

Ringelnattern im Naturlehrgebiet Ettiswil

Barbara Meister, Institut für Natur-, Landschafts- und Umweltschutz der Universität Basel

Ausgangslage

Die Ringelnattern im Naturlehrgebiet Ettiswil sind allochthon, d.h. sie sind nicht einheimisch. Die Tiere wurden ausgesetzt und sind wahrscheinlich südosteuropäischen Ursprungs (siehe Voruntersuchung von ecogenics). Im Rahmen des Artenhilfsprogramms Ringelnatter haben sich die Fachbegleiter für das Abfangen der allochthonen Tiere entschlossen. Die Gründe dafür sind vielgestaltig. Da das Konzept des Naturlehrgebiets auf der einheimischen Flora und Fauna basiert, vermitteln die allochthonen Ringelnattern ein falsches Bild. Zudem besteht das Risiko, dass die ausgesetzten Tiere Krankheitserreger auf die einheimischen übertragen könnten und es zu einer genetischen Vermischung kommen könnte. Durch das Abfangen der allochthonen Tiere werden diese Risiken minimiert. Da die Anzahl und die Verbreitung der allochthonen Ringelnattern zurzeit noch überschaubar ist, muss jetzt gehandelt werden, um gute Erfolgschancen zu haben. Zudem könnte die Ausbreitung der ausgesetzten Ringelnattern durch die geplanten Vernetzungsprojekte gefördert werden, wodurch sich die Problematik auf ein grösseres Areal ausdehnen würde.

Die ausgesetzten Ringelnattern können teilweise aufgrund ihrer Phänologie von den einheimischen unterschieden werden. Es gibt aber auch Tiere, die intermediäre Merkmale zeigen und daher nicht klar zugeordnet werden können. Es stellt sich die Frage, ob diese Tiere individuell abweichen oder ob es sich um genetisch vermischte Tiere handelt. Doch auch bei jenen Ringelnattern, die optisch ihrem Herkunftsort zugeordnet werden können, kann eine genetische Vermischung nicht ausgeschlossen werden. Dies kann nur mit genetischen Methoden untersucht werden. Mikrosatelliten sind hoch variable genetische Marker, die benötigt werden, um genetische Unterschiede zu entdecken und zu beschreiben. Im Rahmen meiner Dissertation wurden Mikrosatelliten für die Ringelnatter entwickelt (Meister et al. 2009) und für die Bearbeitung verschiedener Fragestellungen, wie z.B. der genetischen Populationsstruktur in einem Agrargebiet (Meister et al. 2010), verwendet.

Vorgehen

Um eine genetische Vermischung mit den einheimischen Ringelnatter feststellen zu können, müssen sowohl allochthone als auch autochthone Tiere beprobt werden. Im Rahmen dieser Studie wurden alle gefangenen allochthonen Ringelnattern beprobt. Zudem wurden die umliegenden einheimischen Populationen beprobt, da dort am ehesten mit einer Vermischung zu

rechnen ist. Im Raum Luzern wurden ebenfalls Tiere als sogenannte "outgroup" beprobt. Diese dienen als Referenz für genetisch reine einheimische Tiere.

Methoden

Für die genetischen Analysen wurden den gefangenen Ringelnattern die Ränder einiger Bauchschilder abgeschnitten. Diese wurden in 80% Ethanol aufbewahrt. Museumspräparate aus der Region sowie Totfunde und Häutungen wurden ebenfalls beprobt.

Die DNA-Extraktion und DNA-Vervielfältigung wurden mit denselben Methoden und Chemikalien durchgeführt wie in Meister et al. (im Druck) beschrieben. Die Genotypisierung erfolgt mit acht Mikrosatelliten (Natnat01, Natnat05, Natnat06, Natnat09, Natnat11, μ Nt3, μ Nt7 und μ Nt8new; Meister et al., 2009). Die vervielfältigte DNA wurde auf Spreadex[®] EL-400 oder EL-600 Gele aufgetragen und die unterschiedlichen Allele mittels Elektrophorese aufgetrennt und mit anschliessender Färbung sichtbar gemacht. Diese Methode wird auch bei Vaterschaftstests angewendet.

Die genetischen Daten wurden mit GENEPOP (<http://genepop.curtin.edu.au>; Raymond und Rousset, 1995) auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG¹) getestet. Die Unterteilung der Population wurde mit dem Programm STRUCTURE (Version 2.3.3; Pritchard et al., 2000) ausgewertet. STRUCTURE berechnet aufgrund des genetischen Musters Ähnlichkeiten und gruppiert die Individuen in Populationen. Mit Hilfe der berechneten Wahrscheinlichkeiten kann ermittelt werden, in wie viele Populationen die Tiere aufgeteilt werden können. Zudem kann STRUCTURE Hybriden zwischen zwei Gruppen, in diesem Fall zwischen den allochthonen und den autochthonen Tieren entdecken. Die räumliche Verteilung der beprobten Tiere wird dabei nicht berücksichtigt. Daher wurden die Daten auch mit dem Programm GENELAND (Version 3.0.2, R Version 2.7.2; Guillot et al., 2005), das die Koordinaten der Fundorte berücksichtigt, analysiert. Die genetische Differenzierung der Populationen, ausgedrückt als F_{ST}^2 , wurde mit FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995) berechnet.

