

DNA-Barcoding der Amphibien und Reptilien Deutschlands

Oliver Hawlitschek^{1,2}, Michael Franzen² & Frank Glaw²

¹Institut de Biologia Evolutiva (CSIC-UPF), Passeig Marítim de la Barceloneta 37, ES-08003 Barcelona, oliver.hawlitschek@gmx.de

²Zoologische Staatssammlung München (ZSM-SNSB), Münchhausenstr. 21, D-81247 München, michael.franzen@zsm.mwn.de, frank.glaw@zsm.mwn.de

DNA barcoding of the amphibians and reptiles of Germany

DNA barcoding is a method for species identification in all organisms using a short, standardized DNA fragment, the so-called barcode. In science, barcoding is particularly useful for identifying eggs or larvae whose identification is otherwise difficult, and for detecting cryptic species. Other applications include the rapid detection of newly introduced species of pests and parasites. However, the successful use of barcoding requires a genetic database based on reliably identified reference sequences. Hawlitschek et al. (2016) present such a database for the herpetofauna of Germany. All species except the hybridogenic green frog complex could be safely identified using barcodes. Subspecies could also be identified in fire salamanders and grass snakes. Furthermore, distinct genetic lineages without any current taxonomic status were identified in grass snakes, adders, and wall lizards. These lineages were tentatively assigned to clades with geographic references detected in previous works. Concludingly, DNA barcoding will likely extend its influence on many fields of application also in herpetology.

Key words: COI Barcoding, identification, amphibians, reptiles, Germany, Bavaria.

Zusammenfassung

DNA-Barcoding ist eine Methode zur Artbestimmung aller Organismen an Hand eines kurzen, standardisierten Fragments ihrer DNA, dem sogenannten Barcode. Barcoding ist im wissenschaftlichen Bereich besonders nützlich bei der Bestimmung schwer determinierbarer Eier- und Larvenstadien und der Entdeckung kryptischer Arten (Abb. 1, 2). Die Methode kann z. B. ohne Spezialwissen zur raschen Erfassung neu eingeschleppter Arten von Schädlingen und Parasiten genutzt werden. Zum erfolgreichen Einsatz des Barcoding ist aber eine genetische Datenbank sicher bestimmter Referenzsequenzen nötig. In der Arbeit von Hawlitschek et al. (2016) wird eine solche Datensammlung für die deutsche Herpetofauna vorgestellt. Mit Ausnahme des Hybridkomplexes der Wasserfrösche konnten alle Arten eindeutig durch Barcodes bestimmt werden. Auch die Bestimmung von Unterarten bei Feuersalamander und Ringelnatter war möglich. Über die bestehende Taxonomie hinaus konnten genetische Linien z. B. bei Ringelnatter, Kreuzotter und Mauereidechse identifiziert werden, die in Anlehnung an bereits bestehende Arbeiten versuchsweise in einen geographischen Bezug gesetzt wurden. DNA Barcoding ist eine zukunfts-trächtige Methode, die voraussichtlich weiteren Eingang in viele Anwendungsbereiche auch in der Herpetologie finden wird.

Schlüsselbegriffe: COI-Barcoding, Bestimmung, Amphibien, Reptilien, Deutschland, Bayern.

Einleitung

Der kürzlich erschienene Artikel „Comprehensive DNA barcoding of the herpetofauna of Germany“ (Hawlitschek et al. 2016) beschreibt die Ergebnisse einer vorwiegend an der Zoologischen Staatssammlung München (ZSM) durchgeführten genetischen Studie über die Herpetofauna Deutschlands mit einem Schwerpunkt auf Bayern. Ziele des hier vorliegenden Artikels sind, die zuvor genannte Arbeit in deutscher Sprache zusammenzufassen, Hintergründe und Anwendungsmöglichkeiten des DNA Barcoding zu erklären und für die bayerische Herpetofauna relevante Ergebnisse spezifisch zu beleuchten.

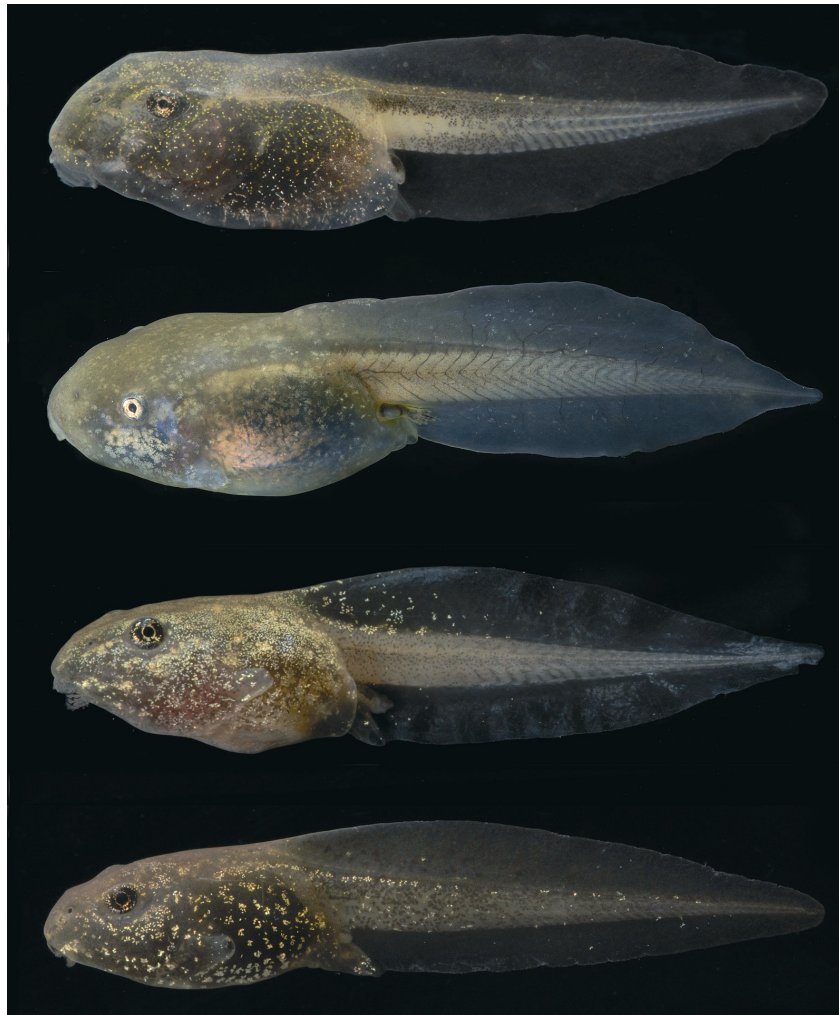


Abb. 1: Die Bestimmung von Amphibienlarven nach äußeren Merkmalen ist bei älteren Stadien oft gut möglich. Im Bild von oben nach unten: Gelbbauchunke, Knoblauchkröte, Moorfrosch, Grasfrosch. The identification of larval amphibians using external characters is often easy in older developmental stages. From top to bottom: yellow-bellied toad, common spadefoot, moor frog, common frog.



Abb. 2: Bei jungen Larven und Eiern stößt die Bestimmung nach äußeren Merkmalen häufig an ihre Grenzen (links oben nach rechts unten: Teichmolch, Moorfrosch, Knoblauchkröte, Wechselkröte). DNA-Barcoding bietet in solchen Fällen eine verlässliche Alternative.

The morphological identification of young larval stages or even eggs of amphibians can be rather challenging (top left to bottom right: common newt, moor frog, common spadefoot, green toad). DNA barcoding provides a reliable alternative for such cases.

Was ist DNA-Barcoding?

Die korrekte Zuordnung von Individuen zu formell beschriebenen Arten ist eine der wesentlichen Grundlagen der Biologie. Bei derzeit mindestens ca. 1,5 Millionen beschriebenen Arten von Organismen weltweit (Costello et al. 2013) ist dies jedoch keine leichte Aufgabe. Mit Ausnahme eines verschwindend geringen Anteils können viele Arten nur von Experten bestimmt werden, von denen es aber nur wenige gibt. Die Betrachtung praktisch jeder zoologischen Sammlung zeigt zudem schnell auf, dass auch Experten gelegentlich Fehler bei der Artbestimmung unterlaufen, deren Konsequenzen dann über Jahrzehnte in der Literatur sichtbar sind und die auch die Ergebnisse von Folgestudien z. B. in den Bereichen der Ökologie und des Naturschutzes verfälschen (Bortolus 2008). Solange also eine Artbestimmung nur auf dem bisher üblichen morphologischen Weg durch Experten möglich ist, ist ein Großteil der eigentlich vorliegenden taxonomischen Kenntnis in der Praxis kaum zugänglich.

