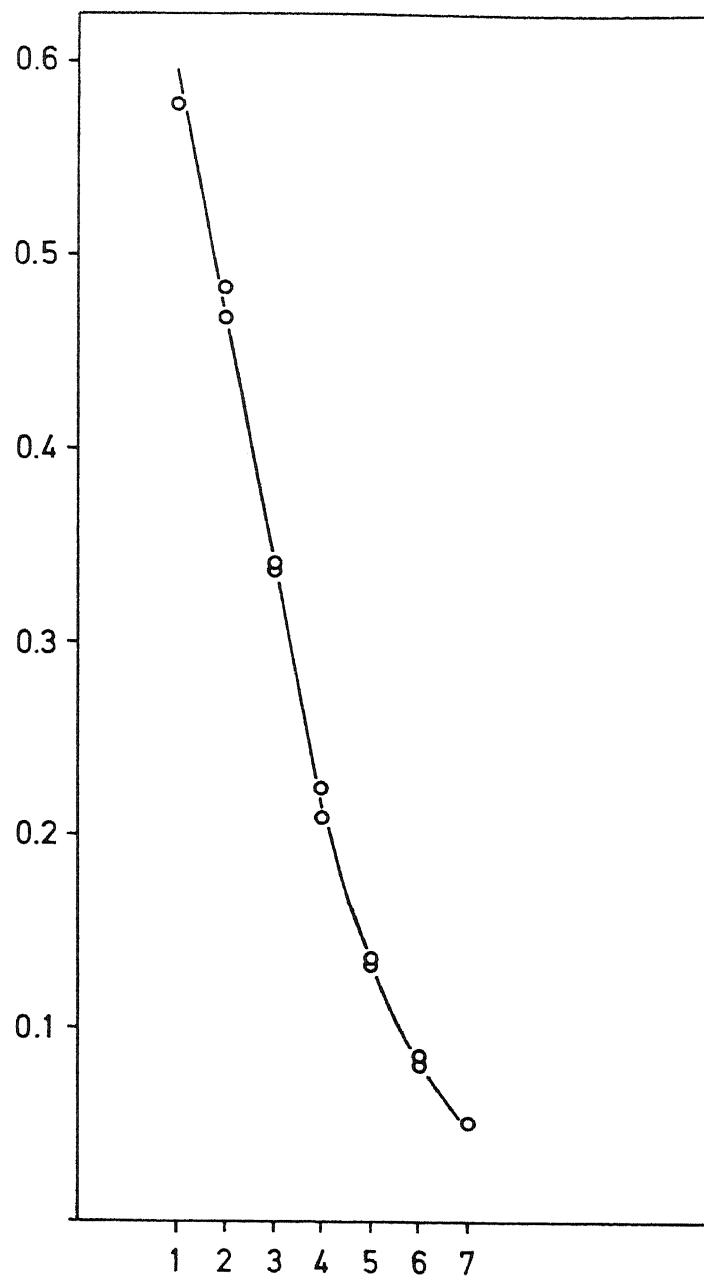


Abb. 32. Graphisch ermittelte Präzipitationskurve des Typs 3 (siehe Abschnitt 3.4.). Antiserum: V. xanthina, Antigen: V. xanthina. Sonst wie Abb. 30.

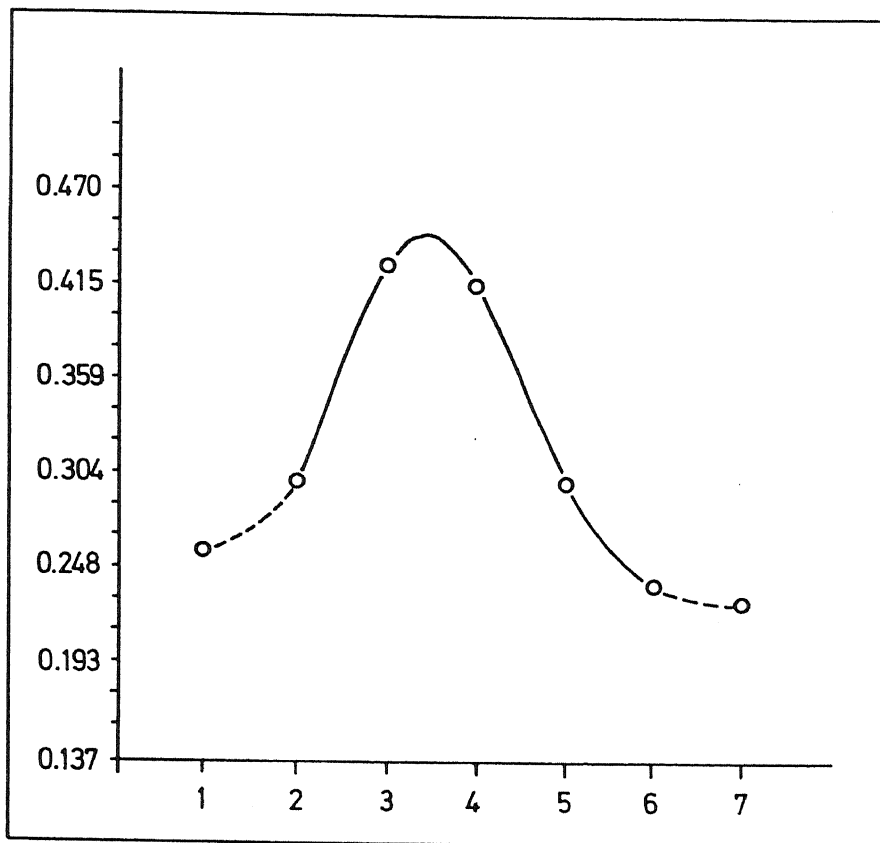


Abb. 33. Mathematisch ermittelte Präzipitationskurve des Typs 1 (siehe Abschnitt 3.4.). Antiserum: V. mauritanica deserti, Antigen: V. m. mauritanica. Abszisse: Verdünnungsstufen 1-7 (die Ausgangsmenge von ca. 25 μg Albumin wurde in 7 Stufen geometrisch auf ca. 0.4 μg Albumin verdünnt, siehe Abschnitt 3.3.5.), Ordinate: Extinktion.

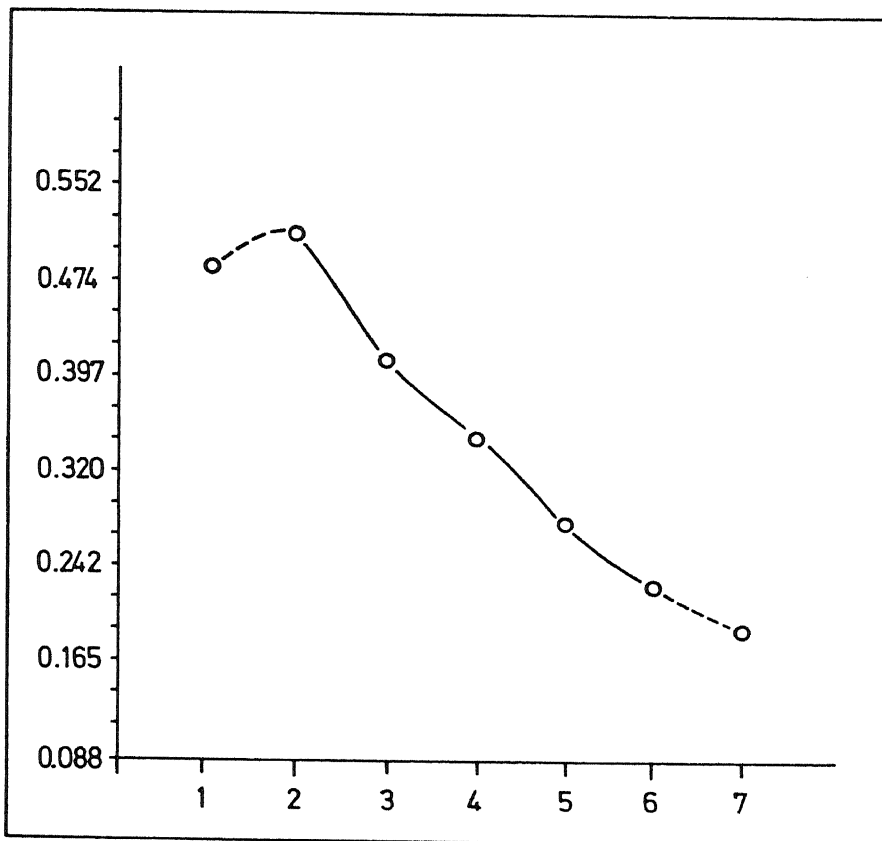


Abb. 34. Mathematisch ermittelte Präzipitationskurve des Typs 2 (siehe Abschnitt 3.4.). Antiserum: V. palaestinae, Antigen: V. russelli siamensis. Sonst wie Abb. 33.

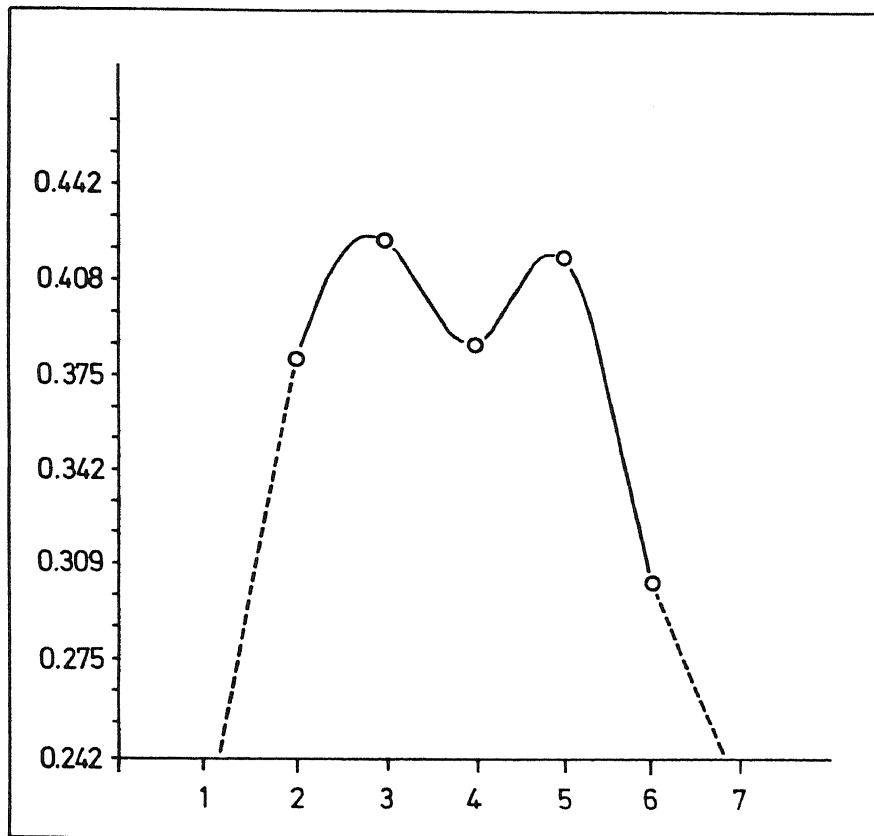


Abb. 35. Mathematisch ermittelte Präzipitationskurve des Typs 3 (siehe Abschnitt 3.4.). Antiserum: P. p. persicus, Antigen: V. l. lebetina. Sonst wie Abb. 33.

Bei der Sichtung der graphisch und mathematisch ermittelten Kurven wurden drei Typen unterschieden:

- Typ 1: Diese Kurven zeigten die typische eingipflige Charakteristik und wurden bedingungslos akzeptiert (Abb. 30., 33.).
- Typ 2: Bei diesen Kurven lag der Äquivalenzpunkt dicht an der Grenze des erfaßten Bereichs und konnte somit nicht mit großer Genauigkeit und Sicherheit bestimmt werden. Kurven dieses Typs wurden nur unter Vorbehalten, die weiter unten ausführlich diskutiert werden, akzeptiert (Abb. 31., 34.).
- Typ 3: Hier handelte es sich um Kurven mit einer durchweg schlechten Charakteristik, die keinen oder mehrere Peaks aufwiesen (Abb. 32., 35.). Derartige Kurven wurden verworfen und fanden in der weiteren Auswertung keine Berücksichtigung mehr.

Insgesamt wurden 634 Äquivalenzpunktbestimmungen (je 317 graphische und mathematische) durchgeführt. Davon gehörten 56 Kurven bzw. 8.8% dem Typ 2 an (graphisch 18 bzw. 5.7%; mathematisch 38 Kurven bzw. 12.0%). Dem Typ 3 mußten insgesamt 24 Kurven bzw. 3.8% zugerechnet werden.

3.5. Homologenkorrektur

Die Werte der Homologen sind von großer Wichtigkeit, um die relative Reaktion der heterologen Tests, und somit die immunologische Distanz, zu bestimmen. Besonders bei der Homologenmessung ist eine besondere Sicherheit der ermittelten Werte von evidenter Bedeutung, da sich hier gemachte Fehler prozentual auf den gesamten Test auswirken können.

Nach der Bestimmung der Äquivalenzpunkte stellte sich heraus, daß nicht alle homologen Tests brauchbar waren. Einige

der erhaltenen Kurven entsprachen den Typen 2 und 3 aus Abschnitt 3.4. und erschienen aus diesem Grund als Homologe ungeeignet. In wenigen anderen Fällen war die Reaktion im Vergleich zu den Heterologen offensichtlich bei weitem zu hoch oder zu niedrig, was lediglich mit dem Unbrauchbarwerden des homologen Albumins in der verwendeten Probe zu erklären ist.

Trotzdem sollten die betroffenen gesamten Tests nicht insgesamt verworfen werden, da dies eine bedeutende Verringerung der Gesamtzahl an Einzelversuchen (n) bedeutet hätte. Die statistischen und sonstigen n-abhängigen Berechnungen würden durch solches Vorgehen ein erhebliches Maß an Aussagekraft einbüßen.

Bei der Auswertung der Äquivalenzwerte ist die Unterscheidung in graphisch und mathematisch ermittelte "Peaks" (siehe Abschnitt 3.4.) zu beachten. So existieren für jeden Test je eine der oben genannten Auswertungen und somit zwei unabhängig ermittelte Äquivalenzpunkte. Es konnte in seltenen Fällen durchaus vorkommen, daß mit einer der beiden Methoden die Äquivalenzpunktermittlung reibungslos verlief, während man mit der anderen Methode auf Schwierigkeiten stieß und der Homologe per Korrekturmethode gefunden werden mußte.

Nachfolgend sind die korrekturbedürftigen Fälle aufgeführt (die angegebenen Test-Nummern beziehen sich auf die Testnummerierung der im Anhang befindlichen Tabelle A1.):

Anti- V. xanthina: Für den 1. und 2. Test wurde sowohl für die graphisch als auch für die mathematisch ermittelten Peaks der Homologe durch einen Außengruppen-Vergleich mit Echis korrigiert, d.h. die ermittelten immunologischen Distanzen (siehe Abschnitt 3.6.) vom Homologen zur Außen-gruppe wurden für solche Tests übernommen, bei denen der Äquivalenzpunkt des Homologen nicht eindeutig bestimmbar

war. So korrigierte Homologe wurden dann auf den gesamten Test angewendet.

Anti- V. r. raddei: Die Homologen der Tests 1 und 2 wurden nach dem Vergleich mit V. raddei kurdistanica-Werten aus anderen Tests ermittelt. Dies gilt für die graphische und mathematische Auswertung.

Anti- P. p. persicus: Bei diesem Antiserum wurde Test Nr. 4 der graphischen Auswertung nach der Echis-Außengruppe, Test Nr. 4 der mathematischen Auswertung nach P. persicus fieldi und Test Nr. 1 der graphischen Auswertung nach V. palaestinae korrigiert.

Insgesamt wurden 54 Testauswertungen (je 27 graphisch und mathematisch) vorgenommen. Davon mußte in 11 Fällen (20.4%) der Homologe korrigiert werden.

3.6. Berechnung der immunologischen Distanzen

Die immunologischen Distanzwerte (IDs) wurden nach folgender Formel berechnet (JAGER 1984):

$$ID = 100 - \left(100 \frac{E_{\text{heterolog}}}{E_{\text{homolog}}} \right)$$

wobei E = gemessene Extinktion.

So ermittelte IDs sind ein Maß der prozentualen Differenz der immunologischen Reaktion eines heterologen Albumins relativ zum homologen Albumin.

3.7. Statistische Behandlung der Daten und Ausschluß ungeeigneter Werte

Zunächst wurde das gewonnene Datenmaterial auf das Kriterium $ID < 0$ überprüft, d.h. auf IDs, die im Test eine höhere Reaktion zeigten als der Homologe. Dieses Kriterium traf auf 32 IDs (5.0%) zu. Die betreffenden Werte wurden eliminiert.

Existierten für ein Taxon pro Antiserum mindestens zwei gemessene IDs, so wurde geprüft, ob einer der Werte mehr als 7.5% (absolute Reaktion) vom nächsten Wert abwich (HERRMANN et al. 1987). Wurde diese Toleranz überschritten und handelte es sich bei der zum entsprechenden ID gehörenden Kurve um eine vom Typ 2 (Abschnitt 3.4.), so wurde dieser Wert ebenfalls ausgeschieden. Insgesamt lagen 22 IDs bzw. 3.5% außerhalb der 7.5%-Toleranz, wovon 8 bzw. 1.3% dem Kurventyp 2 entsprachen und ausgeschieden wurden.

Nun wurde für jedes Antiserum und jedes Albumin Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (s), Varianz (s^2) und, falls mindestens 3 IDs vorhanden waren, der Median (\tilde{x}) nach SACHS (1984) bestimmt.

War $s^2 > 25.0$ wurden die zugrundeliegenden IDs auf das Vorkommen von Kurventyp 2 kontrolliert und diese IDs gegebenenfalls ausgeschieden. Entsprachen alle in Frage stehenden Kurven dem Typ 2, so konnte nicht entschieden werden, welcher Wert der Realität am nächsten kommt. In diesem Fall wurden alle Werte beibehalten. Nach der Herausnahme von Einzelwerten erfolgte die Neuberechnung der statistischen Werte. Stellte sich nach der Berechnung heraus, daß s^2 zu, statt abgenommen hatte, und sich eine Verschlechterung der Ausgangssituation ergab, wurde die anfängliche Varianz akzeptiert.

Der Median eignet sich nach SACHS besonders dazu, bei kleinen Stichproben (hier $n = 1-5$) zu prüfen, ob das geometrische Mittel \bar{x} unverhältnismäßig stark durch "Ausreißer"

beeinflusst wird. Zur Ermittlung des Medians wurden die Werte ihrer Größe entsprechend aneinandergereiht. Bestand die Reihe aus einer ungeraden Zahl von Einzelwerten, so entsprach der mittlere dem Medianwert. War eine gerade Zahl an Einzelwerten an der Reihe beteiligt, wurde der Median mit den beiden mittleren Werten und der Formel $\tilde{x} = \frac{1}{2}(x_1+x_2)$ berechnet.

Nach dem Vergleich von \bar{x} und \tilde{x} ergab sich die Einteilung der Ergebnisse in 3 Klassen:

A. $|\bar{x}-\tilde{x}| \leq 2.0$

\bar{x} und \tilde{x} entsprachen sich weitgehend. Die Einzelwerte schienen annähernd normal verteilt und wurden für die weiteren Berechnungen akzeptiert.

B. $2.0 < |\bar{x}-\tilde{x}| < 5.0$

Fälle, bei denen sich die Differenz im obigen Rahmen befand, indizierten eine leicht "schiefe" Verteilung. Die beteiligten Werte wurden auf eventuell zugrundeliegende Kurven vom Typ 2 geprüft, diese ausgeschieden und \bar{x} sowie \tilde{x} neu berechnet.

C. $|\bar{x}-\tilde{x}| \geq 5.0$

Hier handelte es sich um eine ausgesprochen asymmetrische Verteilung der Einzelwerte. Es wurden beide Extremwerte (d.h. kleinster und größter Wert) gestrichen und \bar{x} sowie \tilde{x} neu berechnet.

Insgesamt wurde der Median in 65 Fällen bestimmt. Davon traf in einem Fall (1.5%) das B-Kriterium und in 4 Fällen (6.2%) das C-Kriterium zu.

Ein Fall entsprach nach durchgeführter Korrektur immer noch dem Kriterium B, so daß, um wenigstens eine kleine An-

passung des Mittelwertes an die asymmetrische Verteilung der Einzelwerte zu erreichen, \bar{x} und \tilde{x} gemittelt wurden.

Im folgenden wurde die Übereinstimmung der Ergebnisse der graphischen und mathematischen Bestimmung des Äquivalenzpunktes (Abschnitt 3.4.) überprüft. Dies geschah durch eine Korrelationsanalyse nach SACHS. Zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten gebrauchte ich folgende Formel:

$$r = \frac{\Sigma xy - \frac{1}{n}(\Sigma x)(\Sigma y)}{\sqrt{[\Sigma x^2 - \frac{1}{n}(\Sigma x)^2][\Sigma y^2 - \frac{1}{n}(\Sigma y)^2]}}$$

Der errechnete Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0.95$ und ist hochsignifikant.

Alsdann wurden graphisch und mathematisch gewonnene Ergebnisse zusammengefaßt, indem für jedes Wertepaar \bar{x} , s und s^2 bestimmt wurden.

Wiederum wurde auf $s^2 \geq 25.0$ geprüft und gegebenenfalls wie oben beschrieben "Kurventyp 2-Daten" ausgeschieden. In 14 Fällen (10.9%) war die Varianz ≥ 25.0 .

3.8. Reziprozität der immunologischen Daten

Vergleicht man die mit einem Antiserum A zu Albumin B gemessene immunologische Distanz und, reziprok dazu, die mit einem Antiserum B zu Albumin A gemessene immunologische Distanz, so sollten sich die Werte theoretisch entsprechen. In der Praxis kann man beobachten, daß eine vollständige Reziprozität nicht gegeben ist (MAXSON & WILSON 1975, SARICH UND CRONIN 1976, CADLE 1988). Diese "Nicht-Reziprozität" hat zwei Gründe.

Zum einen verdeutlicht sie das "Rauschen", d.h. den methodischen Fehler, der einer bestimmten immunologischen

Methode zu eigen ist. Durch "Rauschen " verursachte "Nicht-Reziprozität" sollte zufällig verteilt sein.

Zum anderen kann die unterschiedliche Stärke der Immunantwort der verwendeten Kaninchen verantwortlich sein. Die unterschiedliche Differenzierungsfähigkeit der Antiseren kann dazu führen, daß Antiserum A verglichen mit Antiserum B relativ höhere Distanzen liefert. Durch diesen Umstand bedingte "Nicht-Reziprozität" tritt nicht zufallsverteilt auf, sondern ist mit bestimmten Antiseren korreliert.

Um die Abweichung der IDs von der perfekten Reziprozität quantitativ zu erfassen, wurde die "prozentuale Standardabweichung der Reziprozität" (%s rezi) nach MAXSON & WILSON (1975) und die "percent nonreciprocity" nach SARICH & CRONIN (1976) verwendet:

$$\%s \text{ rezi} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left[\frac{(a_i - b_i) 100}{a_i + b_i} \right]^2}$$

$$\% \text{ nonreciprocity} = 100 \frac{ID_{\alpha A-B} - ID_{\alpha B-A}}{ID_{\alpha A-B} + ID_{\alpha B-A}}$$

- wobei:
- a bzw. $ID_{\alpha A-B}$: ID von B nach A unter Verwendung von Antiserum A
 - b bzw. $ID_{\alpha B-A}$: ID von A nach B unter Verwendung von Antiserum B
 - n : Anzahl der getesteten "Albumin-Paare".

3.9. Korrektur nichtzufälliger Abweichungen ("nonrandom elements")

SARICH & CRONIN (1976) beschreiben eine Methode zur Korrektur der in Abschnitt 3.8. näher bezeichneten "nichtzufälligen Abweichungen" ("nonrandom elements") der reziproken Matrix.

Zunächst werden die Spalten- und Zeilensummen der Matrix gebildet (Anhang, Tab. A2.). Dann erfolgt die Berechnung der Zeilensumme/Spaltensumme-Indizes (Anhang, Tab. A2.). Diese Indizes sind ein Maß für die unterschiedliche Reaktionsfähigkeit der verschiedenen Antiseren. Nun werden die Werte des Antiserums, dessen Index am weitesten von 1.0 abweicht mit diesem Index multipliziert. Anschließend wird das Verfahren erneut durchgeführt und solange wiederholt, bis alle Indizes den Wert 1.0 haben und die unterschiedliche Differenzierungsfähigkeit der Antiseren angeglichen ist.

Bei diesem Vorgehen ist zu beachten, daß bei späteren Interpretationen auch die unidirektionalen Werte (d.h. Werte, die mit Albuminen ermittelt wurden, gegen die kein spezifisches Antiserum vorlag) mit den Indizes der entsprechenden Antiseren zu korrigieren sind.

3.10. Test auf unterschiedliche Evolutionsgeschwindigkeiten ("relative rate test")

Um eine Vorstellung der relativen Evolutionsgeschwindigkeit des Albumins bestimmter Taxa zu erlangen und gegebenenfalls Albumine mit verlangsamter oder beschleunigter Substitutionsrate zu erkennen und nicht aufgrund dieser Tatsache zu falschen phylogenetischen Schlußfolgerungen zu kommen, führten SARICH & WILSON (1967) den Test auf unterschiedliche Evolutionsgeschwindigkeiten ("relative rate test") ein (Abb. 36.).

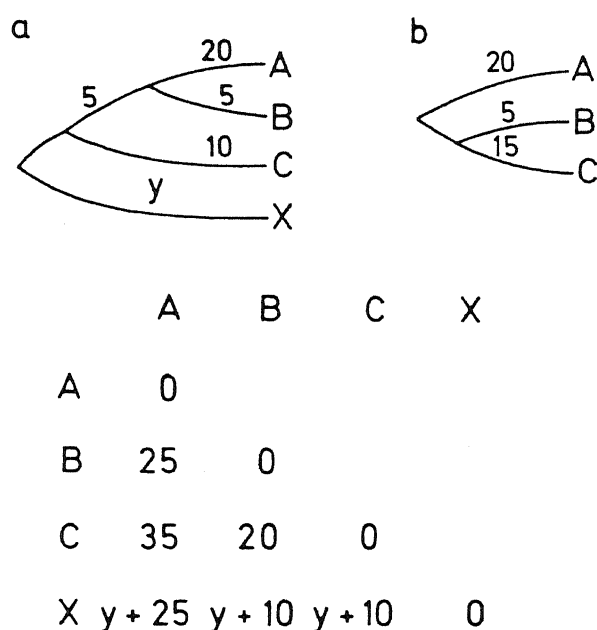


Abb. 36. Beispiel eines Tests auf unterschiedliche Albuminevolutionsraten (aus CADLE 1988). Die zugrunde liegenden Distanzen sind unten in der Matrix aufgeführt. Ermittelt man die Beziehungen der Albumine A, B und C, ohne die Distanzen zur Außengruppe X zu berücksichtigen, ergibt sich das in 36b dargestellte Verzweigungsschema. Bezieht man aber die jeweiligen Distanzen zur Außengruppe X in die Auswertung mit ein, so stellt man fest, daß sich das Albumin A seit der Trennung vom letzten gemeinsamen Vorfahren um 15 Distanzeinheiten schneller entwickelt hat als die Albumine B und C. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Evolutionsraten gelangt man nun zum in 36a dargestellten realistischeren Verzweigungsschema.