Resultate

Gesamthaft wurden 61 Ringelnattern beprobt (die Proben Nr. 14 und 40 sind vom selben Individuum). Bei fünf Proben konnte die DNA aber nicht amplifiziert werden. Daher wurden insgesamt 56 Tiere genotypisiert, wovon 12 Ringelnattern gemäss ihrer Phänologie zur allochthonen und 44 zur autochthonen Population gehören. Die genetische Vielfalt der Populationen in Luzern ist vergleichbar mit jener in anderen Gebieten der Schweiz. Vier der acht getesteten Mikrosatelliten wichen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab, was möglicherweise auf die kleine Stichprobengrösse zurückzuführen ist. Da die Programme, die für die Analyse des genetischen Musters verwendet wurden, auf der Annahme beruhen, dass die Populationen im HWG sind, wurden die Analysen sowohl mit allen acht Mikrosatelliten, als auch für die vier Mikrosatelliten, die im HWG sind, durchgeführt.

Die Schlussfolgerung aus beiden Analysen ist dieselbe. Deshalb wird nachfolgend nur auf den Datensatz von acht Mikrosatelliten eingegangen. STRUCTURE teilte die Tiere in drei Populationen ein, wobei die phänotypisch allochthonen einer Population zugeteilt und die autochthonen Tiere in zwei Populationen eingeteilt wurden (Abb. 1a, c). Allerdings konnten die autochthonen Individuen nicht eindeutig einer Population zugeteilt werden. Sie wurden jeweils mit einer Wahrscheinlichkeit von 40–60 % einer Population zugeteilt. Evanno et al. (2005) fanden mittels Simulationen heraus, dass STRUCTURE die maximale Anzahl Populationen abschätzt. Deshalb wurden die Resultate nach dem Vorschlag von Evanno et al. (2005) korrigiert. Nach dieser Korrektur werden die Individuen in zwei Populationen eingeteilt, in eine allochthone und eine autochthone Population (Abb. 1b, d). Bei zwei eingeführten Populationen teilt STRUCTURE die Tiere in eine allochthone und eine autochthone Population ein (Abb. 1d). GENELAND teilt die Tiere ebenfalls in zwei Populationen auf, eine bestehend aus den allochthonen und die andere aus den autochthonen Tieren. Die genetische Differenzierung zwischen den beiden Populationen (F_{ST} Wert von 0.27) war hochsignifikant ($P < 0.001$).