Seit ab den 1990er Jahren molekulargenetische Methoden in der systematischen Biologie weitere Verbreitung fanden, suchten Wissenschaftler auch nach Möglichkeiten, diese Methoden zur Artbestimmung einzusetzen. Prinzipiell ist dies möglich, da sich ja bereits Individuen sexuell reproduzierender Arten in ihrem Erbmateriale (ihrer DNA) unterscheiden und somit umso größere Unterschiede zwischen Arten vorliegen. Vollständige Genome, also komplette Sätze der DNA eines Individuums, enthalten jedoch sehr viele Informationen: das menschliche Genom besteht beispielsweise aus über drei Milliarden Basenpaaren („Buchstaben“). Ihre Auswertung ist daher sehr teuer und aufwändig und somit zur einfachen Artbestimmung nicht praktikabel. Folglich galt es, einen kurzen Abschnitt des Genoms zu finden, der bei allen Tierarten lokalisiert werden kann und dennoch im zwischenartlichen Bereich ausreichend Unterschiede aufweist. Da dieser Abschnitt bei jedem Tier wie der Strichcode (engl. „Barcode“) einer Ware im Supermarkt „ausgelesen“ werden könnte, wurde der Begriff des DNA-Barcoding geprägt.

Hebert et al. (2003) schlugen als Standard für das DNA-Barcoding bei Tieren das Cytochrom C Oxidase I Gen (COI) vor. Dieses Gen erfüllt die eben beschriebenen Kriterien, und der beim Barcoding betrachtete Abschnitt ist nur 644 Basenpaare lang. Als Gen aus der mitochondrialen DNA wird es ausschließlich über die Weibchen vererbt, was bei populationsgenetischen Studien berücksichtigt werden muss, auf Artebene aber i. d. R. keine Rolle spielt. COI wurde bereits lange zuvor bei phylogenetischen Untersuchungen verwendet, um Verwandtschaftsverhältnisse nahe verwandter Arten aufzuklären (z. B. Boulter et al. 1972, Brown et al. 1994). Seit 2003 wurden Beispiele für zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten des Barcoding veröffentlicht. Im wissenschaftlichen Bereich wird die Methode, neben der reinen Bestimmung bereits bekannter Arten, auch zur Ersterfassung taxonomisch schlecht bearbeiteter Artengemeinschaften eingesetzt. Dies ist insbesondere bei Wirbellosen der Tropen sinnvoll, wo Taxonomen häufig mit Hunderten unbeschriebener Arten konfrontiert werden (Smith et al. 2005, Hajibabaei et al. 2007, Nagy et al. 2013). Barcoding kann so eine Vorsortierung der Belegexemplare zur späteren eigentlichen taxonomischen Bearbeitung liefern. Auch innerhalb bereits beschriebener Arten wurden durch Barcoding schon zahlreiche kryptische Arten aufgedeckt, die in der Folge zumeist durch morphologische und/oder ökologische Daten bestätigt wurden (Hebert et al. 2004).

Auch im anwendungsorientierten Bereich sind die Möglichkeiten des Barcoding vielfältig. Seltene oder exotische Parasiten oder Schädlinge, zu deren herkömmlicher Determinierung fähige Experten möglicherweise erst aufwändig gesucht werden müssten, können durch Barcoding schnell und zuverlässig bestimmt werden. So konnte z. B. an der ZSM eine Yak-Dasselfliege (*Hypoderma sinense*) an einer Nepal-Touristin sowie die Obstschädlinge Kirschessigfliege (*Drosophila suzukii*) und Sanddornfruchtfliege (*Rhagoletis batava*) nachgewiesen und auch im Ei- oder Larvenstadium bestimmt werden. In der Lebensmittelsicherheit können auch verarbeitete Produkte aus Fleisch, Fisch und Pflanzen artgenau bestimmt werden, um z. B. Etikettenschwindel aufzudecken (siehe Website <http://www.barcoding-zsm.de/pressemitteilungen>).

Wie jede Methode hat jedoch auch das Barcoding seine Grenzen. Die Sequenzierung von COI gelingt nicht bei allen Artengruppen mit gleich hoher Erfolgsquote, was aber ein technisches Problem darstellt und durch die Fortentwicklung der Labormethoden

zunehmend an Bedeutung verliert. Als problematischer ist jedoch die Auswertung der Daten anzusehen. Nicht alle Arten können eindeutig an Hand ihrer Barcodes determiniert werden, etwa weil es zu Hybridisierung mit anderen Arten kommt oder weil sie evolutionsgeschichtlich so jung sind, dass sich im COI-Gen noch keine klaren Unterschiede zu nahe verwandten Arten herausgebildet haben. Dies ist beispielsweise bei fast 10 % der in Deutschland heimischen Wildbienenarten der Fall (Schmidt et al. 2015). Auf der anderen Seite spiegelt COI zwar auf der Artebene meist sehr gut die Verwandtschaftsverhältnisse wider, ist auf höheren taxonomischen Ebenen jedoch oft ungenau (Hebert & Gregory 2005). Die Ergebnisse von Barcoding-Studien werden meist in der Form eines Stammbaums abgebildet, was viele Betrachter dazu anregt, Aussagen zur Phylogenie daraus abzuleiten. Diesen Anspruch kann das Barcoding - anders als umfangreichere, auf einem Satz verschiedener genetischer Marker beruhender Analysen - jedoch nicht erfüllen.

Zusammengefasst stellt das DNA-Barcoding also eine Methode dar, die die Arbeit taxonomischer Experten erleichtert und dadurch effizienter macht. Sie kann und wird taxonomische Expertise aber nicht ersetzen.

DNA-Barcoding in Deutschland

Weltweit gehört das Projekt DNA-Barcoding Fauna Bavarica (BFB, <http://www.fau-nabavarica.de/>) zu den Vorreitern unter allen Barcoding-Projekten. Es wurde 2009 von Wissenschaftlern der ZSM ins Leben gerufen und wird vom Bayerischen Staatsministerium für Bildung und Kultus, Wissenschaft und Kunst finanziell gefördert. Das Ziel besteht darin, möglichst alle der ca. 35000 bekannten bayerischen Tierarten in der Barcoding-Datenbank zu erfassen. Beim derzeitigen Projektstand (2016) liegen Barcodes von ca. 15000 Arten vor. Seit 2012 existiert auch das Projekt German Barcode of Life (GBOL, <https://www.bolgermany.de/>), das auf das Barcoding aller Tier-, Pflanzen- und Pilzarten Deutschlands abzielt. Zwischen den beiden Projekten besteht eine enge Zusammenarbeit.

Der Schwerpunkt der meisten Barcoding-Projekte, so auch der deutschen, liegt im Bereich der Entomologie. Dies liegt zum einen darin begründet, dass Insekten die mit Abstand artenreichste Tiergruppe sind und ein Großteil dieser Arten mit den üblichen morphologischen Methoden nur von einem sehr kleinen Kreis ausgewiesener Experten bestimmt werden kann. Insofern besteht in der Entomologie ein besonders großer Bedarf an alternativen Bestimmungsmethoden. Zum anderen sind entomologische Sammlungen, in denen Belegexemplare überwiegend getrocknet aufbewahrt werden, eine besonders gute Quelle zum Aufbau einer Barcode-Datenbank, denn Trockenmaterial ist zumeist auch nach Jahrzehnten noch gut für molekulargenetische Untersuchungen verwendbar. Amphibien, Reptilien und Tiere aus zahlreichen weiteren Gruppen hingegen werden zumeist in 75 %igem Alkohol oder in Formalin konserviert, was in den meisten Fällen die DNA schon nach wenigen Wochen oder Monaten so weit schädigt, dass die Belegexemplare nicht mehr für molekulargenetische Untersuchungen geeignet sind. Im modernen Sammlungsbetrieb wird heute daher i. d. R. eine gesonderte Gewebeprobe in 96 %igem unvergällten Alkohol gelagert, in der die DNA besser konserviert wird. Hinzu kam, dass die Sequenzierung von COI, die im

Barcoding ursprünglich für Wirbellose optimiert war, erst auf die Erfordernisse von Reptilien und Amphibien angepasst werden musste.

In der Folge gelangten Amphibien und Reptilien erst vergleichsweise spät ins Augenmerk der Barcoding-Projekte, zumindest derer, die im Rahmen von BOLD operierten. Auf Grund der oben beschriebenen Schwierigkeiten mit COI wurde auch die Nutzung anderer Genomabschnitte, z. B. des 16S rRNA Gens (Vences et al. 2005), vorgeschlagen. Erst später erschienen die ersten auf COI-Barcoding beruhenden Artikel über Reptilien (Nagy et al. 2012, Hawlitschek et al. 2013) und Amphibien (Che et al. 2012, Xia et al. 2012, Huang et al. 2013, Perl et al. 2014). Seit 2013 werden Barcodes zu herpetologischen Themen auch in der in China angesiedelten „Cold Code“-Initiative gesammelt, dessen Name in Anspielung auf die „kaltblütige“ Zielgruppe gewählt wurde (Murphy et al. 2013).