Für die Durchführung des Tests wurde Echis als Außengruppe zur Gruppe der paläarktischen Großvipern ausgewählt.

Es wurde der Mittelwert aus allen Echis-IDs der heterologen Antiseren berechnet. Ebenso wurde reziprok dazu für das Anti-Echis-Serum verfahren. Die beiden resultierenden Werte wurden gemittelt.

Beim Innengruppe-Außengruppe-Vergleich des ermittelten Außengruppe-ID und dem entsprechenden tatsächlich gemessenen ID, konnten unterschiedliche Evolutionsraten erkannt werden. Dies geschah durch die Berechnung der Differenz zwischen und durch die Ermittlung der Indizes aus gemessener und durchschnittlicher Distanz zur Außengruppe. Die Indizes dienten zur Korrektur der entsprechenden Antigen- und Antiserenwerte (siehe Abschnitt 4.1.2.2. und 4.1.2.3.).

3.11. Stammbaumrekonstruktion

Zur Zeit oft verwendete Methoden zur Erstellung von Dendrogrammen, die auf Distanzenwerten basieren, sind diejenigen von FITCH & MARGOLIASH (1967) und FARRIS (1972, "distance Wagner procedure"). Sie beruhen auf dem Prinzip der Additivität von Distanzwerten (WILSON et al. 1977).

Kriterium zur Beurteilung der Aussagekraft des jeweils errechneten Dendrogrammes ist die Übereinstimmung ("goodness of fit") zwischen den gemessenen Distanzen ("input") und den resultierenden, im Dendrogramm erscheinenden Distanzen ("output").

Der Fitch & Margoliash-Algorithmus versucht, das Dendrogramm zu finden, welches die Summe entsprechend der Formel $(d-d')^2/d^2$ für alle gemessenen IDs minimiert (d : "input"-Wert, d' : "output"-Wert). Der Farris-Algorithmus beschränkt sich auf Dendrogramme, bei denen $d' \geq d$ gilt (FELSENSTEIN 1982).

Aufgrund der unterschiedlichen Prinzipien der beiden Methoden sollten anfangs beide verwendet werden. Leider waren die bei CADLE (1988) zitierten Programme WAGPROC und NETOPT (SWOFFORD 1982), die Modifikationen des Farris-Algorithmus darstellen, nicht erhältlich (SWOFFORD, pers. Mitt.).

Fitch & Margoliash-Dendrogramme wurden mit Hilfe des Programmes FITCH, enthalten im Programmpaket PHYLIP Version 3.1 (FELSENSTEIN 1988), erstellt. Echis wurde als Außen-Gruppe verwendet. Negative Astlängen wurden per Option unterbunden. Die erstellten Dendrogramme besaßen keine "Wurzel" ("unrooted"), d.h. für die jeweils erste Verzweigung eines Dendrogrammes kann nur die Distanz zwischen den beiden Taxa errechnet werden und nicht die Distanz bzw. Astlänge vom letzten gemeinsamen Vorfahren.

Da die resultierenden Dendrogramme nicht unabhängig von der Reihenfolge der eingegebenen Taxa sind, wurden insgesamt 11 voneinander unabhängige Berechnungen, mit zufällig gefundener Eingabereihenfolge der Taxa, durchgeführt.

Als Maß für die Eingabe-Ausgabe-Übereinstimmung ("goodness of fit"-Parameter) wurde in den die reziproken Distanzen betreffenden Fällen die "average percent standard deviation" (APSD) nach FITCH & MARGOLIASH bestimmt. Das Programm FITCH berechnet diesen Wert mit folgender Formel:

$$\text{APSD} = \sqrt{\frac{\sum \frac{(d_{ij} - d'_{ij})^2}{d_{ij}^2}}{n-2}} \cdot 100$$

wobei: - d_{ij} : gemessener ID zwischen Taxon i und Taxon j
 - d'_{ij} : erhaltener ID zwischen Taxon i und Taxon j
 - n : Anzahl der IDs.

Als weiteres Maß für die Eingabe-Ausgabe-Übereinstimmung wurde der F-Wert nach PRAGER & WILSON (1976) berechnet:

$$F = 100 \frac{\sum |d_{ij} - d'_{ij}|}{\sum d_{ij}}$$

FITCH akzeptiert zur Dendrogrammberechnung nur vollständige Matrizen, d.h. Dendrogramme konnten mit FITCH nur für diejenigen Taxa erstellt werden, für die eine vollständige reziproke Matrix vorhanden war.

Um die Taxa, für die lediglich unidirektionale Werte (siehe Abschnitt 3.9.) existierten, ebenfalls in das Dendrogramm einfügen zu können, wurde die Methode von BEVERLEY & WILSON (1982) benutzt. Dabei wurde ein Fitch & Margoliash-Dendrogramm als Rahmen ("framework tree") verwendet, in den einige "unidirektionale" Taxa sukzessiv eingefügt wurden. Dafür wurde jedes "unidirektionale" Taxon an potentiell möglichen Verzweigungsstellen eingefügt und für jeden dadurch erhaltenen neuen Baum der F-Wert berechnet. Die endgültige Bestimmung des Abzweiges der entsprechenden Taxa erfolgte nicht ausschließlich nach dem günstigsten F-Wert, sondern orientierte sich teilweise auch an den konventionell erworbenen Ergebnissen von GROOMBRIDGE (1980) (siehe oben, Abb. 1.).

Alle in diesem Abschnitt bisher beschriebenen Methoden setzen keine konstante Evolutionsrate voraus.

Alternativ dazu wurden Dendrogramme unter Verwendung aller (reziproker und unidirektionaler) IDs mit hierarchischen Clusteranalysen erstellt (JOGER 1986, JOGER & ARANO 1987 und HERRMANN et al. 1987). Hierbei wurden jeweils Taxa mit den niedrigsten IDs zueinander zusammengefaßt und im weiteren Verlauf unter Verwendung der ID-Mittelwerte als Einheit betrachtet.

Bei diesem Verfahren wird eine konstante Evolutionsrate vorausgesetzt. Bei nicht-konstanter Evolutionsrate müssen die IDs daher entsprechend korrigiert werden ("relative rate test", siehe Abschnitt 3.10.).

3.12. Eichung der Zeitskala und Berechnung der Isolationszeiten

Die Eichung der Zeitskala für ein ermitteltes Dendrogramm kann durch bekannte Fossilien oder markante historisch-geologische Ereignisse (z.B. Trennung von Landmassen, Entstehung von Landverbindungen, Auffaltung von Gebirgen, etc.) geschehen (z.B. JOGER 1984). Diese Weise der Zeitskalierung birgt keine Probleme, solange die immunologischen Distanzen und somit die Evolutionsgeschwindigkeit auf den verschiedenen Ästen des Dendrogrammes annähernd gleich sind. Weichen die Evolutionsraten aber deutlich voneinander ab, so führt die oben beschriebene Skalierung nicht zu befriedigenden Ergebnissen.

LUTZ et al. (1986) schlagen eine Methode zur Berechnung der Isolationszeiten bei ungleichmäßigen Evolutionsraten vor. Dabei wird zunächst der Durchschnittsabstand (Φ) eines "letzten gemeinsamen Vorfahres" (LGV) zu dessen untersuchten rezenten Nachfahren ermittelt.

$$\Phi = \frac{\sum x}{\sum t_{rel}}$$

wobei: x: Distanzen der Nachfahren vom LGV
 t_{rel} : relative Zeit bezogen auf das nächstältere
 Zeitniveau.

Dann wird das Verhältnis (Q) zweier Zeiten t_1 / t_2 , von denen eine aufgrund anderer Quellen (siehe oben) bekannt ist, berechnet.

$$Q = \frac{\Phi}{\Phi + r}$$

wobei: r: Länge des im Dendrogramm nächsten nach unten führenden Astes.

Ist Q ermittelt, kann man mit der Gleichung $t_1 = Q \cdot t_2$ die unbekannte Zeit t_1 bzw. t_2 ausrechnen, wenn die jeweils andere Zeit t_2 bzw. t_1 bekannt ist.

Dieses Verfahren der Ermittlung der Isolationszeiten wurde für das Fitch & Margoliash-Dendrogramm der reziproken Matrix und das nachträglich eingefügte Taxon V. l. schweizeri durchgeführt. Für alle anderen Dendrogramme wurde die anfangs beschriebene Methode verwendet.

3.13. Methodenkritik

Konventionell erstellte, z.B. auf Pholidosemerkmalen (Schuppenzahlen) basierende Phylogenien sind jederzeit reproduzierbar. Die Reproduzierbarkeit serologischer Ergebnisse ist allerdings nur mit den unten genannten Einschränkungen gegeben (siehe auch JOGER 1984, S. 169).

Hauptfehlerquellen bei der Durchführung der Präzipitintests waren Pipettierfehler bei der Erstellung geometrischer Verdünnungsreihen und bei den diversen Waschvorgängen. Beim Pipettieren auftretende Unregelmäßigkeiten wurden notiert und der entsprechende Ansatz gegebenenfalls bei der Auswertung verworfen. Zukünftig sollten Techniken gefunden werden, die diese "mechanischen" Fehler verringern.

Unterschiedliche Differenzierungsfähigkeit einzelner Antiseren wurde durch die Vereinigung ("poolen") von jeweils zwei entsprechenden Antiseren vermindert. Immer noch vorhandene Unterschiede in der Differenzierungsfähigkeit der

Antiseren konnten durch die von SARICH & CRONIN (1976) beschriebene Korrekturmethode (Abschnitt 3.9.) angeglichen werden. JOGER (1990a) empfiehlt, nicht die bisher oft verwendeten linearen Korrekturfaktoren zu gebrauchen, sondern proportional wirkende Korrekturformeln einzusetzen. Diese Korrekturformeln sollen dem realen Reaktionsverhalten der Antiseren besser angepaßt sein, da die Reaktion bei niedrigen Distanzen relativ größer ist als bei hohen Distanzen. Obwohl lineare Korrekturfaktoren eingesetzt werden, liegt der Vorteil der Sarich & Cronin-Methode in der iterativen Angleichung aller Antiseren zueinander. In Zukunft sollte die Verwendung dieser iterativen Anpassung aller Antiseren mit proportionalen Korrekturformeln geprüft werden.

JOGER (1990a) führt in seiner Arbeit eine weitere Korrektur für multiple Substitutionen durch. Die zur Korrektur benötigten Werte ermittelte er durch den Vergleich der Aminosäuresequenzen von Human- und Rinderserumalbumin. Es ergaben sich Faktoren von z.B. 1.02 für 20 % Distanz, 1.09 für 50 % Distanz und 1.19 für 90 % Distanz. Die Korrektur der multiplen Substitutionen ist besonders bei hohen Distanzen erforderlich.

Ein weiterer Kritikpunkt sind Schwierigkeiten bei der zeichnerischen Bestimmung der Äquivalenzpunkte (JOGER 1984). In der vorliegenden Arbeit sollte die Subjektivität dieser Methode durch die zusätzliche Anwendung eines Programmes, mit dessen Hilfe der Kurvenverlauf mathematisch bestimmt wurde, ausgeglichen werden. Doppelt angesetzte Verdünnungsstufen mußten allerdings vor Eingabe zur Verrechnung gemittelt werden, was im Einzelfall durchaus einen Verlust von Information bedeuten konnte.

Größter Mangel bei der Durchführung der Tests auf unterschiedliche Evolutionsraten (Abschnitt 3.10.) war das Fehlen der meisten "unidirektionalen" Taxa im Außengruppen-Vergleich. Dies hatte zur Folge, daß zwar diejenigen Taxa, gegen deren Albumin Antiseren verfügbar waren, per "rate

test" sowohl in Form des Antiserums als auch des Antigens (in der Matrix Zeile und Spalte !) an die durchschnittliche Rate angepaßt werden konnten, die "unidirektionalen" Taxa aber nicht. Daraus resultierte eine semikorrigierte, unidirektionale Werte einschließende Matrix, die akzeptiert werden mußte.

Die verschiedenen Methoden der Stammbaumrekonstruktion sind aus theoretischen Gründen Gegenstand kontroverser Diskussionen (FARRIS 1981, FELSENSTEIN 1981, SWOFFORD 1981).

Bei hierarchischen Clusteranalysen werden konstante Evolutionsraten vorausgesetzt. Dies entspricht in manchen Fällen den Eingabe-Daten nur sehr schlecht und stellt dann eine sehr starke Vereinfachung dar. Ausgeglichen wird dies durch die Korrektur unterschiedlicher Evolutionsgeschwindigkeiten (siehe Abschnitt 3.10.).

Die alternativ dazu verwendete Fitch & Margoliash-Methode erzeugt eine möglichst gut an die Eingabewerte ("input") angepaßte Ausgabe ("output") (vgl. Abschnitt 3.11.). Allerdings hat auch diese Methode Schwächen indem sie u.a. relativ häufig negative Astlängen im Dendrogramm erzeugt. In dem von FELSENSTEIN (1988) entwickelten Programm FITCH sind negative Äste optional vermeidbar. Manche Autoren (z.B. FARRIS 1981) lehnen sämtliche z.Z. bekannte Distanzmethoden ("distance matrix methods") aufgrund manchmal auftretender nichtmetrischer Distanzen ("triangle inequality", siehe Abschnitt 4.3.) und negativer Astlängen für immunologische Distanzen ab. FELSENSTEIN (1982, 1984) argumentiert dagegen, indem er FARRIS' Bedenken als von rein ästhetischer Natur zurückweist.

Sollen 20 Taxa mit der Fitch & Margoliash-Methode untersucht werden, so sind nach FELSENSTEIN (1978) 2.2×10^{20} verschiedene Bäume möglich. Um den Baum der besten Übereinstimmung mit dem "input" zu finden, müßten theoretisch sämtliche Dendrogramme generiert werden. Dies erscheint selbst unter Verwendung leistungsfähiger Computer aus-

sichtslos. Tatsächlich werden im Rahmen der meisten Arbeiten bis zu ca. 100 verschiedene Bäume erzeugt, unter denen derjenige mit dem besten "goodness of fit"-Wert ausgewählt wird. Praktisch zeigt sich, daß selbst bei dieser relativ geringen Anzahl erzeugter Dendrogramme für die meisten der zugrunde liegenden Distanzmatrizen brauchbare Näherungen zum "Optimalbaum" gefunden werden können.

CADLE (1988) äußert sich zum Problem der verschiedenen Methoden der Stammbaumrekonstruktion wie folgt: "Until we have methods of testing alternative trees statistically, an eclectic approach would seem to be a rational one". SARICH & CRONIN (1976) meinen "... any analysis of an actual data set must take cognizance of the uncertainties introduced by parallelisms, convergences, back mutations, and particularly the already discussed vagaries of immunology. Thus perfect additivity becomes impossible and any cladistic solutions become approximations." und "... the general question of how closely these cladograms approximate what actually happened cannot be answered directly, that is, by checking it against what actually happened. We do not know what actually happened; if we did, there would be little, if any, point in doing the molecular studies. We are then left with three indirect checks on the reliability of the cladograms." Diese drei Tests werden durch (1) das "goodness of fit"-Kriterium, (2) durch den Vergleich mit auf anderen Molekülen basierenden Dendrogrammen und (3) durch den Vergleich mit konventionell erworbenen Vorstellungen zur Phylogenie der untersuchten Gruppe geliefert.

Die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls angefertigten Elektropherogramme wurden lediglich zur Absicherung von immunologischen Ergebnissen auf dem Unterart/Art-Niveau benutzt. Die Homologisierung einzelner Proteinbanden war mit Ausnahme des Albumins nicht eindeutig möglich. Die Auswertung des Proteinbandenmusters erfolgte ausschließlich im aussagekräftigen anodischen Bereich unter Verwendung des

Kriteriums Bande vorhanden / Bande nicht vorhanden (JOGER
1984).

4. Ergebnisse

4.1. Immunologische Ergebnisse

4.1.1. Immunologische Distanzen

Nachfolgend soll die Auswertung der immunologischen Distanzen (IDs) der untersuchten Albumine aus Tab. 5. dargestellt werden. Dies geschieht von den jeweiligen Antiseren ausgehend.

Tabelle 4. Auflistung der in nachfolgenden Tabellen verwendeten Abkürzungen von Art- und Unterartnamen.

Name	Abkürzung
<u>Eristicophis macmahoni</u>	Er
<u>Pseudocerastes p. persicus</u>	Pp
<u>P. p. fieldi</u>	Pf
<u>Vipera m. mauritanica</u>	mm
<u>V. m. deserti</u>	md
<u>V. l. lebetina</u>	ll
<u>V. l. obtusa</u>	lo
<u>V. l. schweizeri</u>	ls
<u>V. l. turanica</u>	lt
<u>V. palaestinae</u>	pa
<u>V. r. russelli</u>	rr
<u>V. r. siamensis</u>	rs
<u>V. xanthina</u>	xa
<u>V. r. raddei</u>	ra
<u>V. berus sachalinensis</u>	bs
<u>V. nikolskii</u>	ni
<u>V. a. aspis</u>	as
<u>V. aspis atra</u>	aa
<u>V. a. francisciredi</u>	af
<u>V. a. hugyi</u>	ah
<u>V. a. ammodytes</u>	ao
<u>V. a. meridionalis</u>	am
<u>V. a. transcaucasiana</u>	at
<u>Echis leucogaster</u>	El
<u>E. pyramidum</u>	Ep
<u>E. multisquamatus</u>	Em

Tabelle 5. Gemessene (unkorrigierte) immunologische Distanzen der Serumalbumine. Die Abkürzungen sind der Tab. 4. zu entnehmen. Durch Mittelwertbildung ermittelte Werte sind unterstrichen. Die Klammern umfassen Gruppen, die für die weitere Auswertung zusammengefaßt wurden.

Antiseren:

	xa	ra	ll	md	pa	Pp	El
Albumine:							
xa	0	<u>2.6</u>	<u>17.5</u>	<u>17.4</u>	<u>16.5</u>	<u>8.1</u>	<u>56.0</u>
ra	<u>13.8</u>	0	<u>22.8</u>	<u>21.6</u>	<u>17.7</u>	<u>13.3</u>	<u>56.7</u>
ll	<u>22.3</u>	<u>14.8</u>	0	<u>9.6</u>	--	<u>14.5</u>	--
lt	--	--	<u>2.2</u>	<u>10.0</u>	--	--	--
lo	<u>21.9</u>	<u>18.3</u>	<u>3.4</u>	<u>2.3</u>	--	<u>9.6</u>	--
ls	--	--	<u>11.5</u>	<u>5.4</u>	<u>27.5</u>	<u>6.2</u>	<u>66.0</u>
md	<u>29.6</u>	<u>31.3</u>	<u>23.5</u>	0	<u>17.9</u>	<u>7.4</u>	<u>68.2</u>
mm	--	--	--	<u>7.6</u>	--	--	--
pa	<u>9.5</u>	<u>10.4</u>	<u>15.8</u>	<u>12.5</u>	0	<u>11.0</u>	<u>56.7</u>
rr	--	<u>46.5</u>	--	<u>13.1</u>	<u>12.9</u>	<u>24.9</u>	<u>27.1</u>
rs	32.8	<u>41.6</u>	<u>18.2</u>	<u>12.6</u>	<u>29.2</u>	<u>14.0</u>	--
Pp	<u>23.5</u>	--	--	--	--	0	--
Pf	<u>9.2</u>	<u>16.0</u>	<u>19.3</u>	<u>11.5</u>	<u>24.1</u>	<u>7.0</u>	<u>51.5</u>
Er	<u>39.6</u>	<u>19.8</u>	<u>45.3</u>	<u>21.8</u>	36.6	10.1	<u>69.6</u>
bs	5.8	6.1	--	--	--	--	--
ni	<u>21.0</u>	--	--	28.3	--	20.5	--
aa	<u>35.0</u>	21.8	--	36.7	--	26.0	--
af	--	--	--	26.6	--	<u>14.8</u>	--
ah	--	<u>14.4</u>	--	25.9	<u>29.2</u>	<u>40.1</u>	<u>19.8</u>
ao	<u>30.5</u>	<u>23.3</u>	<u>32.9</u>	<u>30.4</u>	<u>23.3</u>	--	--
am	<u>22.6</u>	--	17.3	<u>30.3</u>	--	<u>21.3</u>	--
at	--	<u>19.3</u>	7.6	27.9	<u>32.9</u>	16.5	--
El	--	--	71.1	37.5	--	38.2	0
Ep	<u>44.1</u>	<u>41.3</u>	<u>50.6</u>	<u>28.8</u>	--	--	--
Em	<u>47.0</u>	<u>37.9</u>	<u>60.1</u>	<u>47.5</u>	<u>61.4</u>	<u>25.9</u>	--

4.1.1.1. Anti-Vipera xanthina-Albumin

V. raddei-Albumin zeigt einen Distanzwert von 13.8. Einen noch geringeren Wert hat palaestinae mit 9.5.

Die Gattung Pseudocerastes weist mit ihren beiden Unterarten persicus und fieldi eine hohe Variabilität (23.5 bzw. 9.8, Mittelwert 16.4) auf. Gefolgt werden diese Arten von den lebetina-Unterarten und der V. berus-aspis-ammodytes-Gruppe mit 22.1 bzw. 23.0. In der letztgenannten Gruppe fällt der unwahrscheinlich niedrige Wert von V. berus sachalinensis (5.8) auf. V. mauritanica deserti ist 29.6 und V. russelli siamensis 32.8 weit vom Homologen entfernt.

Erwartungsgemäß weist die Außengruppe Echis mit 45.5 den höchsten ID auf.

4.1.1.2. Anti-Vipera r. raddei-Albumin

Stärkste Präzipitation relativ zum Homologen zeigt hier xanthina mit einer Distanz von nur 2.8. Auch bei diesem Antiserum liegt palaestinae mit 10.4 relativ nahe beim Homologen. Mit durchschnittlichen IDs von 16.6 respektive 16.9 folgen die lebetina-Unterarten und die Vertreter der V. berus-aspis-ammodytes-Gruppe. Anschließend rangieren Pseudocerastes mit 16.0, Eristicophis mit 19.8, mauritanica mit 31.3 und die Echis-Arten mit 39.6.

Erstaunlicherweise weist russelli mit einem Durchschnittswert von 44.1 eine höhere Distanz zum Homologen auf, als die Außengruppe Echis.

4.1.1.3. Anti-Vipera l. lebetina-Albumin

Erwartungsgemäß rangieren die Unterarten turanica und obtusa mit 2.2 bzw. 3.4 dicht hinter der Nominatform lebetina.

Bemerkenswert ist die relativ hohe Distanz der Inselform schweizeri mit 11.5.

Auch hier erscheint palaestinae mit 15.8 rasch nach den nächstverwandten lebetina-Unterarten. Es folgen xanthina mit 17.6, russelli mit 18.2, Pseudocerastes mit 19.3, die getesteten Unterarten von V. ammodytes, hier als einzige Vertreter der V. berus-aspis-ammodytes-Gruppe, mit einem Mittelwert von ebenfalls 19.3 sowie raddei mit 22.8.

Unerwartet hoch ist der ID von mauritanica mit 23.5.

Weit vom Homologen entfernt befinden sich Eristicophis (45.3) und die Außengruppe Echis (60.6).

4.1.1.4. Anti-Vipera mauritanica deserti-Albumin

Der Mittelwert der lebetina-Unterarten und der m. mauritanica Wert zeigen mit 6.8 respektive 7.6 eine nur geringe Distanz zu mauritanica deserti.

Als nächste folgen die Taxa Pseudocerastes mit 11.5, palaestinae mit 12.5 und russelli mit 12.9. V. xanthina und raddei weisen Entfernungen von 17.4 bzw. 21.6 auf. Eristicophis schließt sich mit 21.8 an.

Etwas weiter entfernt liegen die Werte der V. berus-aspis-ammodytes-Gruppe mit 29.2.

Die Außengruppe Echis folgt wiederum als am weitesten entfernte Form mit 37.9.

4.1.1.5. Anti-Vipera palaestinae-Albumin

Hier weist der Homologe eine relativ hohe Distanz zu den nächstfolgenden Werten auf. Diese sind xanthina und raddei mit 16.5 bzw. 17.7. Sehr dicht folgt mauritanica mit 17.9.

Die nächste Gruppe wird von Pseudocerastes mit 24.1, russelli mit 27.1 und lebetina schweizeri mit 27.5 gebildet.

Die Kleinvipern der berus-aspis-ammodytes-Gruppe weisen eine Distanz von 32.0 auf, gefolgt von Eristicophis mit 36.6.

Echis hat mit 61.4 den höchsten ID auch dieses Antiserums.

4.1.1.6. Anti-Pseudocerastes p. persicus-Albumin

Die andere Pseudocerastes-Unterart fieldi weist eine Distanz von 7.0 auf, dicht gefolgt von V. mauritanica deserti mit 7.4 und V. xanthina mit 8.1.

Die nächste Gruppe bilden V. lebetina und Eristicophis mit jeweils 10.1, V. palaestinae mit 11.0, V. raddei mit 13.3 und V. russelli mit 15.4.

Etwas weiter entfernt liegt die Kleinvipern-Gruppe mit 19.8.

Echis hat einen ID von 32.1.

4.1.1.7. Anti-Echis leucogaster-Albumin

Die niedrigste Distanz zur Außengruppe Echis zeigt P. p. fieldi mit 51.5.

Gefolgt wird dieses Taxon von einer Gruppe, die aus V. aspis hugyi, V. xanthina, V. raddei und V. palaestinae besteht und IDs zwischen 55.9 und 56.7 liefert.

Die höchsten Distanzen werden von V. lebetina schweizeri, V. mauritanica deserti und Eristicophis mit 66.0, 68.2 und 69.6 geliefert.

4.1.1.2. Diskussion der immunologischen Distanzen

Die ermittelten IDs entsprachen zu einem großen Teil der erwarteten hierarchischen Abstufung.

V. palaestinae war in heterologen Tests, mit Ausnahme des Außengruppen-Antiserums gegen das E. leucogaster-Albumin, stets mit wenig unterschiedlichen relativ geringen Distanzen vertreten. Im reziproken Anti-V. palaestinae-Albumin-Vergleich zeigte sich allerdings eine leichte Abstufung der heterologen Tests, bei denen die xanthina-raddei-Gruppe palaestinae am nächsten stehen.

