

VERSLAGEN EN TECHNISCHE GEGEVENS

Instituut voor Systematiek en Populatiebiologie (Zoölogisch Museum)

Universiteit van Amsterdam

No. 66

Genetisch onderzoek aan de zandhagedis *Lacerta agilis*:
resultaten en implicaties voor beheer

Vincent Nijman

januari 1996

VERSLAGEN EN TECHNISCHE GEGEVENS

Instituut voor Systematiek en Populatiebiologie (Zoölogisch Museum)

Universiteit van Amsterdam

No. 66

Genetisch onderzoek aan de zandhagedis *Lacerta agilis*:
resultaten en implicaties voor beheer

Vincent Nijman

© Institute of Systematics and Population Biology, University of Amsterdam,
P.O. Box 94766, 1090 GT Amsterdam, The Netherlands.
c/o Department of Herpetology.

Nijman, V. 1996. Genetisch onderzoek aan de zandhagedis *Lacerta agilis*: resultaten en implicaties voor beheer. *Verslagen en Technische Gegevens* 66: 1-23. Instituut voor Systematiek en Populatiebiologie, Universiteit van Amsterdam.

Nijman, V. 1996. Genetic study of the sand lizard *Lacerta agilis*: results and implications for management [in Dutch with English summary]. *Verslagen en Technische Gegevens* 66: 1-23. Institute of Systematics and Population Biology, University of Amsterdam.

SAMENVATTING

Genetisch onderzoek aan de zandhagedis *Lacerta agilis*: resultaten en implicaties voor beheer.

Dit rapport geeft een overzicht van de resultaten van onderzoek naar genetische variabiliteit in de zandhagedis *Lacerta agilis*, uitgevoerd in de periode 1993-1995 op het Instituut voor Systematiek en Populatiebiologie, Universiteit van Amsterdam. In totaal zijn van 83 individuen uit acht locaties (zes duingebieden en twee heidegebieden in zuidoost Nederland) weefselmonsters genomen op een non-destructieve manier.

Met behulp van elektroforese is de variatie in 23 enzymen zichtbaar gemaakt. De gemiddelde heterozygotie per individu ligt tussen de 0.041 en 0.049. Dit is in overeenstemming met eerder gevonden waarden binnen het genus *Lacerta* en deze waarde geeft geen aanleiding te veronderstellen dat de bemonsterde zandhagedispopulaties door een genetische bottleneck zijn gegaan.

Nei's genetische gelijkheidsindexen tussen populaties, berekend aan de hand van allel frequenties, variëren tussen de 0.96 en 0.99 en duiden op een geringe differentiatie tussen populaties. Hiermee in overeenstemming is de gevonden mate van uitwisseling tussen populaties. Een reductie in genetische uitwisseling kan echter zo recent zijn dat dit nog geen meetbare invloed heeft gehad op de genetische populatiestructuur.

Met behulp van RAPD's (random amplified polymorphic DNA) is de variatie in het genoom van de verschillende zandhagedissen zichtbaar gemaakt. Op DNA niveau zijn de populaties duidelijk meer gedifferentieerd dan op eiwitniveau. Binnen de duinen is er een significant verband gevonden tussen geografische afstand van populaties en de mate van genetische uitwisseling, wat duidt op een normale opbouw van de metapopulatie. Een clusteranalyse, gebruik makend van gelijkheidsindexen, verdeelt de bemonsterde populaties in drie verschillende groepen, waarvan de scheiding in het algemeen samenhangt met het tijdstip waarop gedacht wordt dat de populaties geografisch geïsoleerd van elkaar raakten.

De gevonden resultaten geven geen aanleiding te veronderstellen dat de bemonsterde populaties, een verminderde mate van genetische variatie vertonen. Fragmentatie binnen de duinen heeft nog niet geleid tot een sterke differentiatie van de verschillende deelpopulaties. Een aantal barrières tussen populaties zijn waarschijnlijk niet effectief genoeg om tot een reductie in genetische uitwisseling te komen, en in het algemeen zijn de barrières van een te recente oorsprong om al een meetbare verandering in genetische populatiestructuur als gevolg te hebben.