In der Herpetologie sind viele der oben beschriebenen Hauptanwendungsgebiete des Barcoding von geringerer Relevanz. Taxonomische Expertise ist hier vergleichsweise deutlich weniger limitiert als in der Entomologie, und es besteht auch keine besondere Relevanz im Lebensmittelbereich. Die Bestimmung von Laich und Larven oder von Straßenverkehrsopfern könnte jedoch deutlich erleichtert werden. Insbesondere das Vorliegen einer globalen Referenzdatenbank kann auch in Mitteleuropa viele Vorteile bieten. Sie würde erlauben, exotische Arten auch ohne Kenntnisse über deren Herkunft schnell und sicher zu bestimmen. Moderne Sequenzierungsmethoden bieten darüber hinaus noch weitere Möglichkeiten. Amphibien und Reptilien könnten aus Mageninhalten oder Ausscheidungen von Beutegreifern identifiziert werden, da auch daraus die DNA der Beutetiere extrahiert werden kann (Valentini et al. 2009). Wie Studien gezeigt haben, können sogar aus der in einer Wasserprobe enthaltenen DNA die Sequenzen der in dem jeweiligen Gewässer vorkommenden Tierarten ausgelesen und durch Barcoding identifiziert werden (Hajibabaei et al. 2011, Thomsen et al. 2012). Diese fortschrittlichen Methoden, im Englischen als „environmental DNA Barcoding“ bezeichnet, befinden sich teilweise noch in der Entwicklung, versprechen jedoch Zugang zu umfangreichen neuen Forschungsfeldern. Auf diese Weise wird zum Beispiel gerade versucht, genetische Spuren des Alpenkammolches (*Triturus carnifex*) im Berchtesgadener Land nachzuweisen. Aus der Region liegen bisher ältere Funde von morphologisch intermediären Kammolchen vor (Schmidtler 1976), die allerdings nach neueren genetischen Untersuchungen bisher nicht bestätigt werden konnten (Maletzky et al. 2008). Mithilfe des „environmental DNA Barcoding“ könnte es im besten Fall also gelingen, eine weitere Amphibienart oder deren genetische Spuren in Deutschland nachzuweisen.

Barcoding-Datenbanken und die Erzeugung von Daten

Die Wirksamkeit des DNA-Barcoding beruht auf der Möglichkeit, ein Individuum mittels seines Barcodes schnell und zuverlässig einer Tierart zuzuordnen. Dies geschieht durch den Abgleich des neu ausgelesenen Barcodes mit einer Referenzdatenbank, die bereits zuverlässig bestimmte Barcodes der entsprechenden Art beinhaltet. Der Aufbau und die Ausweitung dieser Datenbank sind das primäre Ziel der meisten Barcoding-Projekte weltweit. Um maximale Synergieeffekte zu nutzen, stellen seit 2007

Public Data Portal - Specimen Record

[Print](#)

Public Data [Search](#)

KML TSV FASTA TRACE KML TSV [Show Help](#)
 Specimen Data Sequences Combined

Record Details For FBHER103-10

IDENTIFIERS:

Sample ID:	BC ZSM HERP 00163	Museum ID:	
Field ID:	BC ZSM HERP 00163	Collection Code:	
Deposited In:	SNSB, Zoologische Staatssammlung Muenchen		

[Add Tags & Comments](#) Comments: 0 Associated Tags: No Tags

TAXONOMY:

Phylum:	Chordata	Subfamily:	Lacertinae
Class:	Reptilia	Genus:	<i>Podarcis</i>
Order:	Squamata	Species:	<i>Podarcis muralis</i>
Family:	Lacertidae	BIN (Cluster ID):	BOLD:ACF0185

* Barcode Index Numbers(BIN): cluster barcode sequences to create OTUs that closely reflect species groupings

SPECIMEN DETAILS:

Voucher Status:		Reproduction:	S
Tissue Descriptor:		Sex:	
Brief Note:	Issue sample, ssp. (allochthonous)	Life Stage:	

Detailed Notes:

COLLECTION DATA:

Country:	Germany	Date Collected:	2009-06-02
Province/State:	Bavaria	Collectors:	F. Glaw
Region/Country:			
Sector:			
Exact Site:	Lower Bavaria, Landkreis Passau, Passau		
Latitude:	48.573	Elevation:	302 Meters
Longitude:	13.464	Elv. Accuracy:	
Coord. Source:		Depth:	
Coord. Accuracy:		Depth Accuracy:	

PUBLICATIONS:

Havlicscek, O., Morinire, J., Dinz, A., Franzen, M., Rödder, D., Glaw, F., Haszprunar, G. Comprehensive DNA barcoding of the herpetofauna of Germany Molecular Ecology Resources 2015-05-05 (DOI)

SEQUENCE: COI-5P [Funding Source: iBOL:WG1.1]

Sequence ID:	FBHER103-10.COI-5P	GenBank Accession:	HQ954796
Last Updated:	2016-01-17	Genome:	Mitochondrial
Locus:	Cytochrome Oxidase Subunit 1 5' Region		
Nucleotides:	653 bp		

```

CCTATACCTATTATTTGGTGCCTGAGCTGGATATAGTGGCACCOCCTAGTCTTCTAATCCGAGAGGCTTA
GTACCCGAGAGCTCTTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TTCTTTTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TGGATTTCCAGCTATAAATAGATAGACTTCTGATATTACCACTCTCTACTACTCTCTCTCTCTCTCTCTCAG
CCCTGGAGAGAGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
CAGTAAATTAAGAGATTTTCACTCAATTAAGAGAGATTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CCTTTATATATTAAGAGAGATTTTCACTCAATTAAGAGAGATTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CAGTAAATTAAGAGATTTTCACTCAATTAAGAGAGATTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CATCTCTTTTGGCCAGCTGGCGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
    
```

Amino Acids:

```

LYLLPQAGQNYVLALELLIPELEGQDQLLEGGQVYVIVTANAPMIFPLVPMPIHCPQNMVPLMIGAPM
AFPMNMSFLLPELLESSLSEGGATGWTVPFLAGNNAHMGASVGLTTPSLHLAGVSLIGLNLNFTTT
CINMPPMFGVPLPMSVLTAVLLELLPGLAKITMLGDRNLTSPFVWGGSDVLDVQL
    
```

Illustrative Barcode:

[Add Tags & Comments](#) Comments: 0 Associated Tags: No Tags

ELECTROPHOREGRAM TRACE FILES:

Length	Pos Primers	Seq Primer	Read	Status	Run Date
876	C_VF1LH1 / C_VR1LR1	M13R	Reverse	high qual	2010-10-20
651	C_VF1LH1 / C_VR1LR1	M13F	Forward	high qual	2010-10-19

Specimen Images:

License: Creative Commons - Attribution Non-Commercial
 Share-Alike (2014) BY-NC-SA
 License Holder: Stefan Schmitt, SNSB, Zoologische Staatssammlung Muenchen

[Add Tags & Comments](#) Comments: 0 Associated Tags: No Tags

Collection Site:

Attribution:
 Specimen Depositor: SNSB, Zoologische Staatssammlung Muenchen
 Sequencing Center: Biodiversity Institute of Ontario
 Photography: ZSM Hymenoptera Photography Group, SNSB, Zoologische Staatssammlung Muenchen
 Collectors: F. Glaw
 Specimen Identification: Michael Franzen
 Project Manager: Stefan Schmitt
 Sequencing Support: International Barcode of Life (WG1.1)

Abb. 3: DNA-Barcode-Eintrag auf der Internetseite der BOLD-Datenbank (<http://www.boldsystems.org/>). Jeder Barcode ist verknüpft mit Daten zu Fundort und -zeitpunkt, Sammler und Identifizierer, Beleg und einem Belegfoto. Die Daten sind frei zugänglich.
 DNA barcode entry on the website of the BOLD database (<http://www.boldsystems.org/>). Every barcode is is linked to information on locality, collection time, collector, identifier, voucher and a photograph. The data is publicly accessible.

fast alle dieser Projekte, so auch die deutschen, ihre Daten einer globalen Datenbank mit dem Namen BOLD (Barcode of Life Database: Ratnasingham & Hebert 2007) mit Sitz an der Universität von Guelph, Kanada, zur Verfügung. Heute (August 2016) enthält die Datenbank fast 4,7 Millionen Barcode-Sequenzen von über 172000 beschriebenen Tierarten (Abb. 3).

Um die Qualität der Daten auf BOLD zu sichern, werden nur solche Daten final akzeptiert, die strengen Standards gerecht werden. Jede Barcode-Sequenz benötigt vollständige Metadaten zu Fundort, Zeitpunkt, Sammler und Bestimmer. Ein Belegexemplar muss in einer öffentlichen Sammlung hinterlegt und der Datenbankeintrag mit einem Foto dieses Exemplars verknüpft sein. Sind diese Kriterien erfüllt, werden die Daten öffentlich zugänglich gemacht und können so von jedem Nutzer per Internet abgefragt werden.