V. berus sachalinensis zeigte in beiden getesteten Fällen eine verdächtig niedrige Reaktion. Dies ist möglicherweise auf Albuminartefakte in der Serumprobe zurückzuführen. Da sie in beiden Fällen mit anderen IDs aus der V. berus-aspis-ammodytes-Gruppe zu einem Mittelwert verrechnet wurden, ist ihr Einfluß auf den resultierenden Wert vertretbar gering.

V. russelli zeigt beim Test gegen V. raddei-Antiserum eine höhere Distanz zum Homologen als die Außengruppe Echis. Da der russelli-Wert aus den Werten der Unterarten russelli und siamensis ermittelt wurde und diese keine große Differenz aufweisen (siehe Tab. 5.), scheint der Mittelwert gesichert. Allerdings zeigt Echis im Vergleich zu anderen heterologen Tests beim V. raddei-Antiserum eine relativ niedrige Distanz. Der hohe russelli-Wert kann somit lediglich als Indiz für die relativ große Unterschiedlichkeit von raddei- und russelli-Albuminen gewertet werden.

Beim V. lebetina-Antiserum war die hohe Distanz zu V. mauritanica deserti auffällig. Im Gegensatz dazu weist V. m. deserti im heterologen Test mit palaestinae- und Pseudocerastes-Antiserum auffallend niedrige Werte auf.

Für die weitere Auswertung wurden Taxa, die sowohl nach der gängigen Klassifikation (siehe Abschnitt 1.1. und 1.2.), als auch nach den gemessenen immunologischen Distanzen Gruppen bilden, zusammengefaßt (in Tab. 5. durch Klammern gekennzeichnet).

Tabelle 6. Matrix der reziproken immunologischen Distanzen. Abkürzungen: Album.= Albumin, xanth.= xanthina, lebet.= lebetina, mauri.= mauritanica, palae.= palaestinae, Pseud.= Pseudocerastes.

Album.:	<u>Antiseren:</u>						
	xanth.	raddei	lebet.	mauri.	palae.	Pseud.	Echis
xanth.	0	2.6	17.5	17.4	16.5	8.1	56.0
raddei	13.8	0	22.8	21.6	17.7	13.3	56.7
lebet.	22.1	16.6	0	6.8	27.5	10.1	66.0
mauri.	29.6	31.3	23.5	0	17.9	7.4	68.2
palae.	9.5	10.4	15.8	12.5	0	11.0	56.7
Pseud.	16.4	16.0	19.3	11.5	24.1	0	51.5
Echis	45.5	39.6	60.6	37.9	61.4	25.9	0

Für die Arten, gegen deren Albumin ein Antiserum produziert worden war, und die in heterologen Tests gegen die Antiseren der anderen Arten getestet wurden, wurde eine Matrix der reziproken IDs erstellt (Tab. 6.). Aus dieser Matrix wurden der % s rezi-Wert und die % Nichtreziprozität (siehe Abschnitt 3.8.) ermittelt. Der % s rezi-Wert beträgt 28.7, der % Nichtreziprozität-Wert 24.0. Eine Auswahl bereits in der Literatur publizierter Werte ist Tab. 7. zu entnehmen. Einschränkend muß bemerkt werden, daß alle diese Werte mittels Mikrokomplement-Fixierung gewonnen wurden. Für IDs, die mit dem quantitativen Präzipitintest ermittelt wurden, ist meines Wissens bisher kein vergleichbarer, alle reziproken IDs erfassender Wert publiziert. Beim Vergleich mit den Werten aus Tab. 7. zeigt sich, daß die hier errechneten Werte deutlich über den dort angeführten liegen, was z.T. durch eine unterschiedliche Reaktivität und

Für IDs, die mit dem quantitativen Präzipitintest ermittelt wurden, ist meines Wissens bisher kein vergleichbarer, alle reziproken IDs erfassender Wert publiziert. Beim Vergleich mit den Werten aus Tab. 7. zeigt sich, daß die hier errechneten Werte deutlich über den dort angeführten liegen, was z.T durch eine unterschiedliche Reaktivität und Differenzierungsfähigkeit der Antiseren bedingt sein kann. Wie groß der Anteil des "Methodenrauschens" an den ermittelten % s rezi- und % Nichtreziprozität-Werten ist, kann erst nach der in Abschnitt 4.1.2. folgenden Korrektur auf unterschiedliche Differenzierungsfähigkeit der Antiseren und unterschiedliche Evolutionsraten der Albumine festgestellt werden.

Tabelle 7. Auflistung einiger publizierter % s rezi-Werte und einiger % Nichtreziprozität-Werte für unkorrigierte immunologische Distanzen (siehe Abschnitt 3.8.). Die in den Matrices enthaltenen immunologischen Distanzen wurden mit der Mikrokomplement-Fixierungs-Methode gewonnen. ^(a): basiert auf IDs, die mittels quantitativen Präzipitintests gewonnen wurden.

Literatur	% s rezi	% Nichtreziprozität
CADLE 1984	10.4	8.9
CADLE 1988	--	9.0
CADLE & SARICH 1981	--	8.5
DAUGHTERY et al. 1982	15.0	--
DOWLING et al. 1983	10.2	--
HUTCHINSON & MAXSON 1987	15.9	--
LUTZ et al. 1986	15.1	--
MAXSON 1981	9.0	--
MAXSON 1984	9.1	--
MAXSON et al. 1979	12.7	--
MAXSON et al. 1982	19.7	--
MAXSON et al. 1984	8.2	--
MAXSON & ROBERTS 1984	12.4	--
MAXSON & ROBERTS 1985	25.0	--
MAXSON & WAKE 1981	11.0	--
ROBERTS & MAXSON 1989	15.5	--
SARICH & CRONIN 1976	--	18.0
diese Arbeit	28.7 ^a	24.0 ^a

4.1.2. Korrektur der immunologischen Distanzen

4.1.2.1. Korrektur der unterschiedlichen Differenzierungsfähigkeit der Antiseren

Die bereits in Abschnitt 3.9. angedeutete unterschiedliche Differenzierungsfähigkeit verschiedener Antiseren entsteht dadurch, daß das Albumin des immunisierten Kaninchens u. U. verschiedene Bereiche der Aminosäuresequenz mit dem antigenen Albumin gemeinsam haben kann (SARICH & CRONIN 1976).

Bezeichnet man das Kaninchenalbumin mit C, das Antigen-Albumin mit A und das zu testende Albumin mit B, so ist leicht einzusehen, daß wenn A und C an einer Stelle die gleiche Aminosäuresequenz aufweisen, keine Antikörper gegen die entsprechenden Aminosäuren gebildet werden (da sie vom Kaninchenimmunsystem nicht als fremd erkannt werden) und daher keine unterschiedliche immunologische Reaktion zwischen A und B festgestellt werden kann, auch wenn B an dieser Stelle von A abweicht. Differieren aber die Sequenzen von A und C an dem entsprechenden Abschnitt, so werden Antikörper gebildet und die Unterschiedlichkeit der beiden Sequenzen ist immunologisch detektierbar.

Die Immunantwort der Kaninchen kann aber auch aufgrund unterschiedlichen Vermögens zur Bildung spezifischer Antikörper individuell variieren.

Um Nichtreziprozität, die auf derartigen Effekten beruht, zu erkennen und zu korrigieren, wurde die in Abschnitt 3.9. beschriebene Methode angewandt. Ausgehend von den in Tab. 6. dargestellten reziproken IDs, wurde die unterschiedliche Differenzierungsfähigkeit der Antiseren in insgesamt 15 Korrekturschritten aneinander angeglichen. Die vollständige Darstellung dieses Verfahrens ist dem Anhang, Tab. A2. zu entnehmen.

Durch die Multiplikation der in dieser Tabelle einzeln ermittelten Korrekturfaktoren erhielt man pro Antiserum einen

Gesamtkorrekturfaktor (Verhältnis der Spaltensummen aus Tab. A2. vor und nach den durchgeführten Korrekturen) zur Angleichung der unterschiedlichen Differenzierungsfähigkeit. Nachträglich wurden mit diesem Faktor auch die unidirektionalen IDs, die an der Ermittlung der Faktoren nicht beteiligt waren, korrigiert (Tab. 8.).

Die Antiseren gegen die Albumine von V. xanthina, V. l. lebetina und E. leucogaster wiesen Gesamtkorrekturfaktoren von 0.99 bzw. 1.00 auf, was fast keiner bzw. keiner Korrektur gleichkam.

Das Anti-V. r. raddei-Albumin zeigte mit einem Faktor von 1.46 bereits eine deutliche Abweichung vom Idealwert 1.0. Besonders stark angepaßt werden mußte das V. mauritanica deserti- und P. p. persicus-Antiserum mit Korrekturfaktor 1.80 respektive 1.81. Die drei letztgenannten Antiseren lieferten ursprünglich zu niedrige IDs.

Das einzige Antiserum, das zu hohe IDs lieferte, wurde gegen das Albumin von V. palaestinae produziert. Die entsprechenden IDs mußten hier mit dem Faktor 0.84 multipliziert werden.

Der % s_{rezi}-Wert konnte durch diese Korrektur der Differenzierungsfähigkeit der Antisern auf 17.1 gesenkt werden, die % Nichtreziprozität fiel auf 10.8 (siehe 4.1.1.8.). Durch diese Senkung der Werte wird nun der tatsächliche Umfang des "Methodenrauschen" (methodische Schwankungsbreite bzw. Unsicherheitsbereich) erkennbar.

4.1.2.2. Relative Evolutionsgeschwindigkeit der Albumine

In Tab. 9. sind die relativen Evolutionsraten der getesteten Albumine aufgeführt. Im wesentlichen beschränkte sich der Test auf die Albumine, gegen die Antiseren verfügbar waren. Durch die Antiseren und die in diesen Fällen größere Anzahl von Einzelwerten hatten diese Albumine einen besonders großen Einfluß auf die gesamte Matrix der IDs. Bedingt durch die begrenzten Antiserumvorräte wurde lediglich für die ausschließlich unidirektional getesteten Albumine von E. macmahoni und V. aspis die relative Evolutionsrate bestimmt. Eristicophis bot sich wegen der isolierten Position im System, V. aspis als Vertreter der Kleinvipern s. str. an.

Tabelle 9. Test der relativen Evolutionsrate. Aufgeführt sind die Abweichungen der IDs der gegen die Außengruppe Echis getesteten Albumine. Der dafür verwendete Echis-ID (57.3) ist der Mittelwert aus allen reziproken Echis-Tests. ID: Mittelwert der reziproken IDs der getesteten Art. Relative Rate: Abweichung vom Echis-ID 57.3. Index: Quotient aus Echis-ID 57.3 und dem für das betreffende Albumin angegebenen ID. (^a): Für diese Arten lagen nur unidirektionale Werte vor; ein Index wurde nicht bestimmt, da eine Korrektur für nur zwei unidirektional getestete Arten nicht vorgenommen werden sollte.

Albumin	ID	Relative Rate	Index
<u>V. xanthina</u>	49.7	-7.7	1.15
<u>V. raddei</u>	56.4	-0.9	1.02
<u>V. lebetina</u>	63.2	5.9	0.91
<u>V. mauritanica</u>	67.2	9.9	0.85
<u>V. palaestinae</u>	53.2	-4.1	1.08
<u>V. aspis</u> ^a	55.9	-1.4	--
<u>P. persicus</u>	54.3	-3.0	1.06
<u>E. macmahoni</u> ^a	69.6	12.3	--

Die gefundenen relativen Evolutionsraten bewegten sich zwischen -7.9 (unterdurchschnittliche Substitutionsrate) und 12.3 (überdurchschnittliche Substitutionsrate) relativ zum Echis-Albumin.

V. raddei-Albumin wich mit -0.9 kaum von Echis-Albumin ab. V. aspis, P. persicus und V. palaestinae besitzen Albumine mit etwas niedriger Rate (-1.4 bis -4.1). Die niedrigste Substitutionsrate wies V. xanthina-Albumin mit mit einer relativen Rate von -7.7 auf.

Überdurchschnittlich schnell evolvierende Albumine haben V. lebetina (5.9), V. mauritanica (9.9) und E. macmahoni (12.3).

Tab. 10. zeigt die gesamte Matrix der entsprechend der relativen Evolutionsraten korrigierten IDs. Die Korrektur erfolgte per Multiplikation der in Tab. 8. aufgeführten IDs mit den zu jedem an der Reaktion beteiligten Albumin (Antiserum-Albumin und Antigen-Albumin !) gehörigen Index der relativen Rate (siehe Tab. 9.). Die unidirektionalen IDs wurden nur mit dem Index des Antiserum-Albumins multipliziert.

Auf den % s_{rezi}-Wert und die % Nichtreziprozität hatte diese Korrektur keine Auswirkungen.

Tabelle 10. Immunologische Distanzen der Serumalbumine nach der Korrektur der unterschiedlichen relativen Evolutionsrate der Albumine. Zur Korrektur wurden die in Tab. 9. errechneten Indizes verwendet. Sämtliche Werte an der ein Albumin mit bekannter relativer Evolutionsrate beteiligt war, wurden mit dem entsprechenden Indexwert multipliziert. Beispiel: Für das V. xanthina-Albumin wurde laut Tab. 9. ein Index von 1.15 ermittelt. Es wurden sowohl alle heterologen V. xanthina-Albumin-IDs (unten: Zeile xa) als auch alle IDs, die mit dem Anti-V. xanthina-Albumin gewonnen wurden (unten: Spalte xa), mit dem Index multipliziert. Unidirektionale Werte wurden nur spaltenweise korrigiert. Die Abkürzungen sind Tab. 4. zu entnehmen.

Antiseren:

	xa	ra	ll	md	pa	Pp	El
Albumine:							
xa	0	4.5	18.1	30.6	17.2	17.2	64.4
ra	16.1	0	21.0	33.7	16.4	26.1	57.8
ll	23.1	20.0	0	13.4	--	25.3	--
lt	--	--	1.8	13.9	--	--	--
lo	22.7	24.8	2.8	3.2	--	16.8	--
ls	--	--	9.4	7.5	22.7	10.8	60.1
md	28.6	39.6	18.0	0	13.8	12.1	58.0
mm	--	--	--	11.6	--	--	--
pa	11.7	16.7	15.3	20.7	0	22.8	61.2
rr	--	69.3	--	20.1	22.6	32.2	--
rs	37.4	61.9	16.4	19.3	26.5	26.8	--
Pp	28.4	--	--	--	--	0	--
Pf	11.1	25.3	18.4	18.7	23.1	14.2	54.6
Er	45.1	29.5	40.8	33.3	33.2	19.4	69.6
bs	6.6	9.1	--	--	--	--	--
ni	23.9	--	--	43.3	--	39.3	--
aa	39.9	32.4	--	56.2	--	49.9	--
af	--	--	--	40.7	--	28.4	--
ah	--	21.4	--	39.6	36.4	--	55.9
ao	34.7	34.7	29.6	46.5	21.2	--	--
am	25.8	--	15.6	46.6	--	40.9	--
at	--	28.8	6.8	42.7	29.8	31.7	--
El	--	--	64.1	57.4	--	73.2	0
Ep	50.3	61.5	45.6	44.0	--	--	--
Em	53.5	56.4	54.1	72.7	55.7	49.7	--

4.1.2.3. Diskussion der Korrekturen

Bei der Korrektur der Antiseren mußten durchaus stärkere Unterschiede in der Differenzierungsfähigkeit der Antiseren ausgeglichen werden. Besonders das V. mauritanica- und das P. persicus-Antiserum lieferten zu niedrige IDs, die mit den relativ hohen Korrekturfaktoren von 1.80 bzw. 1.81 multipliziert wurden. JOGER (1990a) und SARICH & CRONIN (1976) verwendeten bei der Korrektur ihrer Antiseren ähnlich hohe Korrekturfaktoren wie diejenigen, die hier für die Antiseren gegen die Albumine einiger Viperinae benötigt wurden (Tab. 11.). Die gefundenen Abweichungen der Substitutionsraten der Albumine sind im Hinblick auf die systematischen Gruppierungen uneinheitlich. Eng verwandte Taxa können im Trend übereinstimmen oder stark voneinander abweichen: Zwar wies sowohl das Albumin von V. lebetina als auch das Albumin der nahe verwandten V. mauritanica eine überdurchschnittlich hohe Rate auf, aber schon die Albumine von V. xanthina und der ihr nahe stehenden V. raddei zeigten kein so einheitliches Bild (Tab. 9.). Beide Albumine wiesen eine unterdurchschnittliche Evolutionrate auf, das V. raddei-Albumin wich im Unterschied zum V. xanthina-Albumin allerdings nur sehr wenig vom Durchschnitt ab. Die am weitesten abweichende relative Rate wies Eristicophis mit 12.3 auf. Diese Rate basiert auf unidirektionalen Tests und ist mit der entsprechenden Vorsicht zu interpretieren.

Insgesamt zeigen die Albumine der untersuchten paläarktischen Großvipern keine sehr inhomogene Evolutionsrate. Dieser Sachverhalt spricht für die Existenz der molekularen Uhr.

tabelle 11. Auflistung einiger publizierter Korrekturfaktoren zur Angleichung der unterschiedlichen Differenzierungsfähigkeit der Antiseren (siehe Abschnitt 4.1.2.1.).

Literatur	Korrekturfaktorenextrema	Tiergruppe
CADLE 1984	0.80 / 1.30	Xenodontinae
CADLE 1988	0.82 / 1.28	Caenophidia
BOGER 1990a	0.77 / 1.65	Agamidae
BRIDCH & CRONIN 1976	0.53 / 1.55	Platyrrhina
diese Arbeit	0.84 / 1.81	Viperinae

Die ermittelten Indizes aus durchschnittlicher immunologischer Distanz / gemessener immunologischer Distanz zum is-Albumin wurden als Korrekturfaktoren für die IDs verwendet (Tab. 10.). Dieses Verfahren stellt eine Alternative zu bisherigen, von anderen Autoren (z.B. CADLE 1988) verwendeten dar. CADLE ermittelte zwar die relativen Raten der in ihm untersuchten Albumine, diskutiert diese aber erst im Zusammenhang mit den errechneten Stammbäumen. Durch die Korrektur der ID-Matrices vor der Ermittlung der phylogenetischen Beziehungen können durch unterschiedliche Evolutionsraten verursachte, unrichtige Verzweigungen im Stammbaum ausgeschaltet werden. Dies ist besonders bei der Anwendung hierarchischer Clusteranalysen notwendig. Durch die angewendete Korrektur der unterschiedlichen Raten entsprechen die terminalen Äste der resultierenden Dendrogramme je nach Albumin u.U. nicht der eigentlichen, realen Distanz (immunologischen Distanz). Besonders schnell oder langsam evolvierende Albumine sind somit nicht im Dendrogramm erkennbar, sondern nur durch ihre abweichende relative Rate.

Bei unidirektional getesteten Albuminen konnte die relative Rate nur in wenigen Fällen ermittelt werden. Aufgrund dessen wurden abweichende Evolutionsraten unidirektional getesteter Albumine nicht per Korrekturfaktor korrigiert, sondern erst nach der Erstellung der Dendrogramme diskutiert.

Die durch die Korrektur der unterschiedlichen Differenzierungsfähigkeit der Antiseren deutlich verbesserte Reziprozität der IDs wurde durch die Korrektur abweichender Substitutionsraten nicht weiter verbessert. Ein % s_{rezi} -Wert von 17.1 bzw. eine % Nichtreziprozität von 10.8 müssen als "Methodenrauschen" akzeptiert werden. Diese Werte liegen etwas über denjenigen, die die zur Stammbaumrekonstruktion verwendeten ID-Matrices bei z.B. CADLE (1988), LUTZ et al. (1986) und SARICH & CRONIN (1976) aufweisen.

4.1.3. Eichung der linearen Zeitskala

Da keine größeren Abweichungen der Evolutionsgeschwindigkeiten der untersuchten Albumine festgestellt werden konnten und die beobachteten, vom Durchschnitt leicht abweichenden Raten per Korrekturfaktoren angeglichen wurden, schien eine mit den ermittelten IDs korrelierte lineare Zeitskala möglich.

Die Eichung der Zeitskala erfolgte durch die Datierung der Isolation der ägäischen Kykladeninseln vom Festland. Vor etwa 5-6 Millionen Jahren kam es zu einer großflächigen Austrocknung des Mittelmeeres ("messinian event"; THENIUS 1977). Da in der gesamten Ägäis kaum Wassertiefen von mehr als 2000 m unter NN vorkommen, und speziell im Bereich der Kykladen die Wassertiefen auf den kürzesten Entfernungen zum Festland kaum über 200 m unter NN liegen, scheint eine langandauernde Verbindung zum Festland während dieser Zeit wahrscheinlich. Dies ermöglichte u.a. Schlangen des V. lebetina-Komplexes die Besiedlung einiger dieser Inseln. Gegen Ende der Austrocknungsphase wurden die Inseln und mit ihnen die dort lebenden Schlangenpopulationen isoliert. Aus den geringen heutigen Wassertiefen in diesem Bereich läßt sich schließen, daß die Isolation relativ spät erfolgte. Der letzte gemeinsame Vorfahre der Kykladen-Levanteotter V. lebetina schweizeri und der festländischen V. lebetina-Unterarten (rezente Verbreitung siehe Abb. 18.) muß unge-

fähr gegen Ende des Miozäns und Anfang des Pliozäns gelebt haben und wird daher hypothetisch auf ca. 5 Millionen Jahre datiert.

Die ermittelte immunologische Distanz von V. lebetina schweizeri-Albumin zum Albumin von V. l. lebetina beträgt 9.4 (Tab. 10.). Demzufolge entspricht ein ID von 1.0 ca. 0.5 Millionen Jahren. Dieser Wert diene sowohl zur Eichung der Zeitskala für die per Clusteranalyse erhaltenen Dendrogramme III-VI (Abb. 40.-43.) als auch für Berechnung der Isolationszeiten nach LUTZ et al. (1986; siehe auch Abschnitt 3.12. und Abb. 39.). Die von JOGER (1984, 1985, 1987) ermittelten ID / Zeit - Relationen betragen für Albumine von Vertretern der Gekkonidengattung *Tarentola* 1.0 ID / 1.1 Mill. Jahre und für die Vertreter verschiedener Agamidengattungen 1.0 ID / 0.7 Mill. Jahre. Die für die untersuchten Viperinae-Albumine ermittelte Zeitskala zeigt somit, daß die gleiche immunologische Distanz in kürzerer Zeit erreicht, als JOGER für verschiedene Echsen ermittelte. Eine Erklärung könnte eine im Verhältnis zu Echsen bei den Viperinae generell erhöhte Albuminevolutionsgeschwindigkeit sein. DESSAUER et al. (1987) fanden allerdings, daß die Albumine der von ihnen untersuchten Viperiden konservativ im Vergleich zu Colubriden- und Elapiden-Albuminen reagierten. Sie verwendeten für diese Tests das sehr weit entfernte Anti-Boa-Albumin.

In diesem Zusammenhang sollte nicht vergessen werden, daß sowohl historisch-geologische Geschehnisse als auch Fossilien meist nur sehr ungenau datiert werden können. Die mit diesen Hilfsmitteln geeichten Zeitskalen und errechneten Isolationszeiten sollten entsprechend den dieser Methode anhaftenden Ungenauigkeiten großzügig betrachtet und interpretiert werden.

fähr gegen Ende des Miozäns und Anfang des Pliozäns gelebt haben und wird daher hypothetisch auf ca. 5 Millionen Jahre datiert.

Die ermittelte immunologische Distanz von V. lebetina schweizeri-Albumin zum Albumin von V. l. lebetina beträgt 9.4 (Tab. 10.). Demzufolge entspricht ein ID von 1.0 ca. 0.5 Millionen Jahren. Dieser Wert diente sowohl zur Eichung der Zeitskala für die per Clusteranalyse erhaltenen Dendrogramme III-VI (Abb. 40.-43.) als auch für Berechnung der Isolationszeiten nach LUTZ et al. (1986; siehe auch Abschnitt 3.12. und Abb. 39.). Die von JOGER (1984, 1985, 1987) ermittelten ID / Zeit - Relationen betragen für Albumine von Vertretern der Gekkonidengattung *Tarentola* 1.0 ID / 1.1 Mill. Jahre und für die Vertreter verschiedener Agamidengattungen 1.0 ID / 0.7 Mill. Jahre. Die für die untersuchten Viperinae-Albumine ermittelte Zeitskala zeigt somit, daß die gleiche immunologische Distanz in kürzerer Zeit erreicht, als JOGER für verschiedene Echsen ermittelte. Eine Erklärung könnte eine im Verhältnis zu Echsen bei den Viperinae generell erhöhte Albuminevolutionsgeschwindigkeit sein. DESSAUER et al. (1987) fanden allerdings, daß die Albumine der von ihnen untersuchten Viperiden konservativ im Vergleich zu Colubriden- und Elapiden-Albuminen reagierten. Sie verwendeten für diese Tests das sehr weit entfernte Anti-Boa-Albumin.

In diesem Zusammenhang sollte nicht vergessen werden, daß sowohl historisch-geologische Geschehnisse als auch Fossilien meist nur sehr ungenau datiert werden können. Die mit diesen Hilfsmitteln geeichten Zeitskalen und errechneten Isolationszeiten sollten entsprechend den dieser Methode anhaftenden Ungenauigkeiten großzügig betrachtet und interpretiert werden.

4.1.4. Stammbaumrekonstruktion

4.1.4.1. Stammbaumrekonstruktion nach der Methode von FITCH & MARGOLIASH (1967).

A. Dendrogramm für alle reziproken immunologischen Distanzen.

Die für die Berechnung eines Stammbaumes mit dem Programm FITCH (siehe Abschnitt 3.11.) verwendete Matrix der immunologischen Distanzen ist in Tab. 12. dargestellt. Die IDs der getesteten Albumine wurden in 11 unterschiedlichen, zufällig gefundenen Reihenfolgen zur Berechnung der Dendrogramme eingegeben. Für jedes Eingabemuster wurden zwischen 65 und 81 Bäume erzeugt. Aus diesen wurde jeweils derjenige ausgewählt, der den niedrigsten APSD - Wert aufwies. Sowohl die Verzweigung als auch der niedrigste APSD-Wert (11.7) und der niedrigste F-Wert (7.0) waren in allen 11 Fällen gleich. Dendrogramm I (Abb. 37.) zeigt den gefundenen Stammbaum.

Die ermittelten Astlängen, die unterschiedlichen Evolutionsraten entsprechen, wichen nicht wesentlich voneinander ab. Lediglich der V. palaestinae- und der V. raddei-Ast wiesen etwas kleinere bzw. größere Längen auf. Dabei könnte es sich um abweichende Evolutionsraten handeln, die durch die in Abschnitt 4.1.2.2. durchgeführte Korrektur nicht erfaßt wurden.