De belangrijkste aanbevelingen voor het op de lange termijn in stand houden van populaties zandhagedissen in Nederland zijn a) het beheer moet zich richten op een lokale toename van het aantal zandhagedissen door het optimaliseren van het habitat en het terugdringen van interne isolatie, b) getracht moet worden een verdergaande isolatie van populaties te voorkomen en tevens moeten migratiemogelijkheden tussen populaties verbeterd worden, en c) verder onderzoek dient zich te richten op kleine geïsoleerde populaties om zo de effecten van fragmentatie en isolatie inzichtelijk te maken.

SUMMARY

Genetic study of the sand lizard *Lacerta agilis*: results and implications for management.

This report provides an overview of the results of research on the genetic variability of the sand lizard *Lacerta agilis* in the Netherlands. The research was conducted during the years 1993-1995 at the Institute of Systematics and Population Biology, University of Amsterdam. Non-destructive tissue sampling was performed on a total of 83 individuals from 8 sites (6 coastal dune areas and two heather areas in the south-east of the country).

Electrophoresis showed variation in 23 enzymes. the average heterozygosity per individual was between 0.041 and 0.049. This is comparable with values found within other species in the genus *Lacerta*, and there is no reason to assume that the sampled populations have experienced serious genetic bottlenecks in the recent past.

Nei's index of genetic similarity between populations were calculated from the allele frequencies. It ranged from 0.96 to 0.99, meaning that populations are only slightly differentiated. The calculated level of genetic exchange between populations were consistent with the small level of differentiation. However, reduction in gene flow can be a recent process and therefore it might not have had a measurable influence on the genetic population structure yet.

RAPD's (random amplified polymorphic DNA) were used in order to measure the level of variation in the genome. At the DNA level populations are more differentiated than they are at the protein level. Within the dune population there is a significant correlation between geographical distance between populations and the level of gene flow. This suggests a normal meta-population structure. A cluster analysis on the similarity indices divides the sampled population in three groups, the partition of which is, in general, correlated with the time at which it is hypothesised that the populations were geographically separated.

In conclusion, there is no reason to assume that the sampled populations have a reduced level of genetic variation. Fragmentation within the dunes has not yet resulted in a strong differentiation of the different subpopulations. A number of barriers are presumably not effective enough to reduce the level of gene flow. In general, barriers between populations are of a recent origin and have not yet resulted in measurable changes in the genetic population structure.

The main recommendations for the long term survival of sand lizards in the Netherlands are a) management should be focused on a local growth of sand lizard populations by optimising the available habitat and reducing internal isolation, b) an increase in isolation of populations should be prevented and the possibility for migration between populations should be increased, and c) further research should be focused on small isolated populations to get a better insight in the effects of fragmentation and isolation.

INHOUD

	pag.
SAMENVATTING	1
SUMMARY	2
1. INLEIDING	5
1.1. Achtergronden	5
1.2. Doelstellingen van onderzoek aan zandhagedissen in de duinen	6
1.3. Genetisch en oecologisch onderzoek	7
2. METHODE	9
3. RESULTATEN	10
3.1. Allozym-analyse	10
3.2. DNA-analyse	11
3.3. Oecologisch onderzoek in de duinen	13
4. DISCUSSIE	15
4.1. Genetische variatie in de zandhagedis	15
4.2. Verspreidingspatronen	16
4.3. Isolatie op populatieniveau	17
5. AANBEVELINGEN	19
5.1. Beheer van populaties	19
5.2. Fragmentatie op populatieniveau	19
5.3. Verder onderzoek	20
LITERATUUR	21
APPENDICI	
I Verspreiding zandhagedis in Nederland en locaties van monsternamen	22
II Allozymvariatie	23