Um einen Barcode zu erzeugen, wird aus dem fraglichen Tier, zumeist aus einer Gewebeprobe, dessen DNA extrahiert. Diese wird mittels Polymerasekettenreaktion vervielfältigt und auf einem Sequenzierer ausgelesen. Der gesamte Vorgang kann in jedem regulär ausgestatteten molekulargenetischen Labor durchgeführt werden und nimmt, wenn in andere Arbeitsabläufe integriert, zwei bis drei Tage in Anspruch. In prioritären Fällen kann die Arbeitszeit auf wenige Stunden verkürzt werden. Aus Gründen der Effizienz werden jedoch meist mehrere Proben auf einmal bearbeitet. Üblich ist hier die Einheit von 95 Proben.

Im vorliegenden Projekt wurde DNA aus zumeist frisch gewonnenen Proben extrahiert. Dabei handelte es sich entweder um Gewebeproben von gesammelten Tieren und Totfunden oder um Schleimhautabstriche aus dem Maul oder von der Kloake. Belegexemplare wurden in der ZSM hinterlegt. Eine Reihe von Proben wurde auch vom Zoologischen Forschungsmuseum Alexander Koenig, Bonn (ZFMK), beigesteuert.

Die Bestimmung von Wasserfröschen erfolgte nach den in Mayer et al. (2013) beschriebenen Methoden. Die Nomenklatur der Amphibien folgte der Datenbank „Amphibian Species of the World“ (Frost 2016) mit Ausnahme der Bufoniden. In unserer Arbeit wurde der Gattungsname *Bufo* beibehalten (anstelle von *Epidalea* für *B. calamita* und von *Bufotes* für *B. viridis*). Weiterhin wurden vorläufig alle Wechselkröten in Deutschland als eine Art betrachtet, also der von Stöck et al. (2006) vorläufig vorgeschlagene Namen *B. variabilis* für eine divergente, genetische Linie von *B. viridis* nicht verwendet.

Ergebnisse

In Hawlitschek et al. (2016) wurden insgesamt 248 DNA Barcodes aus 307 Proben gewonnen, was einem Sequenzierungserfolg von 80,8 % entspricht. Die Barcodes verteilten sich auf insgesamt 36 Arten, darunter die 13 in Deutschland heimischen oder eingeführten und etablierten Arten von Reptilien und 21 von Amphibien. Bei den verbleibenden Arten handelt es sich um *Emys trinacris*, die zum Vergleich mit der Europäischen Sumpfschildkröte *E. orbicularis* hinzugezogen wurde, und um ein Exemplar des exotischen Antillen-Pfeiffrosches (*Eleutherodactylus* aff. *coqui*) aus den Gewächshäusern des Botanischen Gartens München.

Abbildung 4 zeigt den berechneten Barcoding-Baum. Wie bereits zuvor beschrieben, ist dieser nur sehr eingeschränkt zur Ableitung von Verwandtschaftsverhältnissen höherer taxonomischer Ebenen geeignet. Zwar werden alle Gattungen und Familien korrekt zugeordnet; auf höherer Ebene werden jedoch manche Reptilien näher an Amphibien als an anderen Reptilien abgebildet. Dies liegt daran, dass das COI-Gen im

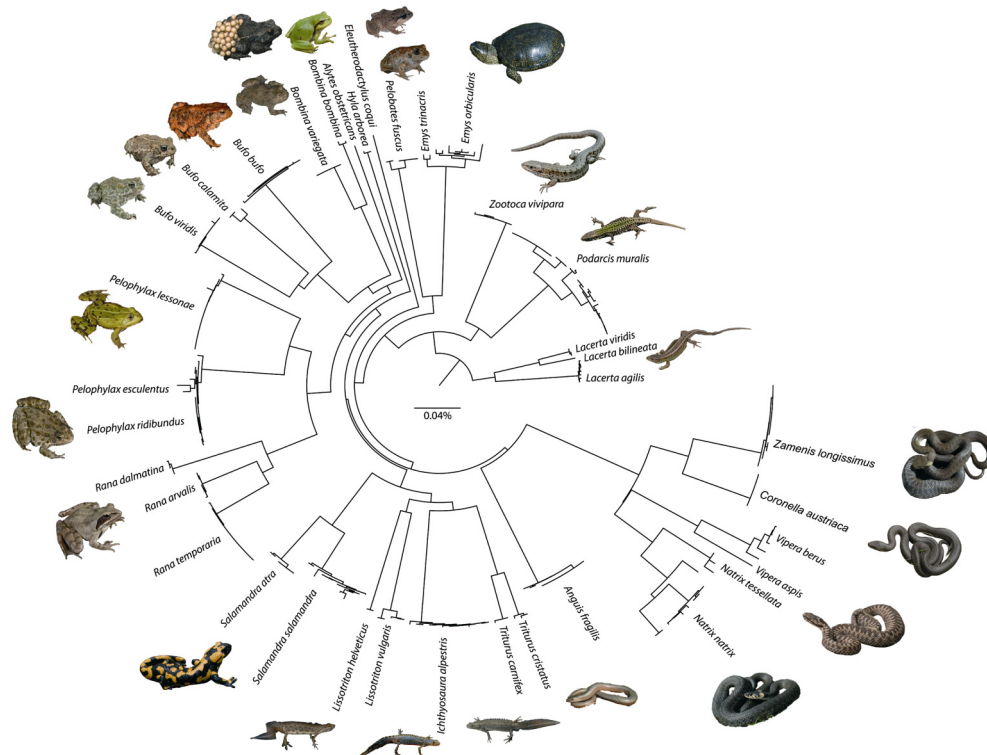


Abb. 4: Barcoding-Baum, erstellt in BOLD und dargestellt mit FigTree 1.4.2. Alle Arten werden als separate Cluster abgebildet; so sind die Barcodes verschiedener Arten unterscheidbar. Auf höherer taxonomischer Ebene weicht die Darstellung von den tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnissen ab; DNA Barcoding ist also nicht zur Rekonstruktion tieferer Phylogenien geeignet.

Barcoding-tree created in BOLD and displayed using FigTree 1.4.2. All species are retrieved in separate clusters, allowing species identification using the barcodes. The tree is not in accordance with the accepted phylogeny at higher taxonomic levels; therefore, DNA barcoding is not an acceptable method for the reconstruction of deeper phylogenies.

Vergleich zwischen phylogenetisch weit voneinander entfernten Arten mit Mutationen saturiert und damit nicht mehr informativ ist, so dass die Zuordnungen auf diesen Ebenen tendenziell zufällig geschehen.

Auf Artniveau wiederum sind die Ergebnisse zuverlässig: Jeder Barcode wird deutlich näher an artgleichen Barcodes abgebildet als an artfremden. Die Barcodes bilden sogenannte Cluster, also Gruppen sehr ähnlicher Sequenzen, die sich untereinander deutlich weniger unterscheiden als von Barcodes anderer Cluster. Jede Art entspricht einem Cluster oder einer kleinen Gruppe von Clustern. Die einzige Ausnahme bilden die Wasserfrösche der Gattung *Pelophylax*. Diese bilden zwei Cluster, eines für die genetische Linie von *P. lessonae* und eines für die von *P. ridibundus*. Da das COI-Gen nur über die Weibchen vererbt wird, findet darin keine Vermischung statt, sodass Hybriden (*P. esculentus*) nicht erkannt werden. Darüber hinaus finden sich einige *P. lessonae* zugeordneten Barcodes im Cluster von *P. ridibundus* und umgekehrt, was darauf hinweist, dass morphologisch einer Art zuzuordnende Tiere auch die Mitochondrien der jeweils anderen Art, wohl über die Hybridstufe vermittelt, tragen können.