Tabelle 12. Matrix der Immundistanzen der reziprok getesteten Albumine und der in Dendrogramm I (Abb. 37.) dargestellten Distanzen. Unten links: Mittelwerte der reziproken Immundistanzen (aus Tab. 6.) (Eingabe, "input"); oben rechts: Differenz zwischen den durch das Dendrogramm I (Abb. 37.) wiedergegebenen Immundistanzen (Ausgabe, "output") und den unten links aufgeführten Eingabe-IDs (siehe auch Abschnitt 3.11.). Abkürzungen wie in Tab. 6.

	xanth.	raddei	lebet.	mauri.	palae.	Pseud.	Echis
xanth.	0	0.0	0.9	6.9	0.4	3.1	0.1
raddei	10.3	0	2.8	10.9	2.7	6.2	3.2
lebet.	20.9	22.1	0	0.0	0.3	2.3	0.5
mauri.	29.6	36.7	14.1	0	2.7	1.6	0.8
palae.	14.5	16.5	19.4	17.3	0	3.8	3.0
Pseud.	18.9	25.8	18.5	15.5	23.1	0	0.3
Echis	57.1	57.5	57.5	57.1	57.5	57.5	0

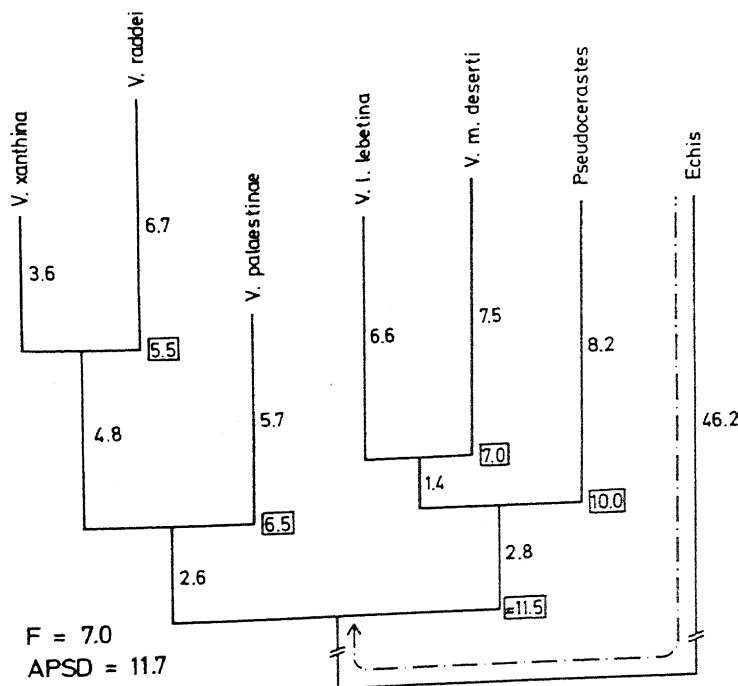


Abb. 37. Dendrogramm I. Nach FITCH & MARGOLIASH (1967) erstelltes Dendrogramm der reziproken immunologischen Distanzen (Tab. 12.). An den Abzweigen befindliche Zahlen sind die errechneten IDs. Der jeweils im Kästchen angegebene Zeitpunkt der Trennung vom letzten gemeinsamen Vorfahren in Mill. Jahren wurde nach der Methode von LUTZ et al. (1986) ermittelt. Die Linie (- - -) verdeutlicht, daß es sich bei der *Echis*-Distanz von 46.2 nicht um die Distanz zum letzten gemeinsamen Vorfahren handelt, sondern um die Distanz zu den Innengruppen-Taxa (siehe Abschnitt 3.11., "unrooted").

Beim Vergleich der zur Stammbaumrekonstruktion verwendeten immunologischen Distanzen (Eingabe, "input") und der vom

Dendrogramm I (Abb. 37.) wiedergegebenen immunologischen Distanzen (Ausgabe, "output") fällt vor allem die Differenz von Eingabe-Ausgabe-IDs bei den Artenpaaren V. xanthina-V. m. deserti (6.9) und V. raddei-V. m. deserti (10.9) auf (Tab. 12.).

Die Isolationszeiten der untersuchten Taxa wurden nach der Methode von LUTZ et al. (1986) bestimmt (siehe Abschnitt 3.12.) und sollen erst später im Zusammenhang mit den durch andere Methoden ermittelten Isolationszeiten diskutiert werden.

B. Nachträgliche Einfügung unidirektional getesteter Albumine.

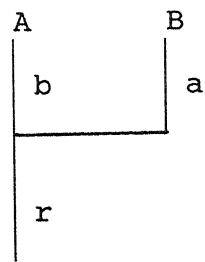
Zur Anwendung der von BEVERLEY & WILSON (1982) beschriebenen Methode der nachträglichen Einordnung der unidirektional getesteten Taxa benötigt man ein Rahmendendrogramm (Abschnitt 3.11.). Zu diesem Zwecke wurde Dendrogramm I (Abb. 37.) verwendet. Für die nachträglich einzufügenden Taxa wurden die F-Werte verschiedener alternativer Abzweige im Rahmendendrogramm errechnet (Tab. 13.). Unter Berücksichtigung der F-Werte und der z.Z. gebräuchlichen Systematik wurde jeweils ein Abzweig ausgewählt, wie in den folgenden Absätzen im einzelnen dargelegt werden soll. Die ausgewählten Abzweige im Rahmendendrogramm sind in Dendrogramm II (Abb. 38.) dargestellt.

Tabelle 13. Berechnung alternativer, nachträglich in Dendrogramm I (Abb. 37) eingefügter Abzweige der unidirektional getesteten Albumine nach der Methode von BEVERLEY & WILSON (1982). Die in Dendrogramm II (Abb. 38.) dargestellten Abzweige sind durch unterstrichene F-Werte gekennzeichnet. Wurden negative Astlängen errechnet, sind diese Verzweigungsalternative aus.

Art / Unterart	Anzahl der Tests	Abzweig ^a	Astlängen ^b			F-Wert ^c
			a	b	r	
<u>V. berus-aspis-</u> <u>ammodytes-Gruppe</u>	7	xa - A	19.4	6.8	-3.2	
		ra - A	17.8	7.4	-0.7	
		pa - C	20.7	8.3	-2.6	
		ll - B	15.4	2.0	4.6	11.6
		A	19.0			<u>9.3</u>
		C	18.9			10.6
		E	20.4			11.2
		A - C	15.7	10.0	0.0	11.1
		C - E	19.1	7.7	-1.2	
<u>V. lebetina schweizeri</u>	5	ll - B	4.5	4.9	1.7	<u>7.8</u>
		md - B	4.1	5.4	2.1	7.7
		B	5.6			8.2
		B - D	5.6	5.3	3.2 ^d	
<u>V. russelli</u> ^e	6	ll - B	14.9	-1.2	4.8	
		md - B	16.9	2.8	4.7	11.7
		Pp - D	20.9	8.6	-0.4	
		pa - C	19.9	4.7	1.0	15.2
		B	14.8			12.3
		C	29.1			17.5
		D	16.6			<u>13.0</u>
		E	20.7			14.2
		B - D	18.2	-0.1	1.5	
		C - E	34.5	13.6	-11.0	
D - E	22.0	1.8	1.0	13.9		
<u>E. macmahoni</u>	7	Pp - D	17.9	1.5	6.7	<u>8.3</u>
		ra - A	21.7	7.8	-1.1	
		A	26.4			13.8
		B	24.1			10.2
		D	21.3			10.6
		E	23.6			10.8
		B - D	23.7	11.0	-9.6	
		D - E	22.6	6.9	-4.1	

^d Die Großbuchstaben A bis E beziehen sich auf die in Dendrogramm II (Abb. 38) dargestellten Verzweigungen. Die verwendeten Abkürzungen sind Tab. 4. zu entnehmen.

^b Die folgende Skizze verdeutlicht beispielhaft die bei nachträglicher Einfügung des Taxons B errechneten Äste:



^c F - Wert nach PRAGER & WILSON (1978). Siehe auch Abschnitt 3.11. ("goodness of fit").

^d Da die Länge des Astes B - D nur 1.4 beträgt und bei der Subtraktion von 3.2 eine Länge von -1.8 entstehen würde, wurde der Wert wie ein negativer Wert behandelt.

^e Die ermittelten Werte für die Unterarten V. r. russelli und V. r. siamensis wurden gemittelt.

Beim Versuch, den Abzweig der V. berus-aspis-ammodytes-Gruppe zu ermitteln, wurden die niedrigsten F-Werte erwartungsgemäß auf der Strecke A bis E gefunden (Dendrogramm II, Abb. 38.). Der Abzweig zwischen den Punkten C und E ergab eine negative r-Länge (Über a-, b- und r-Längen siehe Tab. 13.) und mußte ausgeschieden werden, obwohl diese Verzweigung in den mit hierarchischen Clusteranalysen ermittelten Dendrogrammen IV und VI (Abb. 40. u. 42.) errechnet wurde. Der niedrigste F-Wert wird durch einen Abzweig von A erhalten (9.3). Der nächstbeste Abzweig liegt am Punkt C und weist einen F-Wert von 10.6 auf. Da weder der A- noch der C-Abzweig durch andersartige Ergebnisse oder die z.Z. anerkannte Systematik besonders gestützt werden, wurde die A-Alternative ausschließlich aufgrund des niedrigen F-Wertes ausgewählt. Diese Verzweigung ergibt sich zwar durch den hier angewendeten Formalismus, entspricht aber wahrscheinlich nicht der Realität (Abschnitt 3.11.). Auffallend ist ebenfalls der extrem hohe Wert des b-Astes von 19.0.

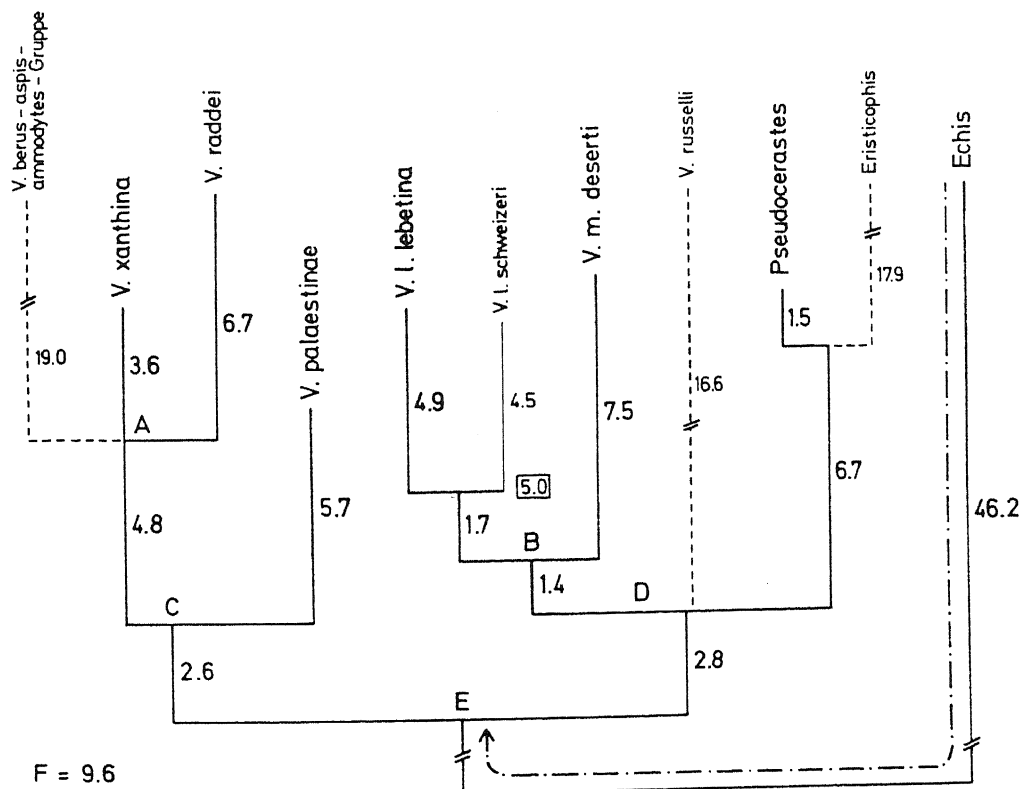


Abb. 38. Dendrogramm II.

Wie Dendrogramm I, aber unter zusätzlicher Berücksichtigung der unidirektionalen immunologischen Distanzen (Tab. 10.). Sie wurden nach der Methode von BEVERLEY & WILSON (1982) in den durch Dendrogramm I vorgegebenen Rahmen eingefügt (dünner gezeichnete Äste). Gestrichelte Äste kennzeichnen deutlich von der durchschnittlichen Astlänge abweichende IDs. Die im Kästchen angegebene Zahl ist die Zeit seit der Isolation von V. l. schweizeri in Mill. Jahren. Großbuchstaben befinden sich an für die Berechnung relevanten Verzweigungen (siehe Tab. 13.).

Die Einfügung von V. l. schweizeri bereitete wenig Schwierigkeiten. Die niedrigsten F-Werte wurden für die Äste vom zu V. l. lebetina (7.8) und zu V. m. deserti (7.7) führenden Ast errechnet. Mit Rücksicht auf die derzeitige Eingliederung von schweizeri zu V. lebetina wurde hier die Abzweigungsalternative vom V. l. lebetina - Ast gewählt. Die für diesen Ast neu berechneten Äste a und b entsprachen sich mit 4.5 bzw. 4.9 gut.

V. russelli wurde an Punkt D im Dendrogramm II angeschlossen. Die Äste von B und V. m. deserti-B wiesen

niedrigere F-Werte auf. Diese Alternativen werden weder in den mittels Clusteranalyse erstellten Dendrogrammen IV und VI (Abb. 40. u. 42.), noch durch andere Autoren gestützt und versprechen somit keine realistische Darstellung der evolutiven Geschehnisse. Wie schon beim Abzweig der V. berus-aspis-ammodytes-Gruppe weist auch hier der a-Ast eine unwahrscheinlich große Länge von 16.6 auf.

Der Abzweig von Eristicophis vom Pseudocerastes-D-Ast wies mit Abstand den niedrigsten F-Wert von 8.3 auf. Ähnlich wie bei den Abzweigen von V. russelli und der V. berus-aspis-ammodytes-Gruppe waren die Distanzen der neu errechneten Äste a und b sehr diskrepant (a: 17.9, b: 1.5).

Insgesamt lieferte die Methode von BEVERLEY & WILSON durchaus brauchbare Ergebnisse. Die Abzweigung der V. berus-aspis-ammodytes-Gruppe und die a-Astlängen in den Fällen Eristicophis, V. russelli und der V. berus-aspis-ammodytes-Gruppe erscheinen allerdings sehr unwahrscheinlich. Solche extrem diskrepanten Astlängen sind auch im Hinblick auf das mit reziproken IDs gewonnene Dendrogramm I nicht zu erwarten und müssen daher der von BEVERLEY & WILSON erarbeiteten Methode angelastet werden.

Der F-Wert für das gesamte Dendrogramm II beträgt 9.6, was eine Erhöhung um 2.6 relativ zum Dendrogramm I bedeutet.

4.1.4.2. Stammbaumrekonstruktion durch hierarchisches Zusammenfassen ("Clusteranalyse").

A. Dendrogramme für alle reziproken immunologischen Distanzen.

Die in Tab. 12. (unten links) aufgeführten reziproken IDs wurden durch hierarchisches Zusammenfassen jeweils zueinander nächster Distanzen zu einem Dendrogramm verrechnet (siehe Abschnitt 3.11.). Führt man dieses Verfahren sehr strikt den ID-Werten folgend durch, so erhält man das in Abb. 39. dargestellte Dendrogramm III. Da aber die V. palaestinae betreffenden Distanzen nur geringfügige Unterschiede in ihrer Entfernung zur V. xanthina-raddei- und zur V. lebetina-mauritanica-Gruppe zeigten, war eine eindeutige Zuordnung von V. palaestinae zu einer der beiden Gruppen nicht zweifelsfrei möglich. Deshalb wurde für beide Alternativen je ein Dendrogramm errechnet (Dendrogramm III u. IV, Abb. 39. u. 40.).

Eine Matrix der sich durch beide Dendrogramme ergebenden Differenzen zwischen Eingabe- und Ausgabe-Werten ist in Tab. 14. dargestellt. Auffallend ist die in beiden Fällen auftretende große Differenz der Eingabe-Ausgabe-IDs des Artenpaares V. raddei - V. m. deserti mit 12.9 (Dendrogramm III) bzw. 13.6 (Dendrogramm IV). Für das Dendrogramm IV wurde ebenfalls eine schlechte Übereinstimmung für die V. xanthina - V. palaestinae - ID ermittelt (8.6).

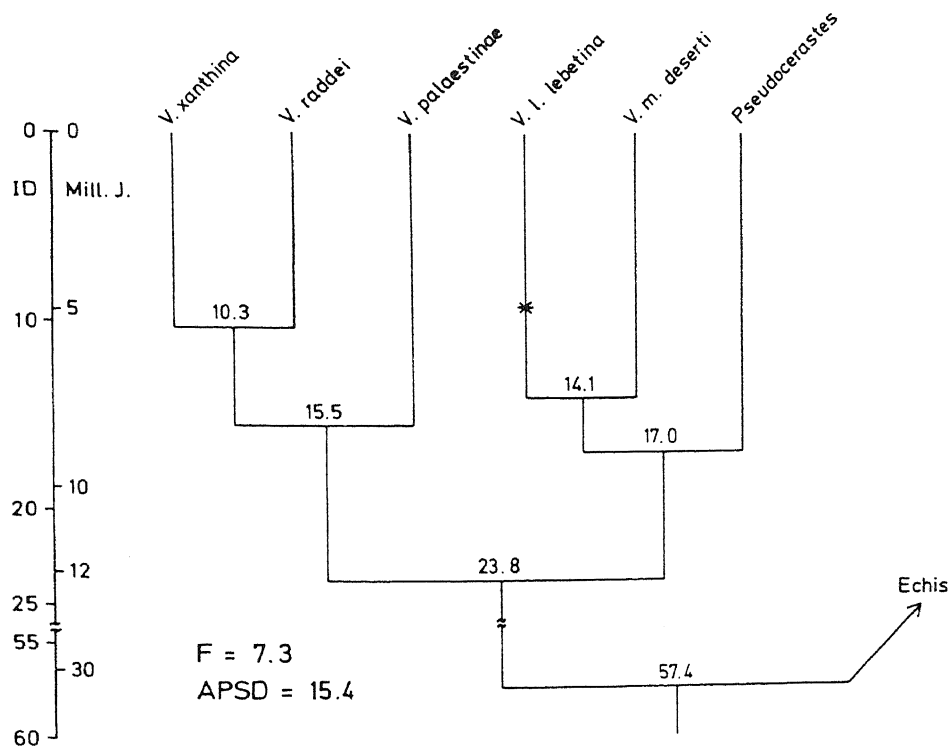


Abb. 39. Dendrogramm III.

Dieses Dendrogramm wurde mit einer Clusteranalyse für die reziproken immunologischen Distanzen (Tab. 12. u. 14.) ermittelt. V. palaestinae wurde mit der xanthina-raddei-Gruppe zusammengefaßt. Der Stern kennzeichnet den Eichpunkt der Zeitskala unter der Annahme der Separation von V. l. schweizeri vor ca. 5 Mill. Jahren (siehe Abschnitt 4.1.3.).

Tabelle 14. Matrix der Differenzen zwischen den in Tab. 12. aufgeführten Eingabe - IDs ("input") und den durch Dendrogramm III (unten links) und V (oben rechts) wiedergegebenen Ausgabe-IDs ("output"). Abkürzungen wie in Tab. 6.

Album.:	<u>Antiseren:</u>						
	xanth.	raddei	lebet.	mauri.	palae.	Pseud.	Echis
xanth.	0	0.0	2.2	6.5	8.6	4.2	0.3
raddei	0.0	0	1.0	13.6	6.6	2.7	0.1
lebet.	2.9	1.7	0	0.0	1.1	0.5	0.1
mauri.	5.8	12.9	0.0	0	1.1	3.5	0.3
palae.	1.0	1.0	4.4	6.5	0	4.1	0.1
Pseud.	4.6	2.3	1.5	1.5	0.4	0	0.1
Echis	0.3	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0

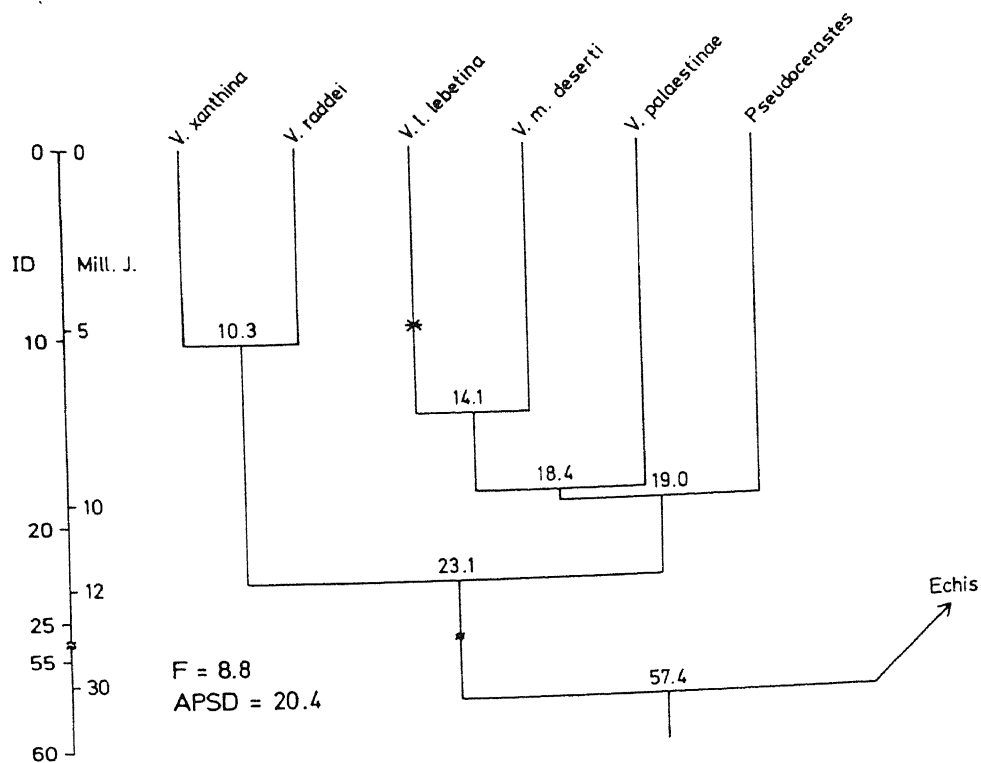


Abb. 40. Dendrogramm IV.
Wie Dendrogramm III, mit der Ausnahme, daß *V. palaestinae* mit der lebetina-mauritanica-Gruppe zusammengefaßt wurde.

Der F-Wert für Dendrogramm III beträgt 7.3 (APSD 15.4), derjenige für Dendrogramm IV beträgt 8.8 (APSD 20.4).

B. Dendrogramme für alle reziproken und unidirektionalen immunologischen Distanzen.

Für die durch Clusteranalysen erhaltenen Dendrogramme V und VI (Abb. 41. u. 42.) wurden ebenfalls die unter A. beschriebenen (siehe oben) Alternativen der *V. palaestinae*-Einordnung im Dendrogramm durchgeführt.

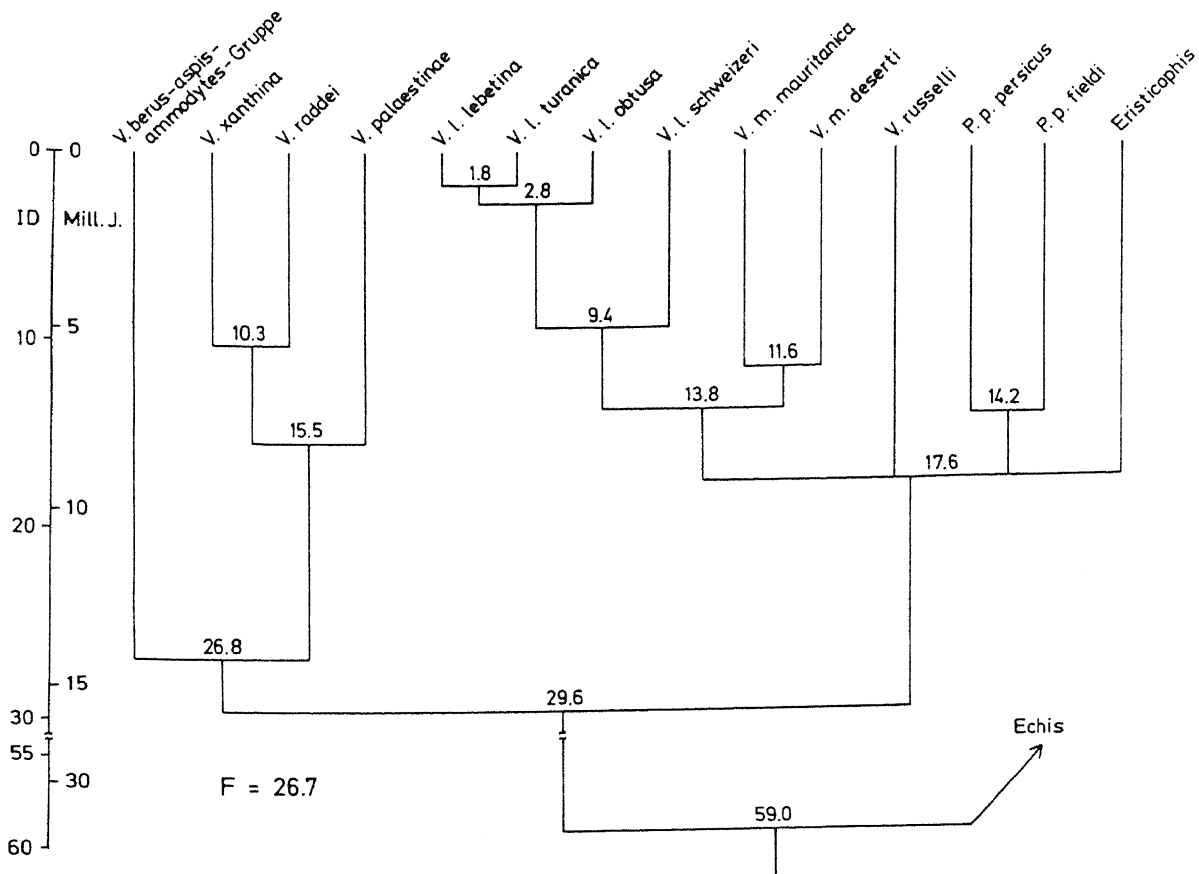


Abb. 41. Dendrogramm V.