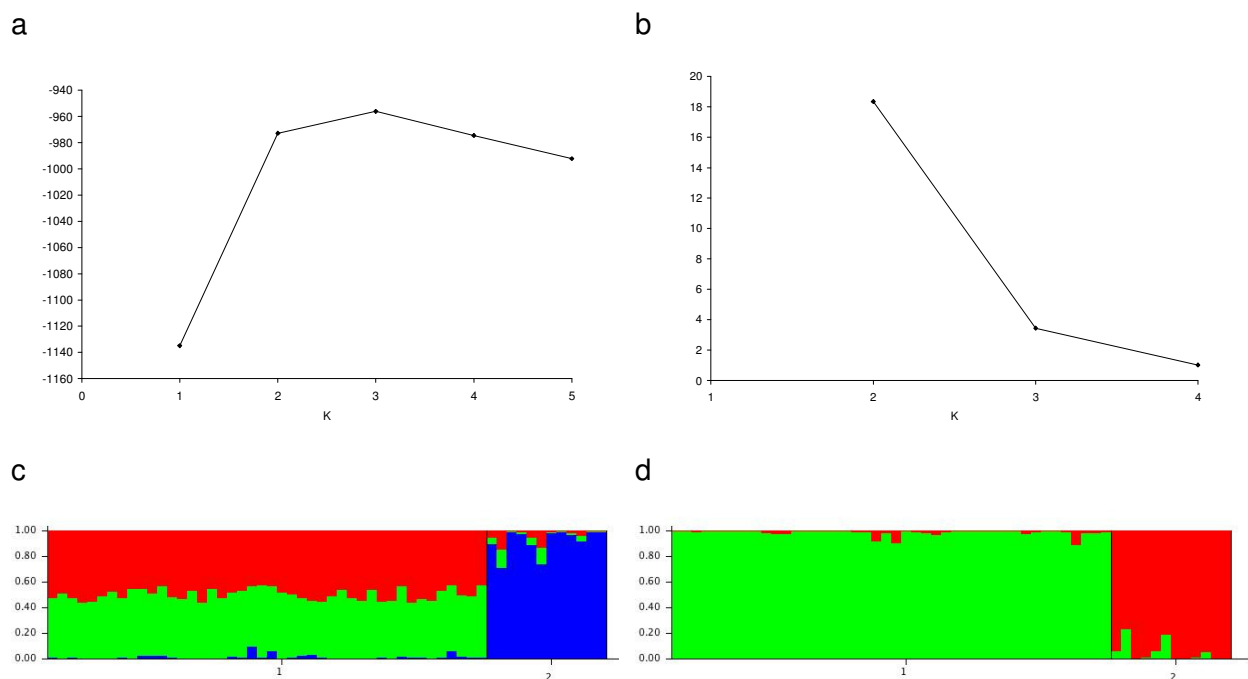


Abbildung 1: STRUCTURE teilte die Tiere in drei Populationen ein ($K = 3$; a). Nach der Korrektur nach Evanno et al. (2005) zeigt sich jedoch, dass es sich um zwei Populationen handelt ($K = 2$; b). Bei drei eingeführten Populationen werden die allochthonen Tiere in eine Population eingeteilt (2 in c und d), und die allochthonen in zwei Populationen (c). Allerdings können die Individuen nicht eindeutig einer Population zugeordnet werden. Sie werden jeweils mit einer Wahrscheinlichkeit von 40–60 % einer der beiden Populationen zugeordnet. Bei der Aufteilung in zwei Populationen werden wiederum die allochthonen einer Population und die allochthonen der zweiten Population zugeordnet (d).

Diskussion

Die Ergebnisse der Mikrosatelliten deuten darauf hin, dass sich die allochthone Population nicht oder nur in einem geringen Mass (hier nicht entdeckt) mit der autochthonen vermischt hat. Mit einer grösseren Anzahl beprobter Tiere könnte diese Aussage besser belegt werden.

Meister et al. (2010) konnten keine genetische Differenzierung in einer Ringelnatterpopulation in einem intensiv landwirtschaftlich genutztem Gebiet (Grosses Moos) über eine Distanz von 14 km finden. Auch über eine grössere Distanz von 100 km konnten keine Strukturen ausgemacht werden, die die Ausbreitung der Ringelnatter unterbinden würden (Meister et al. im Druck). Die gefundene Differenzierung zwischen den untersuchten Populationen kann mit Isolation durch Distanz erklärt werden. Dieser Effekt tritt auch in natürlichen Lebensräumen auf und ist nicht auf den Menschen oder eine Fragmentierung des Lebensraumes zurückzuführen. Die beiden vorgenannten Studien haben gezeigt, dass die Ringelnatter sich gut in der Landschaft bewegen kann und eine beachtliche Ausbreitungsleistung aufweist. So zeigten auch Wisler et al. (2008), dass weibliche Ringelnattern bis zu 500 m zurücklegten, um geeignete Eiablagestellen zu erreichen. Aufgrund dieser Befunde ist zu erwarten, dass sich auch die allochthonen Ringelnattern gut ausbreiten können. Dies würde eine Vermischung mit den umliegenden einheimischen Populationen begünstigen. Diese Studie hat nun aber gezeigt, dass bisher keine Vermischung stattgefunden hat. Auch der relativ grosse und hoch signifikante F_{ST} Wert zwischen den beiden hier untersuchten Populationen unterstreicht diesen Befund. Meister et al. (im Druck) fanden zwischen den Ringelnatterpopulationen im Grossen Moos und im Gadmental im Vergleich dazu einen F_{ST} von 0.16. Diese Populationen sind 100 km voneinander entfernt, während die Populationen in dieser Studie nur wenige Kilometer voneinander entfernt sind. Im Aussetzungsgebiet gab es vor der Einführung keine einheimischen Ringelnattern. Da es sich bei diesem Gebiet um ein geeignetes Ringelnatternhabitat handelt, gab es für die ausgesetzten Tiere keinen Grund, dieses zu verlassen. Steigt die Populationsgrösse jedoch an und erreicht die Tragkapazität des Gebietes, ist ein Abwandern einiger Tiere sehr wahrscheinlich. Da es in der nächsten Umgebung keine grösseren autochthonen Populationen gibt, wurde eine genetische Vermischung bisher nicht begünstigt. Durch die geplanten Vernetzungsprojekte im Rahmen des Artenhilfsprogramms für die Ringelnatter wird die Durchlässigkeit der Landschaft erhöht und eine genetische Vermischung der allochthonen mit den autochthonen wahrscheinlicher. In Grossbritannien wurden ebenfalls Ringelnattern ausgesetzt (Nash, 2011). Die rumänische Population existiert seit 20 Jahren und eine Vermischung mit den einheimischen Tieren konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (untersucht wurden vier mitochondriale Gene und morphometrische Merkmale; allerdings kann eine genetische Vermischung mit mitochondrialen Genen alleine nicht festgestellt werden). Im Britischen Aussetzungsgebiet gibt es ebenfalls keine einheimischen Ringelnattern, wodurch eine Vermischung nicht begünstigt wurde. Die allochthonen Tiere dieser Studie gehören der Unterart *Natrix natrix persa* und die autochthonen Tiere der Unterart *Natrix natrix helvetica* an (siehe Voruntersuchung von ecogenics). Diese beiden Unterarten haben sich