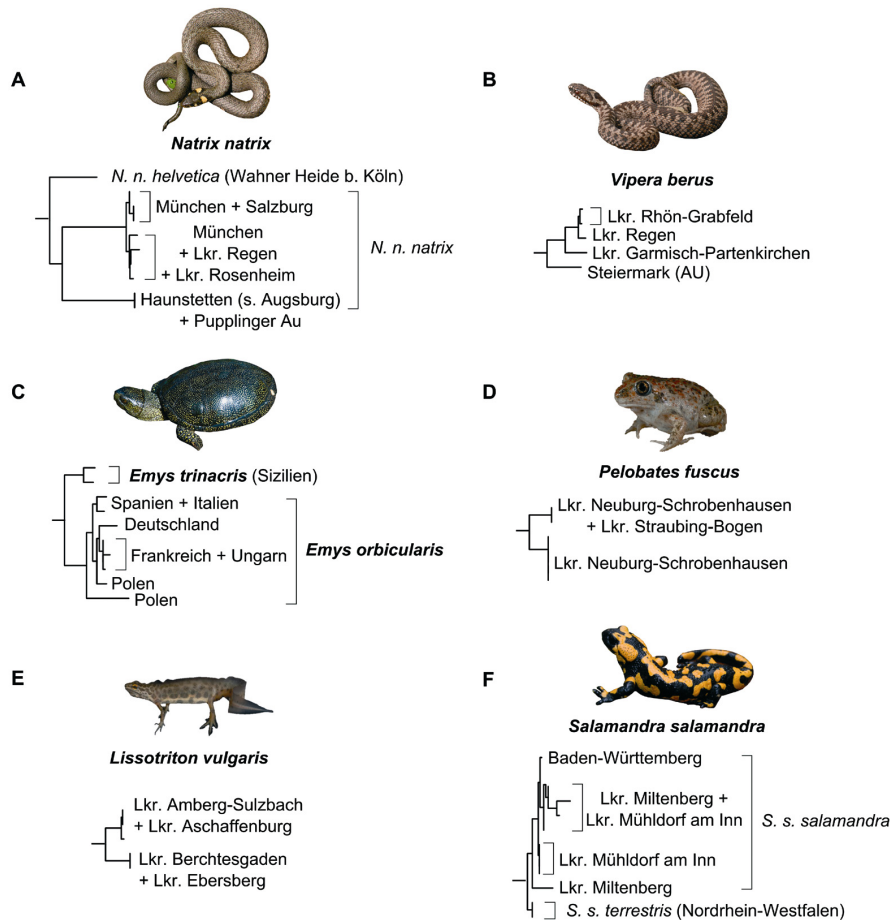


Abb. 5: Barcoding-Ergebnisse für einige Reptilienarten: (A) Ringelnatter: Die Unterscheidung zwischen Barrenringelnatter und Nominatform ist möglich. Innerhalb der Nominatform werden zwei genetische Linien sichtbar, die möglicherweise den Linien 3 und 4 aus Kindler et al. (2013) entsprechen. (B) Kreuzotter: Die Probe aus der Steiermark entspricht wahrscheinlich dem „alpine clade“ von Kalyabina-Hauf et al. (2004). Alle bayerischen Proben dürften dagegen zum „Northern clade“ gehören. (C) Sumpfschildkröte: Eine klare geographische Strukturierung der europäischen Proben ist nicht zu erkennen. Die Unterscheidung zu *Emys trinacris* ist jedoch möglich. (D) Knoblauchkröte: Zwei genetisch klar getrennte Linien sind erkenntlich, die jedoch nicht in geographische Referenz zu setzen sind. (E) Teichmolch: Die bayerischen Proben verteilen sich auf zwei deutlich unterscheidbare genetische Linien nördlich bzw. südlich der Donau. (F) Feuersalamander: Die Unterscheidung zwischen *Salamandra salamandra terrestris* und der Nominatform gelingt, die Differenzierung ist jedoch gering. Innerhalb der Nominatform ist keine klare geographische Struktur zu erkennen.

Barcoding results for some reptile species: (A) Grass snake: *Natrix natrix helvetica* and *N. n. natrix* form clearly distinct clusters. Two distinct lineages are visible in the nominate form, possible congruent with the lineages 3 and 4 of Kindler et al. (2013). (B) Adder: The sample from Austria most probably belongs to the 'alpine clade' detected in Kalyabina-Hauf et al. (2004). By contrast, all Bavarian samples appear to belong to the 'North clade'. (C) European pond turtle: There is no clear geographic structure within the European samples. However, *Emys orbicularis* is clearly distinct from *E. trinacris*. (D) Two distinct genetic lineages are visible but cannot be put into any geographic context. (E) Smooth newt: The Bavarian samples form two distinct lineages North respectively South of the Danube River. (F) Fire salamander: *Salamandra salamandra terrestris* is slightly distinct from the nominate form. No geographic structure is visible within the nominate form.

Bei allen anderen Arten gelingt nicht nur ausnahmslos die Zuordnung sämtlicher Individuen, in vielen Fällen kann zusätzlich eine populationsgenetische Struktur innerhalb der Arten festgestellt werden (Abb. 5). Relativ schwache Strukturierungen treten bei Blindschleiche (*Anguis fragilis*), Kreuzkröte (*Bufo calamita*) und Knoblauchkröte (*Pelobates fuscus*) auf. Bei diesen Arten gelang es aber nicht, die genetische Diversität mit einer geographischen Dimension in Bezug zu setzen. So treten die beiden vorgefundenen genetischen Linien der Knoblauchkröte mitunter am selben Fundort auf. Weiterhin besteht bei diesen Arten die Schwierigkeit, dass zwar Studien zur Strukturierung europäischer Populationen vorliegen (Beebee & Rowe 2000, Borkin et al. 2001, Rowe et al. 2006, Crottini et al. 2007, Gvoždík et al. 2010, 2013, Litvinchuk et al. 2013). Mitteleuropäische Populationen fanden jedoch in keiner dieser Arbeiten spezifische Beachtung, sodass eine sichere Zuordnung der Daten von Hawlitschek et al. (2016) in diesem Kontext nicht möglich ist. Gleiches gilt für den Teichmolch (*Lissotriton vulgaris*), bei dem in den vorliegenden Barcoding-Daten allerdings zwei genetische Linien feststellbar sind, die Fundorten nördlich bzw. südlich der Donau entsprechen (vgl. Weisrock et al. 2006).

Einige Arten zeigen eine stärkere interne genetische Differenzierung. Dies ist zum Beispiel beim Feuersalamander (*Salamandra salamandra*) der Fall. Die beiden Unterarten *S. s. salamandra* und *S. s. terrestris* können in unserem Fall durch Barcoding unterschieden werden, der Unterschied ist jedoch nicht deutlich größer als die Diversität innerhalb von *S. s. salamandra*. Ob sich dieser Befund verallgemeinern lässt, müsste aber durch eine umfangreichere Studie verifiziert werden. In der phylogeographischen Studie zum Feuersalamander von Steinfartz et al. (2000) wurden keine Unterschiede in der mitochondrialen DNA zwischen *S. s. salamandra* und *S. s. terrestris* gefunden. Dies liegt jedoch vermutlich darin begründet, dass in dieser Studie ein anderes Gen, der D-Loop, untersucht wurde, das auf Populationsebene weniger informativ ist als COI. Auch bei Steinfartz et al. (2000) liegt keine ausreichend dichte Beprobung Mitteleuropas vor, um unsere Barcoding-Daten zuzuordnen.

Im Fall der Ringelnatter (*Natrix natrix*) wurden drei klar differenzierte Linien gefunden. Eine davon wird durch eine einzelne Probe der Barren-Ringelnatter (*N. n. helvetica*) aus der Wahner Heide bei Köln (NRW) repräsentiert. Proben dieser Unterart aus Bayern lagen nicht vor. Acht weitere Proben, alle aus Bayern, sind damit zur Nominatform *N. n. natrix* zu rechnen und bilden zwei Cluster, zum einen mit je einer Probe aus Haunstetten südlich Augsburg und einer aus der Pupplinger Au südlich von München und zum anderen mit Proben vorwiegend aus dem Raum München, aber auch aus Rosenheim und Jochenstein. Auch Kindler et al. (2013) fanden eine hohe Diversität mitochondrialer Linien im gesamteuropäischen Verbreitungsgebiet der Ringelnatter, ohne jedoch COI-Daten zu verwenden, weswegen ein direkter Vergleich der DNA-Sequenzen nicht möglich ist. In Deutschland kommen demnach neben der Barren-Ringelnatter noch zwei genetische Linien der Nominatform vor, die als Linien 3 und 4 bezeichnet werden. Aus Bayern liegen dabei jedoch nur zwei Proben mit den Fundorten „Mammendorf“ und „Passau“ vor, die beide zur Linie 4 gehören. In keiner der beiden Studien lässt sich also eine klare geographische Trennlinie zwischen den beiden genetischen Linien ziehen, weswegen eine sichere Zuordnung der Cluster von Kindler et al. (2013) zu den Linien von Hawlitschek et al. (2016) nicht getroffen werden kann.



Abb. 6: Kreuzotter als Beispiel für eine Art mit bisher noch unzureichend bekannter genetischer Variation in Deutschland (Individuum des „northern clade“ aus dem Murnauer Moos).
Common Adder as an example for a species with an insufficiently understood genetic variation within Germany (specimen of the „northern clade“ from the Murnauer Moos, Bavaria).