Wie Dendrogramm III, aber unter Berücksichtigung aller reziproken und unidirektionalen immunologischen Distanzen (Tab. 10.).

Die in den Dendrogrammen V und VI vorkommenden Verzweigungen, die eine immunologische Distanz von etwa 1.0 oder weniger aufweisen, sind unter Berücksichtigung der Genauigkeit der verwendeten immunologischen Methoden nicht mit ausreichender Sicherheit zu unterscheiden. Deshalb könnte man in beiden oben genannten Dendrogrammen die Verzweigung der *V. lebetina*-Unterarten *lebetina*, *turanica* und *obtusa* ebensogut durch eine Trichotomie mit der mittleren immunologischen Distanz von 2.3 darstellen. Auch die Abzweige von *V. palaestinae* und *V. russelli* in Dendrogramm VI liegen an der Grenze der methodischen Genauigkeit und

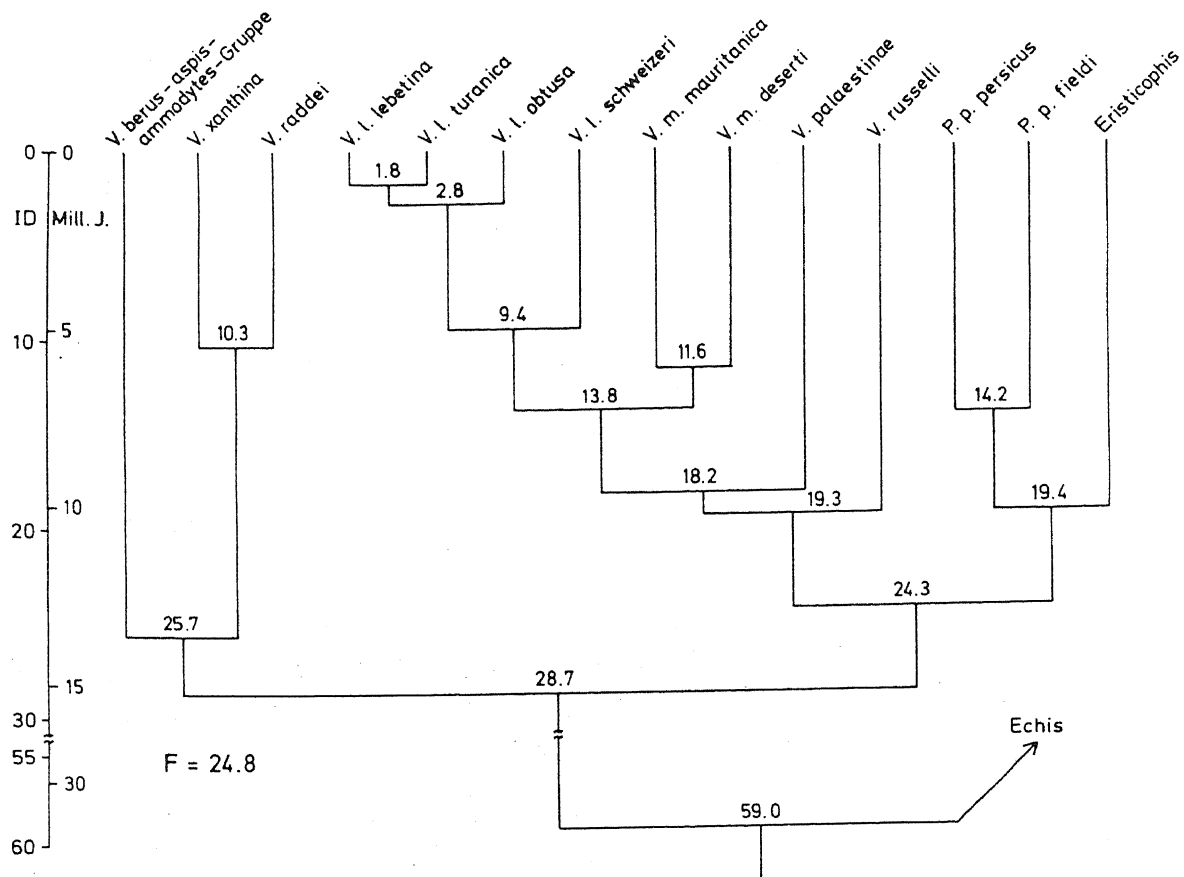


Abb. 42. Dendrogramm VI.

Wie Dendrogramm V, aber mit der Ausnahme, daß V. palaestinae mit der lebetina-mauritanica-Gruppe zusammengefaßt wurde.

könnten zusammengefaßt werden. Die dadurch entstehende Trichotomie würde einen ID von 18.8 zwischen V. palaestinae, V. russelli und der V. lebetina-mauritanica-Gruppe aufweisen. Dendrogramm V beinhaltet einen "Viererabzweig", der die V. lebetina-mauritanica-Gruppe, V. russelli, Pseudocerastes und Eristicophis bei einem ID von 17.6 verbindet.

Die Übereinstimmung der Eingabe- und Ausgabe-IDs war hier im Unterschied zu den Dendrogrammen III und IV, für das Dendrogramm VI ($F = 24.8$) mit der Zuordnung von V. palaestinae zur V. lebetina-mauritanica-Gruppe etwas besser als zu der durch Dendrogramm V ($F = 26.7$) gezeigten Alternative.

4.2. Elektrophoretische Ergebnisse

Um immunologische Ergebnisse zu stützen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Elektropherogramme lediglich für die in der neueren Literatur (KRAMER & SCHNURRENBERGER 1959, JOGER 1984, HERRMANN et al. 1987, NILSON & ANDREN 1988) kontrovers behandelten Vertreter der V. lebetina s.l.-Gruppe angefertigt.

Es sollte bedacht werden, daß Elektropherogramme ohne spezifische Anfärbung der sichtbaren Banden und damit ohne zweifelsfreie Homologisierung der beteiligten Proteine nur Hilfscharakter für die Deutung mittels anderer Methoden erworbener phylogenetischer Vorstellungen haben können (JOGER 1984, S. 204 u. 234). Lediglich für die Albuminbanden erfolgte eine eindeutige Homologisierung (Abb. 43.).

Bei der Interpretation der Elektropherogramme wurde den anodennahen Banden größere Bedeutung zugestanden als den im kathodischen Bereich zu findenden Banden (HEIMES 1982, JOGER 1984).

4.2.1. Interspezifische Variabilität

Bei der Betrachtung des in Abb. 43. gezeigten Elektropherogrammes fällt sofort die relativ große Unterschiedlichkeit des Bandenmusters zwischen V. lebetina und V. mauritanica auf. Die Banden a₁₋₃ charakterisieren V. lebetina, die Banden c₁₋₇ sind nur bei V. mauritanica zu finden.

Die Bande d fällt als gemeinsame Bande von V. mauritanica und V. l. schweizeri aus dem bisher dargestellten Rahmen. Aus den in Abschnitt 4.2. genannten Gründen sollte diese Bande allerdings nicht als Synapomorphie betrachtet werden.

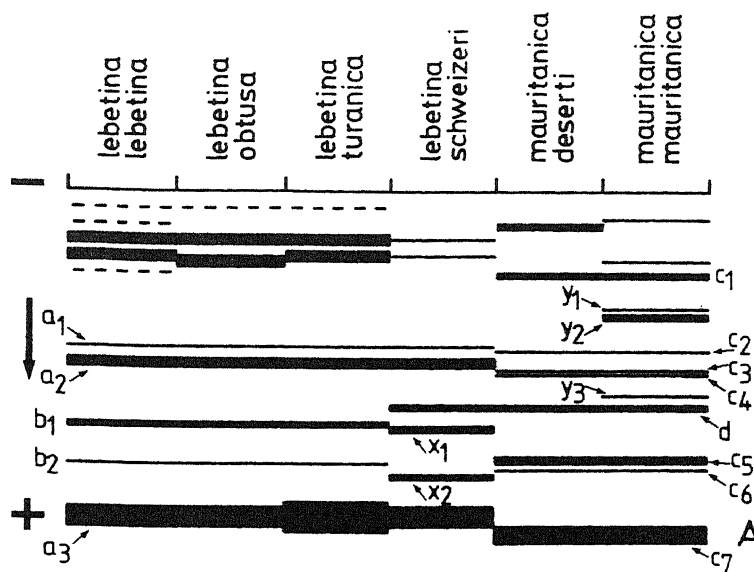


Abb. 37. Elektropherogramm der Serumproteine der V. lebetina- und V. mauritanica-Unterarten. Die gezeichnete Stärke der Banden entspricht der visuell wahrnehmbaren Stärke. Gestrichelte Banden waren nur undeutlich zu erkennen. Abkürzungen:

- A: Albumin
- a₁₋₃: lebetina - spezifische Banden
- b₁₋₂: l. lebetina - l. turanica - l. obtusa - spezifische Banden
- c₁₋₇: mauritanica - spezifische Banden
- d: mauritanica - l. schweizeri - spezifische Bande
- x₁₋₂: l. schweizeri - spezifische Banden
- y₁₋₃: m. mauritanica - spezifische Banden

4.2.2. Intraspezifische Variabilität

Innerhalb der Art V. lebetina zeigten sich bezogen auf die Unterarten lebetina, obtusa und turanica nur im kathodischen Bereich der Pherogramme kleinere Unterschiede, die hier aus den in Abschnitt 4.2. genannten Gründen keine weitere Beachtung fanden (Abb. 43.). Die Banden b₁₋₂ waren nur den letztgenannten Unterarten zueigen und fehlten schweizeri. Dieses Taxon wies dafür zwei andere Banden (x₁₋₂) auf und hatte eine gemeinsame Bande (d) mit V. mauritanica.

Die beiden Unterarten von V. mauritanica wichen vor allem durch die nur bei m. mauritanica zu findenden Banden Y₁₋₃ auf. Die andere Unterart m. deserti besitzt im anodischen Bereich keine nur ihr eigenen Banden.

4.3. Diskussion der serologischen Ergebnisse.

Wie schon in Abschnitt 4.1.4.2.A. angedeutet, zeigt das Albumin von V. palaestinae keine eindeutige, immunologisch feststellbare, Nähe zu den Albuminen anderer Vipera-Gruppen (Tab. 12., unten links). Zur xanthina-raddei-Gruppe weist palaestinae eine immunologische Distanz von 15.5, zur lebetina-mauritanica-Gruppe eine von 18.4 auf. Der Unterschied von 2.9 immunologischen Distanzen ist im Vergleich zu den Distanzen zwischen den beiden Gruppen (durchschnittlich 27.3) viel zu niedrig. Aufgrund dieser Tatsache ist eine mögliche Konvergenz der Albumine zwischen einer Art aus den oben genannten Gruppen und palaestinae nicht auszuschließen. Im folgenden wurden alle palaestinae betreffenden Distanzen mit Hilfe der von JOGER (1990b) genannten Methoden zur Überprüfung von Konvergenzen bei immunologischen Distanzdaten getestet.

Zunächst erfolgte die Überprüfung durch die sogenannte Dreiecksungleichung ("triangle inequality test"). Dabei wird die Summe der IDs zweier beliebiger Albumine A und B zum Albumin C ermittelt. Die Summe muß größer oder gleich dem ID zwischen A und B sein ($AC + BC \geq AB$). JOGER verschärft diese Ungleichung, indem er die Formel folgendermaßen abändert: $AC + BC \gg AB$. Führt man diesen Test für alle palaestinae-Kombinationen durch, so trifft diese "verschärfte" Ungleichung fast überall zu. Ausnahmen sind die Ungleichungen palaestinae - xanthina (14.5) + palaestinae - mauritanica (17.3) > xanthina - mauritanica (29.6) und palaestinae - raddei (16.5) + palaestinae - mauritanica (17.3) < raddei - mauritanica (36.7). Die beobachtete Abweichung von der JOGERSchen Dreiecksungleichung läßt eine

Konvergenz des palaestinae-Albumins mit den Albuminen von entweder xanthina und raddei oder mauritanica vermuten.

Als weiterer Konvergenztest wurde der Test auf gleichsinnige funktionelle Adaptation durchgeführt. Hierfür ist wichtig, daß das Albumin aufgrund seiner physiologischen Funktion der Konstanthaltung des osmotischen Druckes im Blut Trockenheitsanpassungen zeigen kann. Nach DESSAUER (1974) sind die Serumalbumine von Wüstenreptilien stärker negativ geladen als diejenigen von in feuchteren Gebieten lebenden Reptilien. Vergleicht man die IDs dreier Taxa, von denen zwei in ihrer Ökologie ähnliche Ansprüche und niedrige IDs zueinander aufweisen, aber trotzdem eine dieser beiden Arten ebenfalls einen niedrigen ID zur dritten, ökologisch differenten Art aufweist, so liegt der Verdacht auf konvergente bzw. parallele funktionelle Adaptation der beiden ökologisch ähnlichen Arten nahe. Leider gibt es keine sehr großen Unterschiede bezüglich der Habitatfeuchtepräferenzen der hier in Frage stehenden Arten. Allerdings erwähnen EISELT & BARAN (1970), BRODMANN (1987) und GRUBER (1989) das Vorkommen von V. xanthina in Wassernähe, wie z.B. in Bachtälern oder auf feuchten Bergwiesen. Derartige Präferenzen wurden für die Taxa palaestinae und mauritanica nicht beschrieben. Für palaestinae nennen MENDELSSOHN (1963) und DISI (1985) vor allem mediterrane Eichenwälder. V. mauritanica lebt nach Angaben von KRAMER & SCHNURRENBERGER (1963), BRODMANN (1987) und GRUBER (1989) an felsigen Hängen mit Gebüsch und Felsspalten, in denen sie sich tagsüber aufhält. Zusammenfassend läßt sich eine größere Ähnlichkeit der Habitate von palaestinae und mauritanica annehmen. In Tab. 15. sind die verglichenen IDs der Arten V. xanthina, V. palestinae und V. mauritanica aufgeführt. Aufgrund der oben genannten Argumente muß von einer konvergenten Entwicklung der palaestinae- und mauritanica-Albumine ausgegangen werden, die durch die Anpassung an relativ trockene Habitate erfolgte.

Tabelle 15. Immunologische Distanzen der Albumine dreier Vipera-Arten mit unterschiedlichen Habitatfeuchtigkeitspräferenzen (siehe Abschnitt 4.3.).

Art	Habitat	Art	Habitat	ID
<u>palaestinae</u>	trocken	<u>xanthina</u>	feucht	14.5
<u>palaestinae</u>	trocken	<u>mauritanica</u>	trocken	17.3
<u>xanthina</u>	feucht	<u>mauritanica</u>	trocken	29.6

Eine dritte Möglichkeit, Hinweise auf eventuell konvergent entstandene Ähnlichkeiten zweier Albumine zu erhalten, besteht nach JOGER in der Anwendung des "Prinzips der wechselseitigen Erhellung" (nach Hennig). Dabei wird versucht, anhand voneinander unabhängiger Merkmalskomplexe Beziehungen zwischen den untersuchten Taxa zu ermitteln und konvergente Entwicklungen einzelner Merkmale im Vergleich mit anderen Merkmalen zu erkennen. Da die immunologische Distanz zwischen Albuminen völlig unabhängig von morphologischen, anatomischen oder osteologischen Merkmalen ist, können die meisten konventionell erworbenen Vorstellungen der phylogenetischen Beziehungen der paläarktischen Großvipern zum Vergleich herangezogen werden. WERNER (1938) beschrieb die vorher meist unter xanthina geführte Palästina-viper als eigene Art. Sie schien ihm aufgrund abweichender Kopfzeichnung, höherer Ventralia- und Subcaudaliawerten und durch die unterschiedliche Lebensweise (xanthina: vorwiegend Gebirgsform, palaestinae: vorwiegend in niedrigeren Höhenlagen) deutlich von xanthina verschieden und eher V. russelli ähnlich. Trotz der WERNERSchen Aufwertung von palaestinae zählt MERTENS (1951) dieses Taxon ohne Nennung von Gründen auch weiterhin auf Unterartniveau zu xanthina. In der von GROOMBRIDGE (1980) durchgeführten phylogenetischen Analyse sind palaestinae und russelli monophyletisch. Dieses Monophylum zeichnet sich durch die synapomorphe Ausbildung der Kopfzeichnung, Form und Zahl der Nasalia und die Reduktion der Peritonealpigmentierung aus. Bei allen drei Merkmalen besitzt russelli die jeweils extremste Ausprägung innerhalb der Gattung Vipera, während palaestinae eine eher vermittelnde Stellung zwischen russelli und den

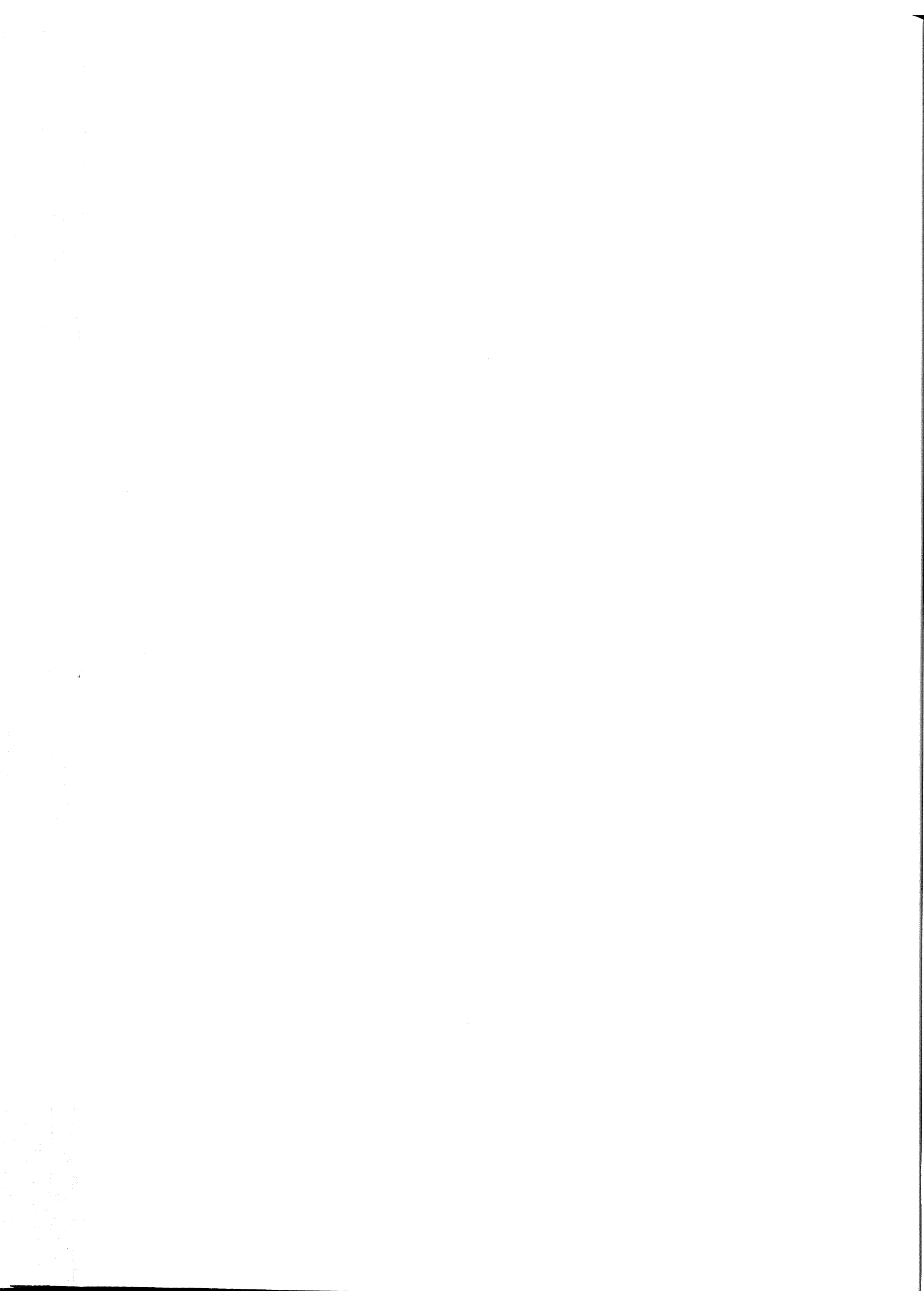
anderen Vipera-Arten inne hat. Andere, phylogentisch besonders aussagekräftige Merkmalskomplexe wie z.B. die Hemipenes (BÖHME 1988), zeigen nach GROOMBRIDGE keine besonderen, für russelli und palaestinae synapomorphen Ausprägungen, obwohl der russelli-Hemipenis besonders autapomorphe Merkmale aufweist. Die Skelettmorphologie der beiden Formen weist nach SZYNDLAR (1987b) große Unterschiede auf. JOGER (1984) plaziert palaestinae trotz seiner Kenntnis von GROOMBRIDGES Ergebnissen in der xanthina-Gruppe. HERRMANN et al. (1987) ermittelten immunologische Distanzen, die eine größere Nähe von palaestinae zu lebetina wahrscheinlich machten. Aufgrund der genannten sehr differenten Einordnung von palaestinae im System der paläarktischen Großvipern ergeben sich mit Hilfe des "Prinzips der wechselseitigen Erhellung" keine konkreten Hinweise auf die oben angedeutete Konvergenz. Bemerkenswert ist allerdings, daß palaestinae mehrfach der xanthina-Gruppe zugerechnet wurde.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aller drei Konvergenztests ist eine konvergente Entwicklung der Albumine von V. palaestinae und V. mauritanica möglich. Aufgrund dieser Ähnlichkeit und dem dadurch verursachten niedrigen palaestinae-mauritanica-ID, ergaben sich für die beiden Hauptlinien in den Dendrogrammen I, II, III, V und VII (Abb. 37.-40. u. 42.) zu niedrige Distanzen. So verzweigen sich die Hauptlinien in Dendrogramm III (Abb. 39.) bei einem ID von 24.6 (etwa 13 Mill. Jahre), wenn man bei der Berechnung des Verzweigungspunktes den palaestinae-mauritanica-ID unberücksichtigt läßt. Die engeren Beziehungen von palaestinae mit der xanthina-Gruppe werden ebenfalls durch die bessere Übereinstimmung der reziproken Eingabe-Ausgabe-IDs (F- und APSD-Werte, Dendrogramme III und IV, Abb. 39. u. 40.) und durch die Auswahl dieses Verzweigungsmusters durch das Programm FITCH (nach der Methode von FITCH & MARGOLIASH (1967), Dendrogramm I, Abb. 37.) gestützt. Für die unter Einbeziehung der unidirektionalen IDs errechneten Stammbäume ergibt sich ein etwas besserer F-Wert für Dendrogramm VI (Abb. 42.), welches palaestinae vom

zur lebetina-Gruppe führenden Ast abzweigt. Da die unidirektionalen Werte aber mit erheblichen Unsicherheiten belastet sein können (siehe Abschnitt 4.1.2.), darf diese Alternative nicht überbewertet werden.

In Dendrogramm VII (Abb. 44.) wurde versucht, die Ergebnisse aus den Dendrogrammen I, II, III und V in einem "Konsensusdendrogramm" darzustellen.

Die Verzweigungsstelle der beiden Taxa xanthina und raddei ist in allen ermittelten Dendrogrammen gleich und liegt bei einer immunologischen Distanz von ca. 10. Dies befindet sich in Einklang mit den Ergebnissen von GROOMBRIDGE (1980), NILSON & ANDREN (1986) und HERRMANN et al. (1987).



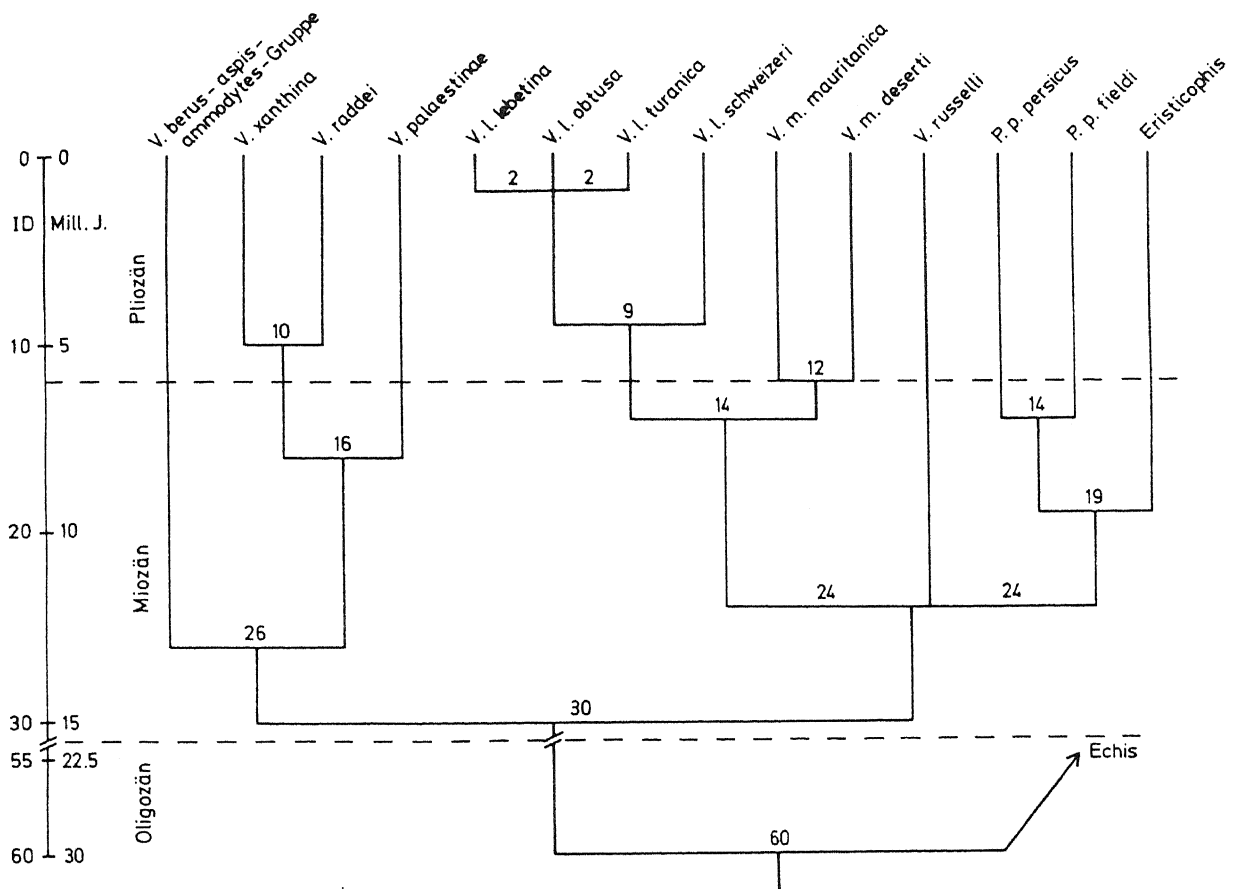


Abb. 44. Dendrogramm VII.