vor ungefähr 4–5 Mio. Jahren getrennt (Guicking et al., 2008). Es ist denkbar, dass gewisse Fortpflanzungsbarrieren bestehen. Diese dürften allerdings nicht allzu stark sein, da auch schon Hybriden zwischen *N. natrix* und *N. tessellata* gefunden wurden, wobei deren Überlebensfähigkeit reduziert war. Diese beiden Arten haben sich bereits vor 16–19 Mio. Jahren getrennt (Guicking et al., 2008). Wenn es zu einem Zusammenschluss der Populationen und zu Kreuzungen kommt, könnten die lokal angepassten Genotypen der einheimischen Ringelnattern verfälscht werden und dadurch der Fortpflanzungserfolg reduziert werden (outbreeding depression).

Aufgrund dieser Befunde sollten alle allochthonen Tiere abgefangen werden, bzw. das Abfangen fortgesetzt werden. Da es sich bei der Ringelnatter nicht um eine stark gefährdete Art handelt, sollten so viele ausgesetzte Tiere wie möglich aus dem Gebiet entfernt werden. Zudem könnte man die Wegfänge messen. Werden die Tiere im Laufe der Zeit kleiner, ist dies ein Zeichen dafür, dass weniger alte Tiere im Gebiet leben.

Literatur

- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of cluster of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- Goudet J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485–486.
- Guicking D, Joger U, Wink M. 2008. Molekulare Phylogenie und Entwicklungsgeschichte der Gattung *Natrix*, mit Bemerkungen zur innerartlichen Gliederung von *N. natrix*. *Mertensiella* 17: 16–30.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A. 2005. GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5: 712–715.
- Meister B, Armbruster GFJ, Frauenfelder N, Baur B. 2009. Novel microsatellite loci in the grass snake (*Natrix natrix*) and cross-amplification in the dice snake (*Natrix tessellata*). *Molecular Ecology Resources* 9: 604–606.
- Meister B, Hofer U, Ursenbacher S, Baur B. 2010. Spatial genetic analysis of the grass snake, *Natrix natrix* (Squamata: Colubridae), in an intensively used agricultural landscape. *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 51–58.
- Meister B, Ursenbacher S, Baur B. Grass snake population differentiation over different geographic scales. *Herpetologica*, im Druck.
- Nash DJ. 2011. Assessment of an established population of atypical grass snakes *Natrix natrix* in the Aire Valley, UK. *Herpetological Bulletin* 115: 12–16.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248–249.
- Wisler C, Hofer U, Arlettaz R. 2008. Snakes and monocultures: habitat selection and

movements of female grass snakes (*Natrix natrix* L.) in an agricultural landscape. *Journal of Herpetology* 42: 337–346.

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Adrian Borgula, Max Bütler und allen weiteren Herpetologen, die die Proben gesammelt und für diese Studie zur Verfügung gestellt haben. Des Weiteren danke ich Jörg Gensch und dem Kanton Luzern, Landwirtschaft und Wald, Abteilung Natur und Landschaft für die Auftragserteilung und Finanzierung. Bruno Baur und Sylvain Ursenbacher für das Gegenlesen des Berichtes und dem Institut für Natur-, Landschafts- und Umweltschutz (NLU) für die Benützung des molekulargenetischen Labors.

Glossar

¹HWG: Eine ideale Population befindet sich im Gleichgewicht, wenn keine Evolution stattfindet, d.h. es gibt keine Mutation, keine Selektion, keine Migration, alle Paarungen sind gleich wahrscheinlich, und aufgrund der grossen Individuenzahl gibt es keine Zufallseffekte wie z.B. genetische Drift.

²F_{ST} Der Fixierungs-Index (F_{ST}) wird zur Messung der genetischen Differenzierung zwischen Populationen verwendet. Er ist ein Mass für die genetische Vielfalt innerhalb einer Sub-Population relativ zur genetischen Vielfalt in der Gesamtpopulation. Die Werte liegen zwischen 0 und 1. Ein Wert von null bedeutet, dass sich die Tiere der beiden Populationen frei kreuzen. Ein Wert von eins bedeutet, dass die zwei Populationen komplett voneinander getrennt sind.