Bei den Kreuzottern (*Vipera berus*) liegen Hawlitsek et al. (2016) fünf Proben vor. Die am stärksten differenzierte Sequenz stammt aus der Steiermark, gefolgt von einer aus dem Landkreis Garmisch-Partenkirchen. Drei weitere Sequenzen stammen aus den Landkreisen Regen und Rhön-Grabfeld und sind nicht klar unterscheidbar. Diese Struktur erinnert an die Arbeit von Kalyabina-Hauf et al. (2004) und darauf aufbauende Studien, z. B. von Ursenbacher et al. (2006). Dort wurde eine genetisch deutlich differenzierte alpine Linie („alpine clade“) der Kreuzotter vorgeschlagen, welche von dem „Northern clade“ zu unterscheiden ist, der möglicherweise in Mitteleuropa dominiert (Abb. 6). In Bayern wurde die alpine Linie mittlerweile im Alpenraum östlich des Inns nachgewiesen, Stichproben westlich davon (auch aus hochmontan-alpinen Bereichen, z. B. Karwendelgebirge) waren jedoch nördlichen Populationsgruppen zuzuordnen (Völkl 2010). Diese Daten legen nahe, dass einzig die Sequenz aus der Steiermark von Hawlitsek et al. (2016) dem „alpine clade“ zuzurechnen ist, während alle weiteren Proben den nördlicheren Linien angehören. Aber auch hier stellt sich das Problem, dass die genannten Vergleichsstudien nicht COI, sondern andere genetische Marker verwendeten und die Daten nicht direkt vergleichbar sind. Vertiefende Untersuchungen zur Verbreitung der Linien in Bayern laufen jedoch derzeit.

Bei der Europäischen Sumpfschildkröte (*Emys orbicularis*) fanden Hawlitsek et al. (2016) zahlreiche tiefe genetische Linien. Dies ist vermutlich darin begründet, dass bei dieser Art Proben aus ganz Europa einbezogen wurden, auch mit dem Hintergrund, die einzige verwendete deutsche Probe einzuordnen. Es zeigt sich, dass diese Einordnung nicht einfach ist: eine geographische Strukturierung der sonst aus Polen, Frankreich, Ungarn, Spanien und Italien stammenden Sequenzen ist nicht zu erkennen. Wie von Velo-Antón et al. (2011) dargestellt, ist die heutige populationsgenetische Situation der Sumpfschildkröte nur zu verstehen, wenn die umfangreichen historischen Verbringungen dieser Tiere durch den Menschen berücksichtigt werden. Mit geogra-



Abb. 7: Einheimisch oder eingeführt? Die zuverlässige Bestimmung von Mauereidechsen unterhalb der Artebene ist selbst für geübte Personen oft nicht möglich (Weibchen der Venetien-Linie *P. m. maculiventris* Ost aus der eingeführten Population in Aschaffenburg).

Native of introduced? The reliable identification of wall lizards below the species level is often impossible even for specialists (female of the Venetian clade *P. m. maculiventris* East from an introduced population in Aschaffenburg).

phisch und genetisch umfangreicheren Datensätzen ist zwar eine Unterscheidung verschiedener genetischer Linien der Sumpfschildkröte möglich (Fritz et al. 2007), der Versuch der Zuordnung von Individuen zu diesen Linien nur an Hand von Barcodes sollte jedoch nicht unternommen werden. Eine Unterscheidung z. B. von *Emys trinacris* ist hingegen möglich (Fritz et al. 2005), weswegen die Artzuordnung nach DNA-Barcodes auch bei der Sumpfschildkröte als zuverlässig einzustufen ist.

Besonders umfangreiche und komplexe Daten liegen von Mauereidechsen des *Podarcis-muralis*-Komplexes vor. In Bayern ist nur eine autochthone Population im Bereich Oberaudorf-Kiefersfelden bekannt (Schmidtler & Schmidtler 1996, Schulte 2008), die zugleich das bundesweit einzige natürliche Vorkommen der Südalpen-Linie *P. m. maculiventris*-West der Art ist. Hingegen werden in Bayern viele größere Bahnhöfe und angrenzende geeignete Habitate von teils großen, eingeführten oder verschleppten Mauereidechsen-Populationen besiedelt. Eine besondere „genetische“ Gefährdung für die heimischen Vorkommen stellt sicherlich eine Hybridisierung mit ortsfremden genetischen Linien dar, die bereits am Oberrheingraben durch eine dominante Introgression eingeschleppter italienischer Linien weitläufig stattgefunden hat (Schulte et al. 2012, 2015). Zusätzlich besteht der Verdacht, dass Verdrängungseffekte durch allochthone Mauereidechsen lokal sogar die Zauneidechse beeinträchtigen können (Heym et al. 2013). Im Sinne eines wissenschaftlich fundierten Arten- und Populationschutzes ist daher die Frage nach der Bodenständigkeit oder der genetischen Identität einer Population von hoher Bedeutung (Abb. 7; vgl. z. B. Bräu & Sacher 2009). Im Feld stellt sich dieses Unterfangen aber aufgrund der großen morphologischen Variabilität der Art als schwierig, wenn nicht unmöglich dar (Schulte et al. 2011).

In wesentlicher Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Schulte et al. (2011) sind im Barcoding-Baum von Hawlitschek et al. (2016) drei übergeordnete Linien erkennbar (Abb. 8): 1. Eine Mischung von Intergrades der Venetien-Linie (entspricht *P. m. maculiventris*-Ost) und der Toskana-Linie (entspricht *P. m. nigriventris*), die durch Proben von allochthonen Populationen aus dem Raum Passau, Aschaffenburg und München repräsentiert wird. 2. Die Ostfranzösische Linie (entspricht *P. m. brongniardii*) mit Proben aus Tittling und von einer autochthonen Population aus Wachenheim bei

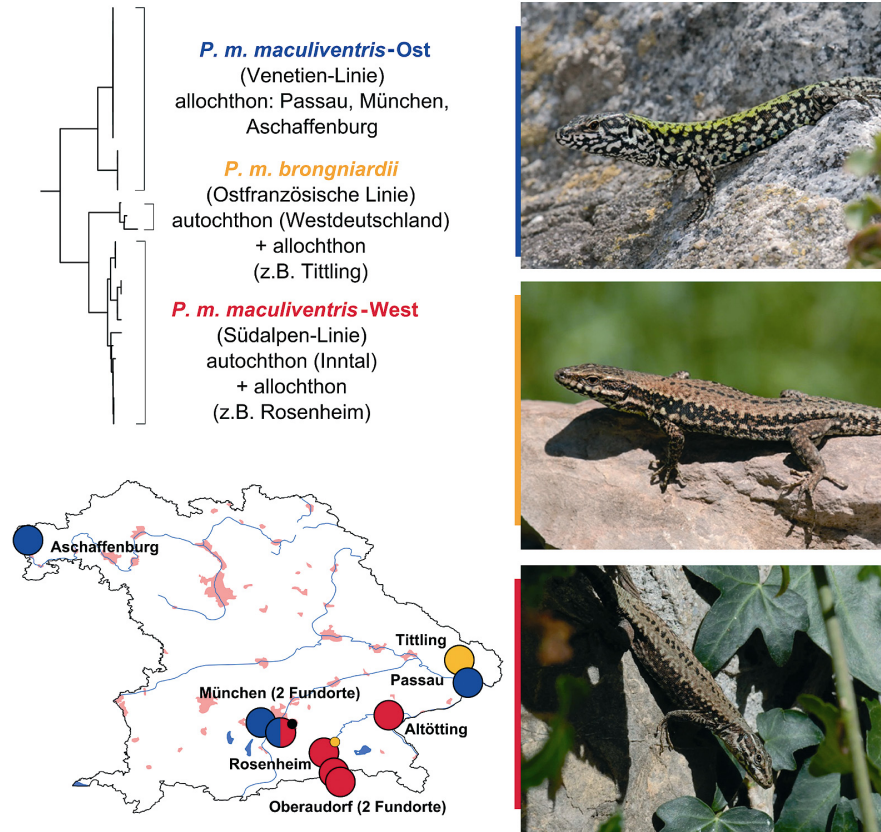


Abb. 8: Barcoding des *Podarcis muralis*-Komplexes. Im wesentlichen werden die in Schulte et al. (2011) vorgeschlagenen genetischen Linien auch hier detektiert. Eine Unterscheidung zwischen autochthonen und allochthonen Haplotypen innerhalb dieser Linien ist jedoch nicht möglich. Kreise in der Abbildung bezeichnen Fundorte in Bayern, die Farben stellen die genetischen Linien dar. Kleine Kreise weisen auf Funde von Linien aus Schulte et al. (2011) hin, die in der Barcoding-Studie nicht bestätigt werden konnten. In Passau konnten nur Barcodes der Venetien-Linie nachgewiesen werden, obwohl die dortige Population als hybrid aus Venetien- und Toskana-Linie gilt.

Barcoding of the *Podarcis muralis*-complex. The lineages proposed in Schulte et al. (2011) are largely retrieved. However, no distinction is possible between native and introduced haplotypes within these lineages. Depicted circles represent localities in Bavaria, colors represent lineages. Small circles indicate lineages detected in Schulte et al. (2011) but not in the barcoding study. Only barcodes of the Venetian lineage were detected in Passau, although this population is considered hybrid between the Venetian and Tuscany lineages.