Konsensusdendrogramm der in den Dendrogrammen I-IV dargestellten phylogenetischen Beziehungen. Ermittelte immunologische Distanzen sind als ganze Zahlen dargestellt (Dezimalzahlen auf- bzw. abgerundet). Verzweigungspunkte, deren Distanz nicht größer als 1.0 war, wurden zu Trichotomien zusammengefaßt. Zeitskala wie in Dendrogramm III.

Das Schwestertaxon der xanthina-raddei-Gruppe ist palaestinae (siehe oben). Aufgrund der hohen Distanz von ca. 16 scheint der Artstatus gesichert. Die Position von palaestinae im hier vorgezeichneten System steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von GROOMBRIDGE und HERRMANN et al.. Dennoch scheint diese Position aufgrund der gewonnenen IDs und der möglichen Albuminkonvergenz zwischen palaestinae und mauritanica gerechtfertigt. Bei den von GROOMBRIDGE aufgeführten synapomorphen palaestinae-russelli-Merkmalen handelt es sich in allen Fällen nicht um eindeutig gleichwertige Ausprägungen der Merkmale, sondern

um eine graduelle Abstufung derselben. Daher scheint eine konvergente Entwicklung möglich. Für Zeichnungselemente sind ohnehin häufig auftretende Konvergenzen bekannt (z.B. Zickzackmuster vieler Kleinvipern). Den von HERRMANN et al. gefunden Ergebnissen lagen im Vergleich zu der hier vorliegenden Arbeit viel weniger Einzelmessungen immunologischer Distanzen zugrunde, was die Gefahr, durch einzelne abweichende Werte zu Fehlinterpretationen zu gelangen, erhöht. Diese Einschränkung ist allerdings von sehr allgemeiner Natur und nur sehr begrenzt zur Erklärung der Diskrepanz geeignet. Die xanthina-raddei-Gruppe und palaestinae bilden somit eine monophyletische Gruppe, die schon von MERTENS (1951), allerdings mit abweichender Einordnung der Taxa innerhalb des Monophylums, erkannt wurde.

Die Kleinvipern der berus-aspis-ammodytes-Gruppe (Pelias- und Rhinaspis-Gruppe sensu OBST (1983)) weisen in allen generierten Dendrogrammen eine größere Nähe zur xanthina-raddei-Gruppe auf, als diese zum Rest der paläarktischen Großvipern. Der Abzweig der untersuchten Kleinvipern liegt bei einem ID von ca. 26. Lediglich in Dendrogramm II ergibt sich ein etwas anderer Abzweig. Dieser belegt allerdings ebenfalls den monophyletischen Status zwischen der xanthina-raddei-Gruppe, palaestinae und der Kleinviperngruppe.

Die lebetina-Unterarten lebetina, obtusa und turanica weisen sowohl albuminimmunologisch als auch bezüglich des Serumproteinelektropherogrammes große Ähnlichkeit auf.

V. l. schweizeri hat, wie durch die mit beiden Methoden gewonnenen Ergebnisse gezeigt wird, eine erheblich größere Distanz zu den anderen lebetina-Unterarten. Die große immunologische Distanz von über 9 und die zusätzlich im Serumproteinmuster auftretende Bande sprechen für eine artliche Separation dieses Taxons. NILSON & ANDREN (1988) führen schweizeri bereits als selbständige Art.

Die beiden mauritanica-Unterarten sind durch relativ große Unterschiede gekennzeichnet. Die immunologische Distanz zwischen ihnen beträgt ca. 12, elektrophoretisch unterscheiden sie sich durch mehrere Banden (siehe Abschnitt 4.2.2.). Insgesamt ist die Distanz zwischen ihnen noch größer, als die zwischen schweizeri und den restlichen lebetina-Unterarten. Auch hier ist eine artliche Verschiedenheit möglich. Die Arealgrenzen der beiden Formen sind nach wie vor nicht genau bekannt (NILSON, pers. Mitteilung), so daß ein sympatrisches Vorkommen nicht ausgeschlossen werden kann.

V. russelli weist eine relativ große Distanz zur lebetina-mauritanica-Gruppe auf. Diese Art zeigt, verglichen mit anderen Vipera-Arten, große Unterschiede bezüglich osteologischer Merkmale im Wirbelbereich (SZYNDLAR, pers. Mitteilung). Sie verzweigt sich gemeinsam mit der lebetina-mauritanica-Gruppe und der Pseudocerastes-Eristicophis-Gruppe bei einer immunologischen Distanz von ca. 24. Dieses Monophylum entspricht mit Ausnahme der Exklusion von palaestinae der von GROOMBRIDGE vorgenommenen Einteilung. Groombridges Einteilung besteht allerdings nicht wie hier aus einer Trichotomie, sondern aus den Schwestergruppen lebetina und Pseudocerastes-Eristicophis (5 Synapomorphien) und russelli als Schesterguppe der vorgenannten Formen. Vergleicht man den Durchschnitt der mit den Antiseren gegen die xanthina-, raddei- und palaestinae-Albumine ermittelten russelli-IDs (ca. 42) mit dem durch Dendrogramm VII (Abb. 44.) wiedergegeben ID (30), so stellt man eine Diskrepanz von ca. 12 IDs fest. Schreibt man diesen Unterschied einer beschleunigten Evolutionsrate des russelli-Albumins zu, so hätte dies eine Annäherung des russelli-Abzweiges an die lebetina s.l.-Gruppe zur Folge (d.h. Auflösung der Trichotomie).

Pseudocerastes und Eristicophis sind monophyletischen Ursprungs. Dies deckt sich mit GROOMBRIDGES Befunden und spricht gegen die von MARX & RABB (1965) geäußerte Hypothese der größeren Verwandtschaft der lebetina-Gruppe mit

Pseudocerastes (ausführliche Diskussion bei GROOMBRIDGE). Eristicophis wies im Test auf unterschiedliche Evolutionsgeschwindigkeiten eine relativ hohe Substitutionsrate auf (siehe Tab. 7.). Dies könnte für eine ungewöhnlich große Anhäufung autapomorpher Aminosäuren sprechen, was wiederum mit dem extremen Wüstenlebensraum dieser Schlange und damit verbundener physiologischer Albuminanpassungen in Verbindung gebracht werden könnte (siehe oben). In einem solchen Fall wäre ein "Evolutionssprung" (d.h. Erwerb vieler autapomorpher Aminosäuren in kurzer Zeit), der mit der Besiedlung der Wüstengebiete erfolgt sein müßte, denkbar. Für eine solche konstante Anzahl autapomorpher Aminosäuren könnte u.U. ein konstanter Korrekturwert geeigneter sein, als Korrekturfaktoren. Aus den oben genannten Gründen ist eine kürzere Distanz (und damit ein jüngerer Isolationszeitpunkt) zwischen Pseudocerastes und Eristicophis möglich, als die in Dendrogramm VII angegebene.

Die relativ große Distanz zwischen den Pseudocerastes-Unterarten persicus und fieldi spricht, ähnlich wie bei mauritanica, für eine artliche Separation. MARX & RABB und GROOMBRIDGE sehen allerdings den Unterartstatus als gerechtfertigt an, da morphologisch lediglich die Ventraliazahl keine Überschneidungen beim Vergleich der beiden Formen aufweist. BDOLAH (1986) untersuchte die Zusammensetzung der Gifte von persicus und fieldi und fand erhebliche Unterschiede. Daraus schloß er auf eine genetische Isolation beider Formen. Nach den Angaben von JOGER (1984) befindet sich eine eindeutige Lücke zwischen den Verbreitungsgebieten beider Formen. Geographische Überlappungsbereiche oder sympatrische Vorkommen sind nicht bekannt.

Die beiden Hauptlinien des Dendrogrammes VII verzweigen sich bei einer immunologischen Distanz von ca. 30.

Die Außengruppe Echis weist eine ID von ca. 60 zu den paläarktischen Großvipern auf.

Die Resultate der von ASHE et al. (1988) durchgeführten Analyse stehen an vielen Stellen mit den von GROOMBRIDGE vertretenen und auch den hier gewonnenen Ergebnissen im Widerspruch. So gruppieren ASHE et al. die Gattungen Pseudocerastes und Eristicophis in die Nähe von Cerastes und Echis, die sowohl hier (Echis) als auch bei HERRMANN et al. (Cerastes) immunologisch als Außengruppe erkannt wurden. Lediglich die Beziehungen zwischen russelli und lebetina entsprechen annähernd den hier gefundenen. Die von ASHE et al. dargestellten phylogenetischen Muster der paläarktischen Großvipern sind sehr uneinheitlich und erlauben im Vergleich mit anderen Arbeiten keine schlüssige phylogenetische Deutung.

Vergleicht man die hier gewonnenen immunologischen Ergebnisse mit den Ergebnissen, die auf konventionelle Art und Weise von GROOMBRIDGE erzielt wurden, so läßt sich keine generelle Übereinstimmung feststellen. Einige seiner Merkmale und deren Deutung sind bereits oben im Zusammenhang mit der palaestinae-russelli-Frage diskutiert worden. Eine ausführliche Diskussion der einzelnen morphologischen, anatomischen und osteologischen Merkmale würde an dieser Stelle zu weit führen. Trotzdem soll bemerkt werden, daß einige oft zur Charakterisierung der paläarktischen Großvipern (z.B. bei OBST 1983) verwendeten Merkmale wie z.B. zunehmende Auflösung der dorsalen Kopfschilder, die Nasenbeschuppung (Nasalia), die Körpergröße und die Kopf- und Körperzeichnung möglicherweise konvergent bzw. parallel entstanden sind und sich somit nicht zur Rekonstruktion phylogenetischer Beziehungen eignen.

Nachfolgend soll auf die in Abschnitt 2. aufgeworfenen Fragen eingegangen werden:

- Die Albuminevolution bei den untersuchten paläarktischen Großvipern vollzog sich unter Beachtung einiger Ausnahmen mit relativ konstanter Evolutionsgeschwindigkeit. Eine deutlich vom Mittelwert abweichende Evolutionsrate weisen vor allem Eristicophis und V. russelli auf. Dies

könnte mit physiologischen Anpassungen des Albumins an die jeweils stark von den anderen Taxa der paläarktischen Großvipern abweichenden Lebensräume dieser beiden Formen in Verbindung gebracht werden. Eristicophis ist eine Bewohnerin extremer Sandwüsten; V. russelli bewohnt feuchtere tropische Gegenden.

- Teile der von OBST (1983) zu Daboia gerechneten Taxa (nämlich xanthina, raddei und palaestinae) weisen engere albumin-immunologische Beziehungen zu den Kleinvipern s.str. auf, als zu den anderen Daboia-Arten. Damit erweist sich Daboia sensu OBST als polyphyletisch.
- Eristicophis zeigt die größte Albuminübereinstimmung mit Pseudocerastes. Diese Taxa sind monophyletischen Ursprungs, was einer Zuordnung von Pseudocerastes zu Daboia im Sinne OBSTs widerspricht und ein weiteres Argument für die Polyphyly von Daboia sensu Obst ist.
- Auf die zeitlichen und geographischen Aspekte der Stammesgeschichte paläarktischer Großvipern soll in Abschnitt 5. näher eingegangen werden.

Die Klassifikation der paläarktischen Großvipern auf Gattungsebene könnte sich nach den albumin-immunologischen Ergebnissen wie folgt von der in Abschnitt 1.2. dargestellten Klassifikation unterscheiden:

- Die V. xanthina-Gruppe und palaestinae könnten einen generisch eigenständigen Status erhalten, der sie von den Kleinvipern s.str. trennt. Die beiden Taxa sollten dann aufgrund abweichender morphologischer Merkmale etc. auf Untergattungsniveau getrennt werden.
- Ebenso könnte die V. lebetina s.l.-Gruppe eine eigene Gattung bilden.
- V. russelli scheint soweit von lebetina s.l. entfernt, daß auch ihr eigenständiger Gattungsstatus gebührt (auch aufgrund morphologischer und anatomischer (GROOMBRIDGE 1980) sowie osteologischer Merkmale (SZYNDLAR 1987b)).
- Pseudocerastes und Eristicophis sollten weiterhin als Gattungen geführt werden. Eristicophis weniger aufgrund ihrer immunologischen Distanz zu Pseudocerastes, als

vielmehr aufgrund der stark abweichenden Morphologie und Lebensweise (GROOMBRIDGE nennt 12 Autapomorphien für Eristicophis).

Artniveau sollte im Unterschied zu Abschnitt 1.2. V. "l." schweizeri, V. "m." deserti, und P. "p." fieldi zugestanden werden.

Nomenklatorische Konsequenzen aus den gewonnenen Ergebnissen sollen im Rahmen dieser Arbeit nicht gezogen werden, sind aber unter Berücksichtigung auch anderer Merkmalskomplexe in Vorbereitung.

5. Phylogenie und mögliche Verbreitungsgeschichte aufgrund der immunologischen Ergebnisse

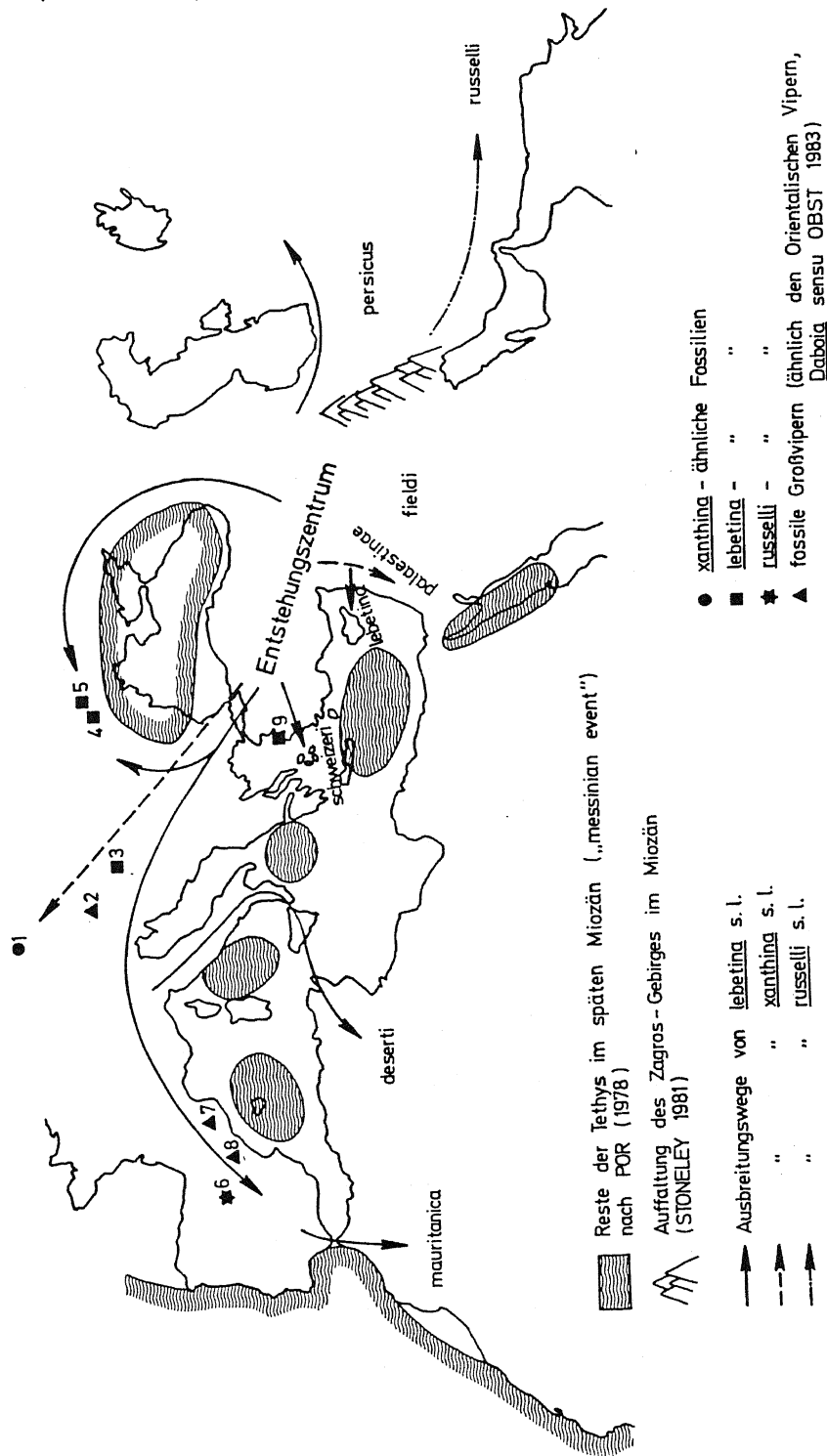
Als Entstehungszentrum der paläarktischen Vipern muß der vordere und mittlere Osten gelten. Dies ergibt sich aus der rezenten Verbreitung und der größten Artendiversität in diesem Raum.

Schon im späten Oligozän trennte sich die Echis-Linie von den paläarktischen Vipern. Dieser frühe Zeitpunkt liegt vor den durch Fossilien belegten ältesten Vipern, die erst aus dem frühen Miozän bekannt sind (ROMER 1967, SZYNDLAR 1987a).

Die Trennung der xanthina-palaestinae-Kleinvipern-Gruppe und der lebetina-russelli-Pseudocerastes-Gruppe erfolgt im mittleren Miozän. Aus dieser Zeit liegen Fossilien vor, die schon den beiden Hauptlinien zugeordnet werden können (xanthina-Linie: V. platyspondyla Szyndlar, 1987; lebetina-Linie: V. sp. Zerova & Ckhikvadze, 1984).

Im Miozän herrschte in großen Teilen Europas und den mediterranen Gegenden Vorderasiens und Nordafrikas ein weitgehend tropisches Klima, das sich im Spätmiozän zum subtropischen hin veränderte (de LATTIN 1967). Zu dieser Zeit hatten die Vertreter der xanthina- und der lebetina-Gruppe eine viel größere Verbreitung als heute. Fossil bekannte Vipern (Abb. 45.) existierten im frühen Miozän von Dolnice (CSSR; V. platyspondyla Szyndlar, 1987), im späten Miozän von Kohfidisch (Österreich, V. burgenlandica Bachmayer Szyndlar, 1987), im späten Miozän von Polgárdi (Ungarn; V. gedulyi Bolkay, 1913) und im Miozän von Kalfa (USSR: Ukraine; V. sp. Zerova & Ckhikvadze, 1984). Das subtropische Klima hielt sich bis zum mittleren Pliozän, bevor es dem heutigen Klima ähnlich wurde. Aus dem Pliozän sind fossile Vipern aus Kuchurgan (USSR: Ukraine; V. kuchurganica Zerova & Ckhikvadze, 1984), aus Layana

Abb. 45. Hypothetische Ausbreitungsgeschichte der paläarktischen Großvipern im späten Miozän und frühen Pliozän. Dargestellte Fossilfunde (nach SZYNDLAR 1988): 1: *V. platyspondyla*, frühes Miozän, Dolnice (CSSR); 2: *V. burgenlandica*, spätes Miozän, Kohfidisch (Österreich); 3: *V. gedulyi*, spätes Miozän, Polgárdi (Ungarn); 4: *V. sp.*, Miozän, Kalfa (UdSSR, Ukraine); 5: *V. kuchurganica*, Kuchurgan (UdSSR, Ukraine); 6: *V. maxima*, mittleres Pliozän, Layna (Spanien); 7: ?*V. sp.*, Pliozän, Vilafant (Spanien); 8: "grande Vipère", Pliozän/Pleistozän, Medas (Spanien); 9: *V. lebetina*, mittleres Pleistozän, Chios (Griechenland).



(Spanien; V. maxima Szyndlar, 1988), und eine Großvipere aus Medas (Spanien; "grande Vipère", SAINT-GIRONS 1980) bekannt (Abb. 45.). Durch die zunehmende Klimaverschlechterung verschwanden die Großvipern wieder aus weiten Teilen Europas. Lediglich die Kleinvipern, die im mittleren Miozän ihren letzten gemeinsamen Vorfahren mit der xanthina-palaestinae-Gruppe hatten, konnten sich anscheinend an die niedrigeren Temperaturen soweit anpassen, daß sie Europa besiedeln konnten. Auch die heutigen Vertreter der xanthina-Gruppe sind bezüglich der Temperaturen weitaus plastischer als die Angehörigen der lebetina-Linie (NILSON & ANDREN 1986).

Seit etwa dem mittleren Miozän existierte die Verbindung zwischen dem damaligen Mittelmeer (der Tethys) und dem Indopazifik auf Höhe des heutigen Syriens und des Iraks nicht mehr (POR 1978). Nun konnten palaestinae-Vorfahren vor ca. 8 Mill. Jahren nach Süden in ihr heutiges Areal vordringen. Da keine fossilen lebetina-Formen aus dem palaestinae-Areal bekannt sind und rezent zwar beide Formen sympatrisch, aber wahrscheinlich nicht syntop (in Syrien und dem Libanon) vorkommen, könnte man annehmen, daß palaestinae sich dort einnischte, wo andernorts diese Nischen bereits von lebetina besetzt waren. Später gelangte lebetina ebenfalls nach Süden, konnte aber nicht die bereits etablierte palaestinae verdrängen. Diese war lebetina in einigen Merkmalen, wie z.B. der Größe, ähnlich geworden.

Die Phylogenie und Verbreitung der xanthina-Gruppe steht in engem Zusammenhang mit den im späten Pliozän und im Pleistozän zyklisch auftretenden Klimaschwankungen (ausführliche Diskussion bei NILSON & ANDREN 1986).

Vor etwa 12 Mill. Jahren, im mittleren Miozän, trennten sich lebetina s.l., russelli und der Vorfahre von Pseudocerastes und Eristicophis voneinander. Aufgrund der rezenten Verbreitung und einiger der oben genannten Fossilien (Abb. 45.) ist die Ausbreitung von lebetina in nordwestliche (bis Spanien) und nordöstliche Richtung (bis

Nordindien, südliche UdSSR), ausgehend von Kleinasien und dem nördlichen Nahen Osten, anzunehmen.

Die beiden in Nordafrika vorkommenden mauritanica-Formen sind nach immunologischen Daten bereits seit ca. 6 Mill. Jahren isoliert. Um dieses Datum erklären zu können, müßten diese Taxa nicht wie bisher angenommen durch einen gemeinsamen Vorfahren nach Nordafrika gelangt sein, sondern könnten über zwei Landbrücken getrennt dort eingewandert sein. Im späten Miozän kam es zur weiträumigen Austrocknung des Mittelmeeres ("messinian event", THENIUS 1977), so daß mehrere Landverbindungen zwischen Afrika und Europa existierten. Die in Spanien lebende lebetina könnte über die damals trockene Straße von Gibraltar nach Nordwestafrika gelangt sein, wo sich nach ihrer genetischen Isolation mauritanica entwickelte. Die von RAGE (1976) aus dem Miozän Marokkos beschriebene V. maghrebiana wurde von ihm ursprünglich in die Nähe von lebetina gerückt. SZYNDLAR (1988) vertrat die abweichende Meinung, daß diese Viper eher mit den europäischen Kleinvipern assoziiert werden sollte. Des weiteren könnte lebetina unabhängig davon über Sizilien im Bereich Tunesiens nach Nordafrika gelangt sein. Diese Population könnte sich nach der erneuten Füllung des Mittelmeeres zu deserti entwickelt haben. Parallel zur Einwanderung von Norden nach Afrika gab es auch Einwanderungen aus Süden nach Europa. Als Beispiel mag der Kammfinger Pellegrina dienen, der auf Sizilien einwanderte (THENIUS 1977).

Die Besiedlung einiger Kykladeninseln durch lebetina erfolgte ebenfalls im Messinium. Dies geschah entweder von der westlichen Türkei oder Griechenland aus. Durch den Anstieg des Meeresspiegel vor ca. 5 Mill. Jahren wurde diese Population isoliert und entwickelte sich zu schweizeri.

Zypern wies bis zur Pliozän-Pleistozän-Wende vor ca. 2. Mill. Jahren eine Landverbindung mit Syrien auf (HAAS 1952), was die relativ große Nähe der Inselform l. lebetina zu den Festlandformen erklärt. Die lebetina-Unterarten

obtusa und turanica sind Produkte späterer, pleistozäner Klimaschwankungen und damit einhergehender Isolation einzelner Populationen.

Fossile russelli-ähnliche Vipern sind mit Ausnahme der von SZYNDLAR (1988) aus dem Pliozän Spaniens beschriebenen V. maxima nicht bekannt. Diese russelli-ähnliche Schlange hat nach SZYNDLARs Meinung die iberische Halbinsel von Süden, also aus Afrika erreicht. Diese Hypothese ist lediglich durch V. maxima belegt. Trifft SZYNDLARs Deutung dieses Fossils zu, so müßte der gesamte westliche "Ast" der damaligen "russelli-Radiation" ausgestorben sein. Eine Deutungsalternative besteht in der Annahme, daß es sich bei V. maxima vielleicht doch um eine lebetina verwandte Form handelt. Für diese Alternative würde das im Pliozän schon deutlich kältere Klima sprechen. Die rezente V. russelli weist eine ausgesprochene palaeotropische Verbreitung auf (Abb. 19.). Trifft diese Hypothese zu, so ist eine ausschließlich östliche Radiation der russelli-Gruppe wahrscheinlich.

Eristicophis trennte sich gegen Ende des mittleren bis eventuell späten Miozäns von der Pseudocerastes-Linie (siehe auch Diskussion der Eristicophis-Distanzen in Abschnitt 4.3.). Von Eristicophis sind keine fossilen Belege bekannt. Durch die extreme Adaptation an die Existenz auf Flugsanddünen und in Sandwüsten (ähnlich wie Cerastes vipera und Bitis peringueyi in Afrika) wurde sie morphologisch derartig von Pseudocerastes verschieden, daß Autoren wie z.B. MARX & RABB (1965) keine näheren Beziehungen zu Pseudocerastes feststellen konnten.

Die beiden Pseudocerastes-Taxa persicus und fieldi scheinen den immunologischen Ergebnissen zufolge schon seit etwa dem späten Miozän isoliert zu sein. Diese Beobachtung korreliert mit der Auffaltung des Zagros-Gebirges im Miozän (STONELEY 1981). Die mögliche Isolation der beiden Unterarten durch das Zagros-Gebirge wird von MARX & RABB (1965) wie folgt diskutiert: "Specimens are known from an altitude

of 5000 feet (ca. 1500 m) in India (SMITH 1943), and it thus appears likely that the Zagros mountain range could be penetrated, allowing gene flow". JOGER (1984) berichtet über persicus-Populationen nordwestlich und westlich des Zagros-Gebirges. Trotzdem besteht eine große geographische Lücke zwischen den Verbreitungsgebieten von persicus und fieldi. Aufgrund der immunologischen Distanz zwischen beiden Formen und den Ergebnissen von BDOLAH (1986) scheint die genetische Isolation durchaus wahrscheinlich.