1. INLEIDING

1.1 Achtergronden

Eén van de hoofddoelstellingen van het landelijk natuurbeleid is het instandhouden, ontwikkelen en herstellen van natuurlijke en landschappelijke waarden (L.N.V. 1990). Een belangrijke reden voor de achteruitgang van deze waarden is de versnippering van natuurgebieden als gevolg van uitbereiding van stedelijke bebouwing en de aanleg van wegen. De Hollandse kustduinen is een van deze natuurgebieden waarbinnen naast versnippering tal van andere processen, zoals vergrassing, verdroging en verbossing een bijkomende negatieve invloed uitoefenen op natuurwaarden.

Voor een evaluatie van faunagerichte beheersmaatregelen in de duinen is de zandhagedis *Lacerta agilis* gekozen als indicatorsoort (OVERLEG DUINHAGEDIS 1995). De zandhagedis is een typische duinbewoner. Deze obligaat terrestrische soort wordt zeer gevoelig geacht voor genomen en te nemen beheersmaatregelen, zoals kappen, klepelen en het toelaten van verstuiwing en begrazing.

Nederland vormt de westelijke grens van het continentaal Euraziatische areaal van de zandhagedis. (Twee relict populaties bevinden zich nog verder naar het westen in zuid en noordwest Engeland.) Hoewel de soort sinds 1973 wettelijk beschermd is gaat het aantal gebieden waar hij voorkomt, alsmede de aantallen, nog steeds achteruit. Dientengevolge wordt de soort in Nederland als ernstig bedreigd beschouwd (BERGMANS & ZUIDERWIJK 1986). De zandhagedis is opgenomen in Appendix II van de Bern Conventie en Nederland draagt verantwoordelijkheid voor de soort op Europees niveau.

Binnen de Nederlandse populaties kunnen twee kerngebieden onderscheiden worden: de Veluwe met aangrenzend de Utrechtse Heuvelrug, en de kustduinen van Noord- en Zuid-Holland (ZUIDERWIJK ET AL. 1992). Op basis van verspreidingspatronen van de zandhagedis op de Waddeneilanden moet aangenomen worden dat de soort al voor kwam op de strandwallen die daar 7000 jaar geleden aanwezig waren. De populaties van het binnenland en de duinen zijn sedert ca. 1000 jaar geïsoleerd door het lage land van Holland. Tevens zijn ze geïsoleerd ten opzichte van populaties in het buitenland en moeten dientengevolge als intrinsieke eenheden beschouwd worden.

De habitatkwaliteit van de zandhagedis in de kustduinen is aan een gestage degradatie onderhevig. Toegenomen recreatie, verruiging en vergrassing door eutrofiëring en verzuring, verbossing en verdroging zijn hiervan mogelijke oorzaken. Tevens is de verspreiding gereduceerd tot een aantal van elkaar gescheiden deelpopulaties, waardoor uitwisseling tussen populaties bemoeilijkt wordt of onmogelijk is geworden. Een aantal van de barrières tussen deelpopulaties - zoals bijvoorbeeld het Noordzeekanaal - zijn absoluut en onomkeerbaar, terwijl andere - bijvoorbeeld een dichtbebost duingebied - door gericht beheer geslecht kunnen worden. Het huidige duinbeheer is erop gericht door habitatverbetering resterende populaties zandhagedissen te vergroten, de migratiedruk te verhogen (zie §5.1) en tevens potentiële

verbindingszones zo in te richten dat migratie van zandhagedissen tussen deelpopulaties bevordert wordt (ZUIDERWIJK 1993; OVERLEG DUINHAGEDIS 1995).

De populaties van zandhagedissen in de duinen zijn de laatste jaren onderworpen aan verspreidings-oecologisch onderzoek. Door middel van een monitoringprogramma wordt getracht de effecten van beheersmaatregelen in kaart te brengen en deze te evalueren (ZUIDERWIJK & SMIT 1992).