Mannheim. 3. Die Südalpen-Linie (*P. m. maculiventris-West*), zu der außer der autochthonen Population aus dem bayerischen Inntal bei Oberaudorf auch allochthone Populationen aus Rosenheim, München und Altötting zu rechnen sind. Eine Unterscheidung der allochthonen Sequenzen von autochthonen durch Barcoding war in diesem Fall nicht möglich.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass zumindest manche allochthonen bayerischen Populationen auf mehrfache Verschleppungsereignisse zurückzuführen sind: So konnten aus der Population am Münchner Südbahnhof Individuen der Venetien- und der Südalpen-Linie nachgewiesen werden. Schulte et al. (2011) berichten zudem vom

Vorkommen der mittellitalienischen Marche-Linie an diesem Fundort. Darüber hinaus stellten diese Autoren Vertreter der Ostfranzösischen Linie in Rosenheim fest, während die in Hawlitschek et al. (2016) verwendeten, dorthier stammenden Sequenzen zur Südalpen-Linie zählen.

Fazit und Ausblick

Obwohl das DNA-Barcoding Methoden verwendet, die denen der molekularen Phylogenetik oder Populationsgenetik ähneln, kann es weder die zuverlässige Rekonstruktion von Stammbäumen noch von Populationsstrukturen gewährleisten. Dies ist jedoch auch nicht das Ziel des Barcoding; dieses besteht vielmehr darin, durch den Aufbau einer genetischen Datenbank die schnelle und standardisierte Bestimmung von Arten durch den genetischen Barcode zu ermöglichen. Die oben mehrfach diskutierte Problematik, dass verschiedene Studien unterschiedliche und nicht direkt vergleichbare genetische Marker verwenden, ist genau diejenige, die durch die Einführung von COI als Standard für alle Tiergruppen beseitigt werden soll.

Wie einleitend erwähnt, besteht für das DNA-Barcoding eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten. Voraussetzung für deren Umsetzbarkeit ist aber einerseits die Vervollständigung der Referenzdatenbank, andererseits auch die Übernahme der Barcoding-Methode durch kommerzielle Anbieter. Langfristig kann es kaum die Aufgabe wissenschaftlicher Institute öffentlicher Trägerschaft sein, solche Leistungen zu übernehmen. Dass ein entsprechendes Geschäftsfeld gerade im Entstehen ist, zeigt eine jüngst erfolgte Firmengründung in München. Ein Hindernis hierbei mag sein, dass - wie beschrieben - auch durch DNA-Barcoding nicht alle Arten eindeutig identifizierbar sind. Hier obliegt es den Forschungsinstituten, die öffentlich zugänglichen Daten so zu strukturieren, dass mögliche Fehlerquellen klar aufgezeigt werden und so eine Nutzung der Daten auch durch Nicht-Experten ermöglicht wird.

Technisch gesehen zählt DNA-Barcoding jedoch bereits heute zu den vergleichsweise aufwandsarmen und preiswerten Methoden der Biotechnologie. Durch die rasante Entwicklung der Technik ist eine weitere deutliche Verringerung des Aufwands in den nächsten Jahren anzunehmen. Noch ist zur Erstellung eines Barcodes ein voll ausgestattetes Molekularlabor nötig. Die Erstellung genetischer Sequenzen mit tragbaren Geräten unter Feldbedingungen ist jedoch heute bereits möglich und wurde auch bereits durchgeführt (s. <http://de.mongabay.com/2015/06/wissenschaftler-identifizieren-frosch-durch-dna-test-ohne-dafur-den-wald-zu-verlassen/>). Ein „tragbarer Barcoder“ im Westentaschenformat ist aus heutiger Sicht sicherlich noch Zukunftsmusik. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass der Stellenwert von DNA-Barcoding und anderen molekulargenetischen Methoden durch deren zunehmende Leistung und Erschwinglichkeit in naher Zukunft noch deutlich anwachsen wird.

Dank

Wir danken Michael Wink (Heidelberg) für Proben der Sumpfschildkröte sowie Wolfgang Böhme (Bonn), Ursula Bott (Bonn), Mirko Daus (Schwerin), Hans-Jürgen Gruber (München), Ulli Heckes (München), Dennis Rödder (Bonn) und Björn Rulik (Bonn) für weitere Proben und

Daten. Jérôme Morinière und Andreas Dunz (beide München) danken wir für ihre umfangreichen Tätigkeiten beim Barcoding-Projekt. Dem BOLD-Team (Guelph, Canada) danken wir für die Bearbeitung der Proben und für die Pflege der Datenbank. Die Regierungsbezirke von Bayern stellten dankenswerterweise Genehmigungen zum Sammeln der verwendeten Proben aus. Die Barcoding-Projekte in Bayern und Deutschland werden vom Bayerischen Staatsministerium für Bildung und Kultus, Wissenschaft und Kunst und vom Bundesministerium für Bildung und Forschung finanziert.

Literatur

- Beebe, T. J. C. & G. Rowe (2000): Microsatellite analysis of natterjack toad *Bufo calamita* Laurenti populations: consequences of dispersal from a Pleistocene refugium. – *Biological Journal of the Linnean Society* 69: 367–381.
- Borkin, L. J., S. N. Litvinchuk, J. M. Rosanov & K. D. Milto (2001): Cryptic speciation in *Pelobates fuscus* (Anura, Pelobatidae): evidence from DNA flow cytometry. – *Amphibia-Reptilia* 22: 387–396.
- Bortolus, A. (2008): Error cascades in the biological sciences: the unwanted consequences of using bad taxonomy in ecology. – *Ambio* 37: 114–118.
- Boulter, D., J. A. M. Ramshaw, E. W. Thompson, M. Richardson & R. H. Brown (1972): A phylogeny of higher plants based on the amino acid sequences of cytochrome c and its biological implications. – *Proceedings of the Royal Society London B Biological Sciences* 181: 441–455.
- Bräu, M. & A. Sacher (2009): Fachliche Interpretation der rechtlichen Vorgaben im Kontext räumlicher Planung in Städten. – *Laufener Spezialbeiträge* 9: 93–103.
- Brown, J. M., O. Pellmyr, J. N. Thompson & R. G. Harrison (1994): Phylogeny of *Greya* (Lepidoptera: Prodoxidae), based on nucleotide sequence variation in mitochondrial cytochrome oxidase I and II: congruence with morphological data. – *Molecular Biology and Evolution* 11: 128–141.
- Che, J., H.-M. Chen, J.-X. Yang, J.-Q. Jin, K. Jiang, Z.-Y. Yuan, R.W. Murphy & Y.-P. Zhang (2012): Universal COI primers for DNA barcoding amphibians. – *Molecular Ecology Resources* 12: 247–258.
- Costello, M.J., S. Wilson & B. Houlding (2013): More taxonomists describing significantly fewer species per unit effort may indicate that most species have been discovered. – *Systematic Biology* 62: 616–624.
- Crottini, A., F. Andreone, J. Kosuch, L.J. Borkin, S. N. Litvinchuk, C. Eggert & M. Veith (2007): Fossorial but widespread: the phylogeography of the common spadefoot toad (*Pelobates fuscus*), and the role of the Po Valley as a major source of genetic variability. – *Molecular Ecology* 16: 2734–2754.
- Fritz, U., T. Fattizzo, D. Guicking, S. Tripepi, M. G. Pennisi, P. Lenk, U. Joger & M. Wink (2005): A new cryptic species of pond turtle from southern Italy, the hottest spot in the range of the genus *Emys* (Reptilia, Testudines, Emydidae). – *Zoologica Scripta* 34: 351–371.
- Fritz, U., D. Guicking, H. Kami, M. Arakelyan, M. Auer, D. Ayaz, C.A. Fernández, A. G. Bakiev, A. Celani, G. Dzukic, S. Fahd, P. Havas, U. Joger, V. Khabibullin, L. Mazanaeva & P. Si (2007): Mitochondrial phylogeography of European pond turtles (*Emys orbicularis*, *Emys trinacris*) – an update. – *Amphibia-Reptilia* 28: 418–426.
- Frost, D. R. (2016): Amphibian species of the world: an online reference. – <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> [accessed on 2016].
- Gvoždík, V., N. Benkovský, A. Crottini, A. Bellati, J. Moravec, A. Romano, R. Sacchi & D. Jandzik (2013): An ancient lineage of slow worms, genus *Anguis* (Squamata: Anguillidae), survived in the Italian Peninsula. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 1077–1092.
- Gvoždík, V., D. Jandzik, P. Lymberakis, D. Jablonski & J. Moravec (2010): Slow worm, *Anguis fragilis* (Reptilia: Anguillidae) as a species complex: Genetic structure reveals deep divergences. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 460–472.
- Hajibabaei, M., S. Shokralla, X. Zhou, G. A. C. Singer & D. J. Baird (2011): Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. – *PLoS One* 6: e17497.