Abschließend soll angemerkt werden, daß viele der in diesem Abschnitt gemachten Aussagen hypothetischen Charakter haben und nur als eine von eventuell mehreren Deutungsmöglichkeiten aufzufassen sind.

6. Zusammenfassung

- A. In der vorliegenden Arbeit wird versucht, mit Hilfe albumin-immunologischer Vergleiche (und Blutserum-Elektropherogrammen) die Phylogenese der paläarktischen Großvipern zu rekonstruieren. Zu diesem Zweck wurden Serumalbumine von 24 Taxa der Gattungen Vipera s.l., Pseudocerastes und Eristicophis, sowie von 3 Echis-Arten untersucht. Gegen 7 der genannten Albumine wurden Antiseren hergestellt.
- B. Die Evolutionsraten der untersuchten Albumine zeigten keine drastischen Abweichungen vom Mittelwert und schwankten lediglich im statistisch zu erwartenden Rahmen. Ausnahmen waren die Albumine von Eristicophis und V. russelli, die eventuell aufgrund physiologischer Anpassungen größere Abweichungen von der mittleren Evolutionsrate zeigten. In der Annahme einer linearen Beziehung zwischen der Zeit und den immunologischen Distanzen wurde die Zeitskala durch die Ermittlung eines Eichpunktes, dem die Isolation von V. lebetina schweizeri (Kykladen-Inselgruppe) im Messinium zugrunde lag, an die IDs (immunologischen Distanzen) angepaßt. Insgesamt ergab sich durch diese Vorgehensweise ein durch Fossilien gestütztes, paläogeographisch schlüssiges Bild. Es wurden keine gegen die Molekularuhrhypothese sprechenden Hinweise gefunden.
- C. Bei der Deutung der immunologischen Daten von V. palaestinae ergaben sich besondere Schwierigkeiten. Sie lösten sich durch die ausführlich begründete Annahme, daß die Ähnlichkeit der Albumine von V. palaestinae und V. mauritanica deserti auf Konvergenz beruht.

- D. Die paläarktischen Vipern sind im Vergleich zur Außen-
gruppe Echis monophyletisch. Echis muß sich bereits im
Oligozän von ihnen getrennt haben. Dieser Zeitpunkt
liegt erheblich vor den ältesten fossilen Funden aus dem
frühen Miozän.
- E. Die Gattung Daboia sensu OBST (1983) erwies sich als
polyphyletisch. Die V. xanthina-Gruppe und palaestinae
weisen engere Beziehungen zu den Kleinvipern s.str. auf,
als zu den restlichen Daboia-Arten.
- F. Die Trennung der beiden Hauptlinien der paläarktischen
Vipern erfolgte bereits im frühen bis mittleren Miozän.
Eine Hauptlinie führt zu den Vertretern der xanthina-
Gruppe, palaestinae und den Kleinvipern, die sich von
den erstgenannten Taxa schon relativ früh abzweigten.
Die terminalen Taxa der zweiten Linie werden von den
restlichen, heute lebenden paläarktischen Großvipern
gebildet (V. lebetina-mauritanica-Gruppe, V. russelli,
Pseudocerastes und Eristicophis).
- G. V. russelli erweist sich albuminimmunologisch als eben-
soweit von lebetina s.l. entfernt wie die Gattungen
Pseudocerastes und Eristicophis, wäre jedoch bei der
Annahme einer schnelleren Albuminevolution näher an
lebetina zu rücken.
- H. Eristicophis, eine hochspezialisierte Sandwüsten-
schlange, trennte sich etwa im mittleren bis späten
Miozän von Pseudocerastes, die das Schwestertaxon dar-
stellt.
- I. V. lebetina schweizeri weist eine relativ große Diffe-
renz ihres Albumins zu den Albuminen der anderen
lebetina-Unterarten auf. Durch die Isolation der
Kykladen-Inseln vom Festland gegen Ende des "messinian
event" und der damit einhergehenden genetischen Isola-

tion dieser Population ist eine Separation eingetreten, die den Artstatus nahelegt.

- J. Die Albumine der Unterarten V. m. mauritanica und V. m. deserti sind immunologisch ebenfalls sehr unterschiedlich. Die starke Austrocknung des Mittelmeeres gegen Ende des Miozäns könnte eine getrennte Einwanderung der beiden Formen nach Nordafrika ermöglicht haben. V. m. mauritanica wanderte über die damals trockene Straße von Gibraltar ein, während m. deserti über Sizilien ins heutige Tunesien gelangt sein könnte.
- K. Die Pseudocerastes-Formen p. persicus und p. fieldi sind ebenfalls weitgehend genetisch isoliert, was auch hier eine Trennung auf Artniveau angebracht erscheinen läßt. Die Trennung steht ursächlich mit der Auffaltung des Zagros-Gebirges im Miozän in Verbindung.
- L. Auf Gattungsebene lassen sich u.U. die folgenden Gruppen bzw. Taxa trennen:
- Vipera xanthina-Gruppe und V. palaestinae (auf Untergattungsniveau getrennt)
 - V. lebetina, V. "l." schweizeri, V. "m." mauritanica und V. "m." deserti
 - V. russelli
 - Pseudocerastes "p." persicus und P. "p." fieldi
 - Eristicophis macmahoni.

7. Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. H. O. von Hagen für Anregungen, Kritik, den Arbeitsplatz und materielle Unterstützung danken.

Herrn Dr. U. Joger (Darmstadt), der das Thema anregte, danke ich für seine freundschaftliche Unterstützung bei der Einführung in die serologischen Methoden, bei der Materialbeschaffung, für viele anregende Diskussionen und anderes mehr.

Herr Dr. G. Nilson (Göteborg) unterstützte die Arbeit großzügig mit Blutserumproben der überwiegenden Anzahl der untersuchten Taxa und wertvollen Hinweisen.

Methodische Unterstützung wurde mir von Prof. E. Geyer (Marburg) und seiner Arbeitsgruppe zuteil. In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank Herrn L. Kremp, der u.a. die photographische Dokumentation der Elektropherogramme besorgte.

Herr Prof. J. Felsenstein (Washington) übersandte mir freundlicherweise eine Kopie seines Programmpaketes PHYLIP.

Frau S. Götzfried bin ich für ihre Hilfe bei der Reinzeichnung vieler Abbildungen zu großem Dank verpflichtet.

Die Herren M. Lehmann (Hamburg) und D. Schmidt (Kassel) gestatteten mir, einigen in ihrer Obhut befindlichen Schlangen Blut zu entnehmen. Herr M. Lehmann stellte mir außerdem die Eristicophis-Fotos zur Verfügung.

Herrn Prof. E. Kochva (Tel Aviv) und Herrn Dr. Z. Szyndlar (Krakau) danke ich für wichtige Literaturhinweise.

Nicht zuletzt möchte ich Herrn L. Herrmann und Frau M. Sauer für die Übernahme vieler sonstiger anfallender Arbeiten und ihre Unterstützung der vorliegenden Ausarbeitung danken.

8. Literatur

- ASHE, J. S. & H. MARX (1989): Phylogeny of the viperine snakes (Viperinae): Part II. Cladistic analysis and major lineages. - *Field. Zool.*, New Series 52: 1-23.
- AX, P. (1984): *Das Phylogenetische System*. Stuttgart. 349 S.
- BDOLAH, A. (1986): Comparison of venoms from two subspecies of the false horned viper (*Pseudocerastes persicus*). - *Toxicon* 24 (7): 726-729.
- Benjamin, D. C.; Berzofsky, J. A.; East, I. J.; Gurd, F. R. N.; Hannum, C.; Leach, S. J.; Margoliash, E.; Michael, J. G.; Miller, A.; Prager, E. M.; Reichlin, M.; Sercarz, E. E.; Smith-Gill, S. J.; Todd, P. E. & A. C. Wilson (1984): The antigenetic structure of proteins: A reappraisal. - *Ann. Rev. Immunol.* 2: 67-101.
- BEVERLEY, S. M. & A. C. WILSON (1982): Molecular evolution in *Drosophila* and higher Diptera. I. Micro-complement fixation studies of a larval hemolymph protein. - *J. Mol. Evol.* 18: 251-264.
- BÖHME, W. (1988): Zur Genitalmorphologie der Sauria: funktionelle und stammesgeschichtliche Aspekte. - *Bonn. zool. Monogr.* 27: 1-176.
- BRADFORD, M. U. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. - *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- BRANDIS, H. (Hrsg.) (1972): *Einführung in die Immunologie*. 2. Aufl. Stuttgart.
- BRODMANN, P. (1987): *Die Giftschlangen Europas und die Gattung Vipera in Afrika und Asien*. Bern. 148 S.
- CADLE, J. E. (1982): Problems and approaches in the interpretation of the evolutionary history of venomous snakes. - *Mem. Inst. Butantan* 46: 255-274.
- (1984): Molecular systematics of neotropical xenodontine snakes: I. South American Xenodontines. *Herpetologica* 40 (1): 8-20.
- (1988): Phylogenetic relationships among advanced snakes. A molecular perspective. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 119: 1-77.
- & G. C. GORMAN (1981): Albumin immunological evidence and the relationships of sea snakes. - *J. Herp.* 15: 329-334.
- & V. M. SARICH (1981): An immunological assessment of the phylogenetic position of new world coral snakes. - *J. Zool.* 195: 157-167.
- CARLSON, S. G.; WILSON, A. C. & R. D. MAXSON (1978): Do albumin clocks run on time? - *Science* 200: 1182-1185.
- CHAMPION, A. B., PRAGER, E. M., WACHTER, D. & A. C. WILSON (1974): Microcomplement fixation. - in: Wright, C. A. (ed.): *Biochemical and immunological taxonomy of animals*. London. 397-416.

- CROW, J. F. (1985): the neutrality-selection controversy in the history of evolution and population genetics. - in: Ohta, T. & K. Aoki: Population genetics and molecular evolution. Tokyo. 1-18.
- DAUGHTERY, C. H.; MAXSON, L. R. & B. D. BELL (1982): Phylogenetic relationships within the New Zealand frog genus Leiopelma - immunological evidence. - New Zealand J. Zool. 9: 239-242.
- DeLATTIN, G. (1967): Grundriß der Zoogeographie. Stuttgart. 602 S.
- DeSMET, W. H. O. (1978a): The total protein content in the blood serum of vertebrates. - Acta zool. pathol. Antverp. 70: 35-56.
- (1978b): Study of the serum albumin and globulin of the vertebrates. - Acta zool. pathol. Antverp. 70: 57-83.
- DESSAUER, H. C. (1974): Biochemical and immunological evidence of relationships of Amphibia and Reptilia. - in: Wright, D. A. (ed.): Biochemical and immunological taxonomy of animals. Academic Press. 177-242.
- ; CADLE, J. E. & R. LAWSON (1987): Patterns of snake evolution suggested by their proteins. - Field. Zool., New Series 34: 1-34.
- DISI, A. M. (1985): A contribution to the herpetofauna of Jordan. I. Venomous snakes. - Dirasat 10 (2): 167-180.
- DOWLING, H. G.; HIGHTON, R.; MAHA, G. C. & L. R. MAXSON (1983): Biochemical evaluation of colubrid snake phylogeny. - J. Zool., London: 309-329.
- EISELT, J & I. BARAN (1970): Ergebnisse zoologischer Sammelreisen in der Türkei: Viperidae. - Ann. Naturhist. Mus. Wien 74: 357-369.
- FARRIS, J. S. (1972): Estimating phylogenetic trees from distance matrices. - Am. Nat. 106: 645-668.
- (1981): Distance data in phylogenetic analysis. - in: Funk, V. A. & D. R. Brooks (eds.): Advances in cladistics. New York, 3-23.
- FELSENSTEIN, J. (1978): The number of evolutionary trees. - Syst. Zool. 27: 27-33.
- (1982): Numerical methods for inferring evolutionary trees. - Quart. Rev. Biol. 57: 379-404.
- (1984): Distance methods for inferring phylogenies: A justification. - Evolution 38 (1): 16-24.
- (1988): PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.1. Manual. Washington.
- FITCH, W. M. (1976): Molecular evolutionary clocks. - in: Ayala, F. J. (ed.): Molecular evolution. Sunderland, MA. 160-178.
- & E. MARGOLIASH (1967): Construction of phylogenetic trees. - Science 155: 279-284.
- & C. H. LANGLEY (1976): Protein evolution and the molecular clock. - Fed. Proc. 35: 2092-2097.
- FRELIN, C. & F. VUILLEUMIER (1979): Biochemical methods and reasoning in systematics. - Z. zool. Syst. Evolut.-forsch. 17: 1-10.
- GRAY, I. E. (1842): Monographic synopsis of the vipers, on the family Viperidae. - Zool. Miscellany, London. 68-71.
- GROOMBRIDGE, B. C. (1980): A phyletic analysis of viperine snakes. Unpublished Ph. D. Thesis, City of London Polytechnic / British Museum (Nat. Hist.), 271 S.

- (1986): Phyletic relationships among viperine snakes. - in: Rocek, Z. (ed.): Studies in Herpetology. Prague. 219-222.
- GRUBER, U. (1989): Die Schlangen Europas und rund ums Mittelmeer. Stuttgart. 248 S.
- HAAS; G. (1952): Remarks on the origin of the herpetofauna of Palestine. - Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul, Ser. B., 17: 95-105.
- HALDANE, J. B. (1957): The cost of natural selection. - J. Genetics 55: 511-530.
- HARDING, K. A. & K. R. G. WELCH (1980): Venomous snakes of the world. Oxford. 188 S.
- HARTMAN, B. K. & S. UDENFRIEND (1969): A method for immediate visualization of proteins in acrylamid gels and its use for preparation of antibodies to enzymes. - Analytical Biochem. 30: 391-394.
- HEIMES, P. (1982): Untersuchungen zur Systematik der Fächerfinger (Gattung Ptyodactylus, Reptilia: Sauria: Gekkonidae). Diplomarbeit, Universität Marburg. 109 S.
- HEIMSOETH SOFTWARE (Hrsg.) (1985): Turbo Pascal Graphix Toolbox. München.
- HENNIG, W. (1982): Phylogenetische Systematik. Berlin, Hamburg. 246 S.
- HERRMANN, H.-W.; JOGER, U.; NILSON, G. & C. G. SIBLEY (1987): First steps towards a biochemically based reconstruction of the phylogeny of the genus Vipera. - in: van Gelder, J. J.; Strijbosch, H. & P. J. M. Bergers (eds.): Proc. 4th Ord. Gen. Meet. SEH. Nijmegen, 195-200.
- HUTCHINSON, M. N. & L. R. MAXSON (1987): Albumin evolution, paraphyly and the relationships of the Australian frog Megistolotis lignarius (Anura: Limnodynastidae). - Syst. Zool. 36b (4): 387-394.
- JOGER, U. (1984): Morphologische und biochemisch - immunologische Untersuchungen zur Systematik und Evolution der Gattung Tarentola (Reptilia: Gekkonidae). - Zool. Jb. Anat. 112: 137-256.
- (1985): Biochemical and immunological data on the systematic position of the endemic gecko of the Selvages Islands. - Bonn. zool. Beitr. 36 (3/4): 307-314.
- (1986): Phylogenetic analysis of Uromastyx lizards, based on albumin immunological distances. - in: Rocek, Z. (ed.): Studies in Herpetology. Prague. 187-192.
- (1990a): A molecular phylogeny of Agamid lizards. - Copeia (zum Druck eingereicht).
- (1990b): Homologie, Konvergenz und phylogenetische Rekonstruktion mit biochemischen Methoden. - Zool. Jb. (Syst.) (zum Druck eingereicht).
- & B. Arano (1987): Biochemical phylogeny of the Agama genus group. - in: van Gelder, J. J.; Strijbosch, H. & P. J. M. Bergers (eds.): Proc. 4th Ord. Gen. Meet. SEH. Nijmegen, 215-218.
- KIMURA, M. (1968): Evolutionary rate at molecular level. Nature 217: 624-626.
- (1987): Die Neutralitätstheorie der molekularen Evolution. Berlin, Hamburg. 303 S.
- (1988): Die "neutrale" Theorie der molekularen Evolution. - in: Spektrum der Wissenschaft: Verständliche Forschung: Evolution. 100-108.

- & T. Ohta (1971): On the rate of molecular evolution. - J. Molec. Evolution 1: 1-17.
- KING, J. L. & T. H. JUKES (1969): Non-darwinian evolution. - Science 164: 788-798.
- KLEMMER, K. (1963): Liste der rezenten Giftschlangen. - Behringwerk - Mitt., Sonderband: Die Giftschlangen der Erde. 255-464.
- KNOEFEL, P. K. (1988): Francesco Redi on vipers. - Leiden, 86 S.
- KRAMER, E. & H. SCHNURRENBERGER (1959): Zur Systematik libyscher Schlangen. - Mitt. naturf. Ges. Bern (N.F.): 1-17.
- & - (1963): Systematik, Verbreitung und Ökologie der libyschen Schlangen. - Rev. Suisse Zool. 70 (27): 453-568.
- LEWONTIN, R. C. (1974): The genetic basis of evolutionary change. Columbia University Press.
- LUTZ, D; BISCHOFF W. & W. MAYER (1986): Chemosystematische Untersuchungen zur Stellung von Lacerta jayakari Boulenger, 1887 sowie der Gattungen Gallotia Boulenger und Psammodromus Fitzinger (Sauria: Lacertidae). - Z. zool. Syst. Evolut.-forsch. 24: 144-157.
- MARX, H. & G. B. RABB (1965): Relationships and zoogeography of the viperine snakes (Family Viperidae). - Field. Zool. 44 (21): 161-206.
- ; ASHE, J. S. & L. E. WATROUS (1988): Phylogeny of the viperine snakes (Viperinae): Part I. Charakter analysis. - Field. Zool., New Series 51: 1-16.
- MAXSON, L. R. (1981): Albumin evolution and its phylogenetic implications in toads of the genus Bufo. II. Relationships among Eurasian Bufo. - Copeia 1981: 579-583.
- (1984): Molecular probes of phylogeny and biogeography in toads of the widespread genus Bufo. - Mol. Biol. Evol. 1 (4): 345-356.
- ; HIGHTON, R. & D. ONDRULA (1984): Immunological evidence on genetic relationships of Plethodon dorsalis. - J. Herp. 18 (3): 341-344.
- ; HIGHTON, R. & D. B. WAKE (1979): Albumin evolution and its phylogenetic implications in the plethodontid salamander genera Plethodon and Ensatina. - Copeia 1979: 502-508.
- & J. D. Roberts (1984): Albumin and australian frogs: Molecular data a challenge to speciation model. - Science 225: 957-958.
- & J. D. Roberts (1985): An immunological analysis of the phylogentic relationships between two enigmatic frogs, Myobatrachus and Arenophryne. - J. Zool., London (A) 207: 289-300.
- ; SARICH, V. M. & A. C. WILSON (1975): Continental drift and the use of albumin as an evolutionary clock. - Nature 255: 397-400.
- ; TYLER, M. J. & R. D. MAXSON (1982): Phylogenetic relationships of Cyclorana and the Litoria aurea species group (Anura: Hylidae): A molecular perspective. - Aust. J. Zool. 30: 643-651.
- & D. B. WAKE (1981): Albumin evolution and its phylogenetic implications in the plethodontid salamander

- genera Pseudoeurycea and Chiropterotriton. -
Herpetologica 37 (2): 109-117.
- & A. C. WILSON (1974): Convergent morphological evolution detected by studying proteins of tree frogs in the Hyla eximia species group. - Science 185: 66-68.
- & - (1975): Albumin evolution and organismal evolution in tree frogs (Hylidae). - Syst. Zool. 24: 1-15.
- & - (1979): Rates of molecular and chromosomal evolution in salamanders. - Evolution 33 (2): 734-740.
- MAYR, E. (1975): Grundlagen der zoologischen Systematik. Hamburg, Berlin. 370 S.
- MEBS, D. & F. KORNALIK (1981): Schlangengifte - Probleme ihrer Wirksamkeit, untersucht am Beispiel von Echis carinatus. - Salamandra 17 (3/4): 89-98.
- MENDELSSOHN, H. (1963): On the biology of the venomous snakes of Israel. Part I. - Israel. J. Zool. 12: 143-170.
- MERTENS, R. (1951): Die Levante - Otter der Cycladen. - Senckenbergiana 32 (1/4): 207-209.
- MERTENS, R. (1952): Amphibien und Reptilien aus der Türkei. - Rev. Fac. Sci. Istanbul B 17 (1): 64-75.
- NILSON, G. & C. ANDREN (1986): The Mountain Vipers of the Middle East - the Vipera xanthina complex (Reptilia, Viperidae). - Bonn. zool. Monogr. 20: 1-90.
- & - (1988): Vipera lebetina transmediterranea, a new subspecies of viper from North Africa, with remarks on the taxonomy of V. lebetina and V. mauritanica (Reptilia: Viperidae). - Bonn. zool. Beitr. 39 (4): 371-379.
- ; - & B. FLÄRDH (1988): Die Vipern der Türkei. - Salamandra 24 (4): 215-247.
- OBST, F. J. (1983): Zur Kenntnis der Schlangengattung Vipera. Zool. Abh. staatl. Mus. Tierk. Dresden 38 (13): 229-235.
- POR, F. D. (1978): Lessepsian migration. Ecological Studies 23. Berlin. 228 S.
- PRAGER, E. M. & A. C. WILSON (1971a): The dependence of immunological cross-reactivity upon sequence resemblance among lysozymes. I. Microcomplement fixation studies. - J. Biol. Chem. 246 (19): 5978-5989.
- & - (1971b): The dependence of immunological cross-reactivity upon sequence resemblance among lysozymes. II. Comparison of precipitin and microcomplement fixation results. - J. Biol. Chem. 246 (22): 7010-7017.
- & - (1976): Congruency of phylogenies derived from different proteins. - J. mol. Evol. 9: 45-57.
- RAGE, J. C. (1976): Les squamates du Miocène de Beni Mellal, Maroc. - Géol. Méditerr. 3 (2): 57-69.
- READ, D. W. (1975): Primate phylogeny, neutral mutations, and "molecular clocks". - Syst. Zool. 24: 209-221.
- REUSS, T. (1927): Sechs europäische Giftschlangengattungen. - Zool. Anz. 72: 124-129.
- (1935): Europäische Giftschlangen. - Deutscher Almanach für Aquarien- und Terrarienfrenude: 145-166.
- ROBERTS, J. D. & L. R. MAXSON (1985): The biogeography of southern Australian frogs: molecular data reject multiple invasion and pleistocene divergence models. - in: Grigg, G.; Shine, R. & H. Ehman (eds.): Biology of Australasian frogs and reptiles. New South Wales. 83-89.

- ROITT, I. M. (1984): Leitfaden der Immunologie. 2. Aufl. Darmstadt. 304 S.
- ROMER, A. S. (1967): Vertebrate Palaeontology. Chicago.
- SACHS, L. (1984): Angewandte Statistik. 6. Aufl. Berlin. 552 S.
- SARICH, V. M. (1970a): Pinniped origins and the rate of evolution of carnivore albumins. - Syst. Zool. 18: 287-295.
- (1970b): Primate systematics with special reference to old world monkeys : A protein perspective . - in Napier, J. R. & P. H. Napier (eds.): Old World Monkeys. New York. 175-226.
- (1972): Generation time and albumin evolution. - Biochem. Gen. 7: 205-212.
- (1973): The Giant Panda is a bear. - Nature 245: 218-220.
- (1988): Sound of distance drums. - Nature 332: 499.
- & J. E. CRONIN (1976): Molecular systematics of the primates. - in: Goodman, M. & R. Tashian (eds.): Molecular anthropology. New York, 141- 170.
- & A. C. WILSON (1966): Quantitative immunochemistry and the evolution of primate albumins : Micro complement fixation. Science 154: 1563-1566.
- & - (1967): Immunological time scale for hominid evolution. - Science 158: 1200- 1203.
- SCHWARZ, E. (1936): Untersuchungen über Systematik und Verbreitung der europäischen und mediterranen Ottern. - Behringwerk - Mitt. 7: Die europäischen und mediterranen Ottern und ihre Gifte: 159 -362.
- STEBBINS, G. L. & R. C. LEWONTIN (1972): Comparative evolution at the levels of molecules, organisms and populations. - in: LeCam, L. M.; Neyman, J. & E. L. Scott: Proc. of the Sixth Berkeley Symp. on Math. Stat. and Prob. Vol. V: Darwinian, Neo-Darwinian, and Non-Darwinian Evolution. University of California Press. 23-42.
- STONELEY, R. (1981): The geology of the Kuh-e Dalneshin area of southern Iran, and its bearing on the evolution of southern Tethys. - J. geol. Soc. London 138: 509-526.
- STRAUCH , A. (1869): Synopsis der Viperiden, nebst Bemerkungen über die geographische Verbreitung dieser Giftschlangen - Familie. - Mem. Acad. Sci. St. Pétersbourg 14 (7): 1 - 144.
- SWOFFORD, D. L. (1981): On the utility of the distance Wagner procedure. - in: Funk, V. A. & D. R. Brooks (eds.): Advances in cladistics. New York, 25-43.
- SZYNDLAR, Z. (1987a): Two new extinct species of the genera Malpolon and Vipera (Reptilia, Serpentes) from the Pliocene of Layna (Spain). - Acta Zool. Cracov. 31 (27): 687-706.
- (1987b): Neogene 'Oriental vipers' of Europe. - in: van Gelder, J. J.; Strijbosch, H. & P. J. M. Bergers (eds.): Proc. 4th Ord. Gen. Meet. SEH. Nijmegen, 387-390.
- THENIUS, E. (1977): Meere und Länder im Wechsel der Zeiten. Berlin. 200 S.
- THORPE, J. P. (1982): The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. - Ann. Rev. Ecol. Syst. 13: 139-168.

- THROCKMORTON, L. H. (1968): Biochemistry and taxonomy. - Ann. Rev. Entomol. 13: 99-114.
- TRAVIS, J. & R. PANNEL (1973): Selective removal of albumin from plasma by affinity chromatography. - Clin. Chim. Acta 49: 49-52.
- TRAVIS, J. ; BOWEN, J.; TEWKSBURY, D.; JOHNSON, D. & R. PANNEL (1976): Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin - depleted plasma. - Biochem. J. 157: 301-306.
- WALLACE, D. G.; KING, M. C. & A. C. WILSON (1973): Albumin differences among ranid frogs: Taxonomic and phylogentic implications. Syst. Zool. 22: 1-13.
- WALLACE, D. G.; MAXSON, L. R. & A. C. WILSON (1971): Albumin evolution in frogs: A test of the evolutionary clock hypothesis. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68 (12): 3127-3129.
- WEIS, C. (1985): Die Funktionen des Blutes. - in: Schmidt, R. F. & G. Thews (Hrsg.): Physiologie des Menschen. Berlin. 362-390.
- WERNER; F. (1938): Eine verkannte Viper (Vipera palaestinae n. sp.). Zool. Anz. 122: 313-318.
- WILSON, A. C.; CARLSON, S. S. & T. J. WHITE (1977): Biochemical evolution. - Ann. Rev. Biochem. 46: 573-639.
- ZUCKERKANDL, E. & L. PAULING (1965): Evolutionary divergence and convergence in proteins. - in: Bryson, V. & H. J. Vogel (eds.): Evolving Genes and Proteins. New York. 97-166.

9. Anhang



Abbildung A1. Immunologische Distanzen der Einzeltests der verschiedenen Albumine gegen die jeweiligen Antiseren. Die Ermittlung der für die Berechnung der IDs erforderlichen Äquivalenzpunkte erfolgte in den meisten Einzeltests sowohl graphisch als auch mathematisch (siehe Abschnitt 3.4.). Aufgeführt sind die nach der in Abschnitt 3.7. beschriebenen statistischen Behandlung erhaltenen IDs. Die IDs dienen zur Errechnung der in Tab. 5. dargestellten Werte. Die Abkürzungen sind der Tab. 4. zu entnehmen.

Anti - V. xanthina - Albumin:

Test	Graphische Ermittlung				\bar{x}	Mathematische Ermittlung				\bar{x}
	1.Test	2.Test	3.Test	4.Test		1.Test	2.Test	3.Test	4.Test	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19.0	12.2	13.0	4.1	12.1	21.1	20.3	13.8	7.2	15.6	
25.9	15.1	30.5	12.9	21.1	30.8	18.5	24.8	19.7	23.5	
20.3	18.8	--	--	19.5	24.3	24.3	--	--	24.3	
31.1	23.8	31.9	22.7	27.4	35.3	27.5	32.7	--	31.8	
--	--	14.5	3.6	9.0	--	--	15.2	4.9	10.0	
--	--	--	32.3	32.3	--	--	--	33.3	33.3	
--	--	23.8	--	23.8	--	--	23.1	--	23.1	
--	--	11.4	6.9	9.1	--	--	12.7	5.7	9.2	
40.1	36.6	--	--	38.3	41.4	40.6	--	--	41.0	
--	--	3.1	--	3.1	--	--	8.5	--	8.5	
19.2	19.4	--	--	19.3	23.3	22.1	--	--	22.7	
40.7	31.6	--	19.4	30.6	42.6	36.1	--	--	39.4	
--	--	36.0	11.9	24.0	37.1	--	--	--	24.0	
25.9	18.0	--	--	21.9	--	23.3	--	--	23.3	
43.8	43.8	41.7	--	43.1	45.8	45.8	43.6	--	45.1	
--	--	--	45.9	45.9	--	--	--	48.1	48.1	

Tabelle A1. Immunologische Distanzen der Einzeltests der verschiedenen Albumine gegen die jeweiligen Antiseren. Die Ermittlung der für die Berechnung der IDs erforderlichen Äquivalenzpunkte erfolgte in den meisten Einzeltests sowohl graphisch als auch mathematisch (siehe Abschnitt 3.4.). Aufgeführt sind die nach der in Abschnitt 3.7. beschriebenen statistischen Behandlung erhaltenen IDs. Sie dienen zur Errechnung der in Tab. 5. dargestellten Werte. Abkürzungen sind der Tab. 4. zu entnehmen.

Anti - V. xanthina - Albumin:

Art	Graphische Ermittlung					Mathematische Ermittlung				
	1.Test	2.Test	3.Test	4.Test	\bar{x}	1.Test	2.Test	3.Test	4.Test	\bar{x}
xa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ra	19.0	12.2	13.0	4.1	12.1	21.1	20.3	13.8	7.2	15.6
ll	25.9	15.1	30.5	12.9	21.1	30.8	18.5	24.8	19.7	23.5
lo	20.3	18.8	--	--	19.5	24.3	24.3	--	--	24.3
md	31.1	23.8	31.9	22.7	27.4	35.3	27.5	32.7	--	31.8
pa	--	--	14.5	3.6	9.0	--	--	15.2	4.9	10.0
rs	--	--	--	32.3	32.3	--	--	--	33.3	33.3
Pp	--	--	23.8	--	23.8	--	--	23.1	--	23.1
Pf	--	--	11.4	6.9	9.1	--	--	12.7	5.7	9.2
Er	40.1	36.6	--	--	38.3	41.4	40.6	--	--	41.0
bs	--	--	3.1	--	3.1	--	--	8.5	--	8.5
ni	19.2	19.4	--	--	19.3	23.3	22.1	--	--	22.7
aa	40.7	31.6	--	19.4	30.6	42.6	36.1	--	--	39.4
ao	--	--	36.0	11.9	24.0	37.1	--	--	--	24.0
am	25.9	18.0	--	--	21.9	--	23.3	--	--	23.3
Ep	43.8	43.8	41.7	--	43.1	45.8	45.8	43.6	--	45.1
Em	--	--	--	45.9	45.9	--	--	--	48.1	48.1

Anti - V. r. raddei - Albumin:

Art	Graphische Ermittlung					Mathematische Ermittlung				
	1.Test	2.Test	3.Test	4.Test	\bar{x}	1.Test	2.Test	3.Test	4.Test	\bar{x}
xa	--	--	0.3	4.7	2.5	0	2.1	0.3	5.9	2.8
ra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ll	12.4	--	17.3	--	14.9	4.7	24.6	14.6	--	14.6
lo	--	--	12.1	29.4	20.7	--	--	13.3	18.7	16.0
md	20.6	38.4	27.7	40.6	31.8	--	31.5	29.0	31.6	30.7
pa	10.2	16.1	--	18.1	14.8	4.5	7.1	--	6.5	6.0
rr	--	--	--	46.5	46.5	--	--	--	36.6	36.6
rs	--	--	41.3	45.6	43.5	--	--	41.9	37.6	39.7
Pf	--	--	12.1	25.4	18.8	--	--	11.2	15.2	13.2
Er	12.1	--	23.1	--	17.6	--	--	22.0	--	22.0
bs	--	8.8	--	--	8.8	--	3.3	--	--	3.3
aa	23.6	--	--	--	23.6	19.9	--	--	--	19.9
ah	--	24.0	8.6	--	16.3	--	17.0	7.9	--	12.5
ao	--	25.1	22.3	--	23.7	--	24.5	21.3	--	22.9
at	--	--	13.3	28.5	21.9	--	--	17.4	16.2	16.8
Ep	--	52.6	38.2	--	45.4	--	--	37.2	--	37.2
Em	--	--	--	43.5	43.5	--	--	--	32.3	32.3

Anti - V. l. lebetina - Albumin:

Art	Graphische Ermittlung					Mathematische Ermittlung						
	1.Test	2.Test	3.Test	4.Test	5.Test \bar{x}	1.Test	2.Test	3.Test	4.Test	5.Test \bar{x}		
xa	17.1	17.3	13.3	24.6	--	18.1	18.3	20.3	11.1	18.2	--	17.0
ra	33.1	26.7	13.3	19.9	--	23.3	36.6	27.9	9.9	14.4	--	22.2
ll	0	0	0	0	--	0	0	0	0	0	--	0
lt	0.0	0.0	6.5	8.0	--	3.6	0.0	0.0	3.0	0.0	--	0.7
lo	0.0	4.1	10.6	0.0	--	3.7	0.0	8.8	0.5	2.9	--	3.0
ls	3.4	15.5	10.4	14.1	12.5	11.8	--	6.6	9.2	19.8	10.7	11.3
md	--	23.5	20.5	21.8	--	21.9	44.9	28.3	19.1	12.4	--	26.2
pa	--	21.9	13.3	--	7.6	14.2	--	28.1	--	14.1	10.1	17.4
rs	--	--	--	19.4	20.7	20.1	--	--	--	13.8	18.8	16.3
Pf	--	--	--	20.5	21.1	20.8	--	--	--	12.7	22.8	17.7
Er	49.6	45.3	--	--	--	47.5	--	43.1	--	--	--	43.1
ao	--	35.5	30.1	--	--	32.8	--	33.9	32.2	--	--	33.0
am	16.7	--	--	--	--	16.7	17.9	--	--	--	--	17.9
at	--	--	8.0	--	--	8.0	--	--	7.2	--	--	7.2
El	71.2	--	--	--	--	71.2	71.0	--	--	--	--	71.0
Ep	--	59.2	24.6	--	--	41.9	--	59.2	--	--	--	59.2
Em	--	--	--	61.1	--	61.1	--	--	--	59.1	--	59.1

Anti - V. mauritanica deserti - Albumin:

Art	Graphische Ermittlung					Mathematische Ermittlung				
	1.Test	2.Test	3.Test	4.Test	\bar{x}	1.Test	2.Test	3.Test	4.Test	\bar{x}
xa	--	21.5	20.0	11.0	18.5	--	17.8	16.0	12.9	16.1
ra	33.7	--	15.1	12.4	23.8	26.1	--	15.5	10.2	19.5
ll	8.9	14.1	6.4	--	9.8	--	11.5	7.2	--	9.4
lt	--	18.2	10.2	--	14.2	--	0.8	10.6	--	5.7
lo	0.0	6.1	0.6	--	2.2	--	2.8	1.9	--	2.4
ls	7.4	--	4.2	6.7	6.5	--	--	2.7	8.0	5.3
md	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mm	8.2	11.3	--	--	9.8	0.4	10.5	--	--	5.5
pa	20.9	--	--	7.9	14.4	15.2	--	--	5.9	10.5
rr	--	--	--	13.4	13.4	--	--	--	12.9	12.9
rs	--	--	12.6	13.6	13.1	--	--	11.4	12.6	12.0
Pf	--	--	12.2	14.6	13.4	--	--	3.9	15.2	9.6
Er	36.1	10.5	--	--	23.3	30.7	9.9	--	--	20.3
ni	--	29.3	--	--	29.3	--	27.3	--	--	27.3
aa	--	37.3	--	--	37.3	--	36.0	--	--	36.0
af	30.8	--	--	--	30.8	--	22.5	--	--	22.5
ah	--	--	24.3	--	24.3	--	--	27.4	--	27.4
ao	--	31.3	--	--	31.3	--	29.6	--	--	29.6
am	42.1	--	21.9	--	32.0	32.4	--	24.9	--	28.7
at	--	--	32.1	22.2	27.2	--	--	34.0	23.3	28.7
El	40.2	--	--	--	40.2	34.7	--	--	--	34.7
Ep	--	30.7	27.4	--	29.1	--	27.3	29.6	--	28.5
Em	--	--	--	47.8	47.8	--	--	--	47.1	47.1

Anti - V. palaestinae - Albumin:

Art	Graphische Ermittlung					Mathematische Ermittlung				
	1.Test	2.Test	3.Test	4.Test	\bar{x}	1.Test	2.Test	3.Test	4.Test	\bar{x}
xa	21.0	14.9	16.7	16.0	17.2	18.2	14.9	15.6	14.7	15.9
ra	18.7	18.5	14.9	19.6	17.9	16.3	20.2	14.3	19.1	17.5
ls	--	--	30.4	29.3	29.8	--	28.1	20.3	27.1	25.2
md	18.1	18.5	14.8	20.1	17.8	15.5	19.1	16.9	20.7	18.0
pa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rr	--	--	27.7	27.8	27.7	--	--	17.1	27.2	22.2
rs	--	25.2	31.4	31.8	29.5	--	30.6	26.1	30.1	28.9
Pf	--	25.5	22.8	24.0	24.1	--	25.4	24.2	22.4	24.0
Er	--	34.2	--	--	34.2	--	38.9	--	--	38.9
ah	40.0	--	--	--	40.0	38.4	41.8	--	--	40.1
ao	27.4	20.7	--	--	24.0	25.6	19.7	--	--	22.6
at	29.2	--	36.0	33.2	32.8	27.6	--	38.5	32.7	32.9
Em	62.8	59.6	61.7	61.2	61.3	61.8	61.4	61.5	61.6	61.6

Anti - P. p. persicus - Albumin:

Art	Graphische Ermittlung					Mathematische Ermittlung				
	1.Test	2.Test	3.Test	4.Test	\bar{x}	1.Test	2.Test	3.Test	4.Test	\bar{x}
xa	--	--	7.6	6.6	7.1	--	--	5.9	12.9	9.2
ra	14.2	21.3	11.0	4.8	12.8	13.6	18.4	11.3	12.0	13.8
ll	19.4	12.7	--	--	16.1	--	12.9	--	--	12.9
lo	2.7	12.4	--	--	7.6	--	11.6	--	--	11.6
ls	--	--	6.3	2.9	4.6	--	--	7.4	8.1	7.7
md	--	15.7	--	2.0	8.8	--	11.8	0.8	5.6	6.1
pa	15.1	17.0	6.3	5.1	10.9	11.2	16.4	6.1	10.9	11.1
rr	--	--	18.3	--	18.3	--	--	15.3	--	15.3
rs	--	--	14.3	11.7	13.0	--	--	12.9	17.2	15.1
Pp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pf	--	--	9.5	3.3	6.4	--	--	7.9	7.4	7.6
Er	--	10.2	--	--	10.2	--	10.0	--	--	10.0
ni	--	21.3	--	--	21.3	--	19.6	--	--	19.6
aa	--	22.9	--	--	22.9	--	29.1	--	--	29.1
af	10.0	18.1	--	--	14.0	9.3	22.0	--	--	15.6
am	20.3	24.3	--	--	22.3	19.7	20.9	--	--	20.3
at	--	--	17.6	--	17.6	--	--	15.5	--	15.5
El	--	36.7	--	--	36.7	--	39.6	--	--	39.6
Em	--	--	27.0	28.9	27.9	--	--	15.0	33.0	24.0

Anti - E. leucogaster - Albumin:

Art	Graphische Ermittlung			Mathematische Ermittlung		
	1.Test	2.Test	\bar{x}	1.Test	2.Test	\bar{x}
xa	60.7	47.4	54.0	60.9	55.1	58.0
ra	--	57.5	57.5	--	56.0	56.0
ls	67.9	63.6	65.8	67.4	65.1	66.3
md	--	67.8	67.8	--	68.6	68.6
pa	56.7	--	56.7	68.5	--	68.5
Pf	55.1	52.6	53.9	--	49.1	49.1
Er	69.2	--	--	70.0	--	70.0
ah	--	52.8	52.8	--	59.1	59.1

Tabelle A2. Angleichung der unterschiedlichen Differenzierungsfähigkeit der Antiseren unter Verwendung der Matrix der reziproken IDs nach der Methode von SARICH & CRONIN (1976) (siehe Abschnitt 3.9. und 4.1.2.1.). Die zur Korrektur verwendeten Zeilensumme / Spaltensumme-Indizes sind jeweils unterstrichen.

	Antiseren:							Σ Zeile:
	xa	ra	ll	md	pa	Pp	El	
Albumine:								
xa	0	2.6	17.5	17.4	16.5	8.1	56.0	118.1
ra	13.8	0	22.8	21.6	17.7	13.3	56.7	145.9
ll	22.1	16.6	0	6.8	27.5	10.1	66.0	149.1
md	29.6	31.3	23.5	0	17.9	7.4	68.2	177.9
pa	9.5	10.4	15.8	12.5	0	11.0	56.7	115.9
Pp	16.4	16.0	19.3	11.5	24.1	0	51.5	138.8
El	45.5	39.6	60.6	37.9	61.4	32.1	0	277.1
Σ Spalte:	136.9	116.5	159.5	107.7	165.1	82.0	355.1	
Index:	0.86	1.25	0.93	1.65	0.70	<u>1.69</u>	0.78	

1. Korrektur

xa	0	2.6	17.5	17.4	16.5	13.7	56.0	123.7
ra	13.8	0	22.8	21.6	17.7	22.5	56.7	155.1
ll	22.1	16.6	0	6.8	27.5	17.1	66.0	156.1
md	29.6	31.3	23.5	0	17.9	12.5	68.2	183.0
pa	9.5	10.4	15.8	12.5	0	18.6	56.7	123.5
Pp	16.4	16.0	19.3	11.5	24.1	0	51.5	138.8
El	45.5	39.6	60.6	37.9	61.4	54.2	0	299.2
Σ Spalte:	136.9	116.5	159.5	107.7	165.1	138.6	355.1	
Index:	0.90	1.33	0.98	<u>1.70</u>	0.75	1.00	0.84	

2. Korrektur

xa	0	2.6	17.5	29.6	16.5	13.7	56.0	135.9
ra	13.8	0	22.8	36.7	17.7	22.5	56.7	170.2
ll	22.1	16.6	0	11.6	27.5	17.1	66.0	160.8
md	29.6	31.3	23.5	0	17.9	12.5	68.2	183.0
pa	9.5	10.4	15.8	21.3	0	18.6	56.7	132.2
Pp	16.4	16.0	19.3	19.6	24.1	0	51.5	146.9
El	45.5	39.6	60.6	64.4	61.4	54.2	0	325.8
Σ Spalte:	136.9	116.5	159.5	183.1	165.1	138.6	355.1	
Index:	0.99	<u>1.46</u>	1.01	1.00	0.80	1.06	0.92	

Antiseren:

xa ra ll md pa Pp El

Albumine:

 Σ Zeile:3. Korrektur

xa	0	3.8	17.5	29.6	16.5	13.7	56.0	137.1
ra	13.8	0	22.8	36.7	17.7	22.5	56.7	170.2
ll	22.1	24.2	0	11.6	27.5	17.1	66.0	168.5
md	29.6	45.7	23.5	0	17.9	12.5	68.2	197.4
pa	9.5	15.2	15.8	21.3	0	18.6	56.7	137.0
Pp	16.4	23.4	19.3	19.6	24.1	0	51.5	154.2
El	45.5	57.8	60.6	64.4	61.4	54.2	0	344.0

Σ Spalte: 136.9 170.1 159.5 183.1 165.1 138.6 355.1

Index: 1.00 1.00 1.06 1.08 0.83 1.11 0.97

4. Korrektur

xa	0	3.8	17.5	29.6	13.7	13.7	56.0	134.3
ra	13.8	0	22.8	36.7	14.7	22.5	56.7	167.2
ll	22.1	24.2	0	11.6	22.8	17.1	66.0	163.8
md	29.6	45.7	23.5	0	14.9	12.5	68.2	194.4
pa	9.5	15.2	15.8	21.3	0	18.6	56.7	137.0
Pp	16.4	23.4	19.3	19.6	20.0	0	51.5	150.1
El	45.5	57.8	60.6	64.4	51.0	54.2	0	333.6

Σ Spalte: 136.9 170.1 159.5 183.1 137.0 138.6 355.1

Index: 0.98 0.98 1.03 1.06 1.00 1.08 0.94

5. Korrektur

xa	0	3.8	17.5	29.6	13.7	14.8	56.0	135.4
ra	13.8	0	22.8	36.7	14.7	24.3	56.7	169.0
ll	22.1	24.2	0	11.6	22.8	18.4	66.0	165.2
md	29.6	45.7	23.5	0	14.9	13.5	68.2	195.4
pa	9.5	15.2	15.8	21.3	0	20.1	56.7	138.5
Pp	16.4	23.4	19.3	19.6	20.0	0	51.5	150.1
El	45.5	57.8	60.6	64.4	51.0	58.6	0	337.9

Σ Spalte: 136.9 170.1 159.5 183.1 137.0 149.7 355.1

Index: 0.99 0.99 1.04 1.07 1.01 1.00 0.95

	xa	ra	Antiseren:			Pp	El	
			ll	md	pa			
Albumine:								Σ Zeile:
<u>6. Korrektur</u>								
xa	0	3.8	17.5	31.7	13.7	14.8	56.0	137.4
ra	13.8	0	22.8	39.3	14.7	24.3	56.7	171.6
ll	22.1	24.2	0	12.4	22.8	18.4	66.0	166.0
md	29.6	45.7	23.5	0	14.9	13.5	68.2	195.4
pa	9.5	15.2	15.8	22.7	0	20.1	56.7	140.0
Pp	16.4	23.4	19.3	20.9	20.0	0	51.5	151.5
El	45.5	57.8	60.6	68.9	51.0	58.6	0	342.4
Σ Spalte:	136.9	170.1	159.5	195.9	137.0	149.7	355.1	
Index:	1.00	1.01	<u>1.04</u>	1.00	1.02	1.01	0.96	
<u>7. Korrektur</u>								
xa	0	3.8	18.2	31.7	13.7	14.8	56.0	138.1
ra	13.8	0	23.7	39.3	14.7	24.3	56.7	172.5
ll	22.1	24.2	0	12.4	22.8	18.4	66.0	166.0
md	29.6	45.7	24.4	0	14.9	13.5	68.2	196.3
pa	9.5	15.2	16.4	22.7	0	20.1	56.7	140.6
Pp	16.4	23.4	20.1	20.9	20.0	0	51.5	152.3
El	45.5	57.8	63.0	68.9	51.0	58.6	0	344.8
Σ Spalte:	136.9	170.1	165.9	195.9	137.0	149.7	355.1	
Index:	1.01	1.01	1.00	1.00	1.03	1.02	<u>0.97</u>	
<u>8. Korrektur</u>								
xa	0	3.8	18.9	31.7	13.7	14.8	54.3	137.2
ra	13.8	0	24.7	39.3	14.7	24.3	55.0	171.7
ll	22.1	24.2	0	12.4	22.8	18.4	64.0	164.0
md	29.6	45.7	25.4	0	14.9	13.5	66.2	195.2
pa	9.5	15.2	17.1	22.7	0	20.1	55.7	139.6
Pp	16.4	23.4	20.9	20.9	20.0	0	50.5	151.5
El	45.5	57.8	65.5	68.9	51.0	58.6	0	347.4
Σ Spalte:	136.9	170.1	172.5	195.9	137.0	149.7	344.4	
Index:	1.00	1.01	<u>0.95</u>	1.00	1.02	1.01	1.00	

	Antiseren:							Σ Zeile:
	xa	ra	ll	md	pa	Pp	El	
Albumine:								

9. Korrektur

xa	0	3.8	18.0	31.7	13.7	14.8	52.7	134.6
ra	13.8	0	23.4	39.3	14.7	24.3	53.3	168.8
ll	22.1	24.2	0	12.4	22.8	18.4	62.1	162.1
md	29.6	45.7	24.1	0	14.9	13.5	64.2	192.0
pa	9.5	15.2	16.2	22.7	0	20.1	53.3	137.1
Pp	16.4	23.4	19.8	20.9	20.0	0	48.5	149.0
El	45.5	57.8	62.3	68.9	51.0	58.6	0	344.1

Σ Spalte: 136.9 170.1 163.9 195.9 137.0 149.7 344.4

Index: 0.98 0.99 1.00 0.98 1.00 1.00 1.03

10. Korrektur

xa	0	3.8	18.0	31.7	13.7	14.8	54.3	136.2
ra	13.8	0	23.4	39.3	14.7	24.3	54.9	170.4
ll	22.1	24.2	0	12.4	22.8	18.4	64.0	163.9
md	29.6	45.7	24.1	0	14.9	13.5	66.1	193.9
pa	9.5	15.2	16.2	22.7	0	20.1	54.9	138.7
Pp	16.4	23.4	19.8	20.9	20.0	0	49.9	150.4
El	45.5	57.8	62.3	68.9	51.0	58.6	0	344.1

Σ Spalte: 136.9 170.1 163.9 195.9 137.0 149.7 344.1

Index: 0.99 1.00 1.00 0.99 1.01 1.01 1.00

11. Korrektur

xa	0	3.8	18.0	31.7	13.8	14.8	54.3	136.3
ra	13.8	0	23.4	39.3	14.8	24.3	54.9	170.6
ll	22.1	24.2	0	12.4	23.1	18.4	64.0	164.2
md	29.6	45.7	24.1	0	15.0	13.5	66.1	194.1
pa	9.5	15.2	16.2	22.7	0	20.1	54.9	138.7
Pp	16.4	23.4	19.8	20.9	20.2	0	49.9	150.6
El	45.5	57.8	62.3	68.9	51.5	58.6	0	344.6

Σ Spalte: 136.9 170.1 163.9 195.9 138.4 149.7 344.1

Index: 1.00 1.00 1.00 0.99 1.00 1.01 1.00

	Antiseren:							
	xa	ra	ll	md	pa	Pp	El	
Albumine:								Σ Zeile:

12. Korrektur

xa	0	3.8	18.0	31.7	13.8	14.9	54.3	136.5
ra	13.8	0	23.4	39.3	14.8	24.5	54.9	170.8
ll	22.1	24.2	0	12.4	23.1	18.6	64.0	164.3
md	29.6	45.7	24.1	0	15.0	13.6	66.1	194.2
pa	9.5	15.2	16.2	22.7	0	20.3	54.9	138.9
Pp	16.4	23.4	19.8	20.9	20.2	0	49.9	150.6
El	45.5	57.8	62.3	68.9	51.5	59.2	0	345.2
Σ Spalte:	136.9	170.1	163.9	195.9	138.4	151.2	344.1	
Index:	1.00	1.00	1.00	<u>0.99</u>	1.00	1.00	1.00	

13. Korrektur

xa	0	3.8	18.0	31.3	13.8	14.9	54.3	136.1
ra	13.8	0	23.4	38.9	14.8	24.5	54.9	170.4
ll	22.1	24.2	0	12.2	23.1	18.6	64.0	164.2
md	29.6	45.7	24.1	0	15.0	13.6	66.1	194.2
pa	9.5	15.2	16.2	22.5	0	20.3	54.9	138.7
Pp	16.4	23.4	19.8	20.7	20.2	0	49.9	150.4
El	45.5	57.8	62.3	68.3	51.5	59.2	0	344.5
Σ Spalte:	136.9	170.1	163.9	193.9	138.4	151.2	344.1	
Index:	<u>0.99</u>	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	1.00	

14. Korrektur

xa	0	3.8	18.0	31.3	13.8	14.9	54.3	136.1
ra	13.7	0	23.4	38.9	14.8	24.5	54.9	170.3
ll	21.9	24.2	0	12.2	23.1	18.6	64.0	164.0
md	29.3	45.7	24.1	0	15.0	13.6	66.1	193.9
pa	9.4	15.2	16.2	22.5	0	20.3	54.9	138.6
Pp	16.2	23.4	19.8	20.7	20.2	0	49.9	150.2
El	45.0	57.8	62.3	68.3	51.5	59.2	0	344.0
Σ Spalte:	135.5	170.1	163.9	193.9	138.4	151.2	344.1	
Index:	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	<u>0.99</u>	1.00	

Hiermit versichere ich, daß die vorliegende Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Benutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Marburg, den 14.05.1990

Klaus-Dew Klaus