- Hajibabaei, M., G. A. C. Singer, P. D. N. Hebert & D. A. Hickey (2007): DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. – *Trends in Genetics* 23: 167–172.
- Hawlitschek, O., J. Morinière, A. Dunz, M. Franzen, D. Rödder, F. Glaw & G. Haszprunar (2016): Comprehensive DNA barcoding of the herpetofauna of Germany. – *Molecular Ecology Resources* 16: 242–253.
- Hawlitschek, O., Z.T. Nagy, J. Berger & F. Glaw (2013): Reliable DNA barcoding performance proved for species and island populations of Comoran squamate reptiles. – *PLoS One* 8: e73368.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball & J. R. DeWaard (2003): Biological identifications through DNA barcodes. – *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 270: 313–321.
- Hebert, P. & T. R. Gregory (2005): The promise of DNA barcoding for taxonomy. – *Systematic Biology* 54: 852–859.
- Hebert, P. D. N., E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen & W. Hallwachs (2004): Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fuligator*. – *PNAS* 101: 14812–14817.
- Heym, A., G. Deichsel, A. Hochkirch, M. Veith & U. Schulte (2013): Do introduced wall lizards (*Podarcis muralis*) cause niche shifts in a native sand lizard (*Lacerta agilis*) population? A case study from south-western Germany. – *Salamandra* 49: 97–104.
- Huang, J., A. Zhang, S. Mao & Y. Huang (2013): DNA barcoding and species boundary delimitation of selected species of Chinese Acridoidea (Orthoptera: Caelifera). – *PLoS One* 8: e82400.
- Kalyabina-Hauf, S., S. Schweiger, U. Joger, W. Mayer, N. Orlov & M. Wink (2004): Phylogeny and systematics of adders (*Vipera berus* complex). – *Mertensiella* 15: 7–15.
- Kindler, C., W. Böhme, C. Corti, V. Gvoždík, D. Jablonski, D. Jandzik, M. Metallinou, P. Široký & U. Fritz (2013): Mitochondrial phylogeography, contact zones and taxonomy of grass snakes (*Natrix natrix*, *N. megalcephala*). – *Zoologica Scripta* 42: 458–472.
- Litvinchuk, S.N., A. Crottini, S. Federici, P. Pous, D. Donaire, F. Andreone, M. L. Kalezić, G. Džukić, G. A. Lada, L. J. Borkin & J. M. Rosanov (2013): Phylogeographic patterns of genetic diversity in the common spadefoot toad, *Pelobates fuscus* (Anura: Pelobatidae), reveals evolutionary history, postglacial range expansion and secondary contact. – *Organisms Diversity & Evolution* 13: 433–451.
- Maletzky, A., P. Mikulíček, M. Franzen, A. Goldschmid, H.-J. Gruber, A. Horák & M. Kyek (2008): Hybridization and introgression between two species of crested newts (*Triturus cristatus* and *T. carnifex*) along contact zones in Germany and Austria: morphological and molecular data. – *The Herpetological Journal* 8: 1–15.
- Mayer, M., O. Hawlitschek, A. Zahn & F. Glaw (2013): Composition of twenty green frog populations (*Pelophylax*) across Bavaria, Germany. – *Salamandra* 49: 31–44.
- Murphy, R. W., A. J. Crawford, A. M. Bauer, J. Che, S. C. Donnellan, U. Fritz, C. F. B. Haddad, Z. T. Nagy, N. A. Poyarkov, M. Vences, W.-Z. Wang & Y.-P. Zhang (2013): Cold Code: the global initiative to DNA barcode amphibians and nonavian reptiles. – *Molecular Ecology Resources* 13: 161–167.
- Nagy, Z. T., T. Backeljau, M. De Meyer & K. Jordaens (2013): DNA barcoding: a practical tool for fundamental and applied biodiversity research. – *ZooKeys* 365: 1–3.
- Nagy, Z.T., G. Sonet, F. Glaw & M. Vences (2012): First large-scale DNA barcoding assessment of reptiles in the biodiversity hotspot of Madagascar, based on newly designed COI primers. – *PLoS One* 7: e34506.
- Perl, R. G. B., Z. T. Nagy, G. Sonet, F. Glaw, K. C. Wollenberg & M. Vences (2014): DNA barcoding Madagascar's amphibian fauna. – *Amphibia-Reptilia* 35: 197–206.
- Ratnasingham, S. & P. D. N. Hebert (2007): BOLD: the barcode of life data system (www.barcodinglife.org). – *Molecular Ecology Notes* 7: 355–364.
- Rowe, G., D. J. Harris & T. J. C. Beebe (2006): Lusitania revisited: A phylogeographic analysis of the natterjack toad *Bufo calamita* across its entire biogeographical range. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 335–346.
- Schmidt, S., C. Schmid-Egger, J. Morinière, G. Haszprunar & P. D. N. Hebert (2015): DNA barcoding largely supports 250 years of classical taxonomy: identifications for Central European bees (Hymenoptera, Apoidea partim). – *Molecular Ecology Resources* 15: 985–1000.

- Schmidler, J. F. (1976): Die bemerkenswerten Kammolche (*Triturus cristatus*) des Berchtesgadener Landes. – *Salamandra* 12: 32–36.
- Schmidler, H. & J. F. Schmidler (1996): Zur Reptilienfauna der Nördlichen Kalkalpen zwischen Isar und Inn (Bayern/Tirol). – *Mitteilungen des Landesverbandes für Amphibien- und Reptilienschutz Bayern* 15: 1–36.
- Schulte, U. (2008): Die Mauereidechse. – Bielefeld (Laurenti).
- Schulte, U., K. Bidinger, G. Deichsel, A. Hochkirch, B. Thiesmeier & M. Veith (2011): Verbreitung, geografische Herkunft und naturschutzrechtliche Aspekte allochthoner Vorkommen der Mauereidechse (*Podarcis muralis*) in Deutschland. – *Zeitschrift für Feldherpetologie* 18: 161–180.
- Schulte, U., M. Veith & A. Hochkirch (2012): Rapid genetic assimilation of native wall lizard populations (*Podarcis muralis*) through extensive hybridization with introduced lineages. – *Molecular Ecology* 21: 4313–4326.
- Schulte, U., A. Hochkirch & M. Veith (2015): Intraspezifische Hybridisierungen zwischen eingeschleppten und heimischen Mauereidechsen als Gefahr für autochthone Bestände in Südwestdeutschland. – *Mertensiella* 22: 101–113.
- Smith, M. A., B. L. Fisher & P. D. N. Hebert (2005): DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. – *Philosophical Transactions of the Royal Society. B Biological Sciences* 360: 1825–1834.
- Steinfartz, S., M. Veith & D. Tautz (2000): Mitochondrial sequence analysis of *Salamandra* taxa suggests old splits of major lineages and postglacial recolonizations of Central Europe from distinct source populations of *Salamandra salamandra*. – *Molecular Ecology* 9: 397–410.
- Stöck, M., C. Moritz, M. Hickerson, D. Frynta, T. Dujsebayaeva, V. Eremchenko, J. R. Macey, T. J. Papenfuss & D. B. Wake (2006): Evolution of mitochondrial relationships and biogeography of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup) with insights in their genomic plasticity. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 663–689.
- Thomsen, P. F., J. Kielgast, L. L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen, M. T. P. Gilbert L. Orlando & E. Willerslev (2012): Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. – *Molecular Ecology* 21: 2565–2573.
- Ursenbacher, S., M. Carlsson, V. Helfer, H. Tegelström & L. Fumagalli (2006): Phylogeography and Pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. – *Molecular Ecology* 15: 3425–3437.
- Valentini, A., F. Pompanon & P. Taberlet (2009): DNA barcoding for ecologists. – *Trends in Ecology and Evolution* 24: 110–117.
- Velo-Antón, G., M. Wink, N. Schneeweiß & U. Fritz (2011): Native or not? Tracing the origin of wild-caught and captive freshwater turtles in a threatened and widely distributed species (*Emys orbicularis*). – *Conservation Genetics* 12: 583–588.
- Vences, M., M. Thomas, A. van der Meijden, Y. Chiari & D. R. Vieites (2005): Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. – *Frontiers of Zoology* 2: 5.
- Völkl, W. (2010): Artenhilfsprogramm Kreuzotter (*Vipera berus*): Ausgewählte Lebensräume in Oberbayern 2010. – Bericht im Auftrag des Bayerischen Landesamts für Umwelt, unveröff.
- Weisrock, D. W., T. J. Papenfuss, J. R. Macey, S. N. Litvinchuk, R. Polymeni, I. H. Ugurtas, E. Zhao, H. Jowkar & A. Larson (2006): A molecular assessment of phylogenetic relationships and lineage accumulation rates within the family Salamandridae (Amphibia, Caudata). – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 368–383.
- Xia, Y., H.-F. Gu, R. Peng, Q. Chen, Y.-C. Zhen, R. W. Murphy & X.-M. Zeng (2012): COI is better than 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia: Caudata: Hynobiidae). – *Molecular Ecology Resources* 12: 48–56.