Om inzicht te krijgen in de effecten die barrières hebben op de genetische populatiestructuur van zandhagedissen in de Nederlandse kustduinen wordt sinds 1993 aan het Instituut voor Systematiek en Populatiebiologie van de Universiteit van Amsterdam onderzoek gedaan naar genetische variatie binnen en tussen populaties van deze soort (NIJMAN 1994; HAMERS 1995; VENEMA 1995).

Doel van dit rapport is een voorlopig overzicht te geven van de resultaten van het genetisch onderzoek en deze in verband te brengen met de resultaten van oecologisch onderzoek. Tevens worden aanbevelingen gedaan voor het te voeren beheer en de richting voor verder genetisch onderzoek. Indien het onderzoek gecontinueerd wordt dan zal een verdere uitbereiding van de dataset wellicht tot nieuwe inzichten leiden.

1.2 Doelstellingen van onderzoek aan zandhagedissen in de duinen

In Nederland worden als gevolg van toenemende menselijke activiteit, arealen van soorten dermate gefragmenteerd dat soorten met een van nature open populatiestructuur (populaties waartussen in ruime mate onderlinge uitwisseling van individuen en daarmee genetische informatie plaatsvindt) nu in een gesloten populatiestructuur (waar weinig tot geen uitwisseling tussen populaties plaatsvindt) gedwongen. Bovendien vindt veelal een afname plaats van het aantal individuen binnen een populatie. Isolatie en het kleiner worden van populaties kan leiden tot genetische verarming. Hier zijn twee processen voor verantwoordelijk: 'genetic drift' en inteelt. De mate waarin genetic drift - toevallige effecten die een verandering van de genetische samenstelling en afname van variabiliteit tot gevolg hebben - optreedt is omgekeerd evenredig met populatiegrootte. Des te kleiner de populatie des te groter de kans dat genetische informatie uit de populatie verdwijnt. In kleine geïsoleerde populaties neemt tevens de kans op het paren van nauwverwante individuen toe, waardoor er een fixatie van één van de homozygote genotypen kan plaatsvinden. Afname van genetische variabiliteit en inteeltdepressie leiden er toe dat een soort minder vermogen bezit om zich in de toekomst aan veranderende milieu-omstandigheden aan te passen.

Door de genetische variatie binnen een populatie te bepalen en deze te vergelijken met andere populaties kan een beeld verkregen worden van de populatiestructuur. Bovendien is zo te bepalen hoeveel genetische variatie er nog resteert in kleine populaties en of geografisch gescheiden populaties genetische differentiatie vertonen. Mate van differentiatie geeft een beeld van de tijdspanne waarin populaties van elkaar gescheiden zijn.

Voor de zandhagedis in de kustduinen levert dit concreet de volgende vragen op:

1. met welke non-destructieve methode valt genetische variatie binnen en tussen zandhagedissenpopulaties te meten.
2. welke mate van genetische variatie is aanwezig binnen de populaties in de duinen samen.
3. wat is de mate van genetische variatie binnen, in het veld waargenomen, gescheiden populaties.
4. welke mate van differentiatie is er al dan niet opgetreden tussen dergelijke populaties.

1.3 Genetisch en oecologisch onderzoek

Oecologisch onderzoek aan zandhagedissen wordt al sinds langere tijd in Nederland uitgevoerd (zie o.a. VAN LEEUWEN & VAN DER HOEF 1976; STRIJBOSCH 1988) en sinds enkele jaren vindt een concentratie van oecologisch onderzoek aan de soort plaats in de kustduinen (o.a. KEETMAN & DE VRIES 1994; HAMERS & VENEMA 1994; BRANDJES & GROENVELD 1995). Tevens is het duingebied speerpunt in het door het RAVON (Reptielen Amfibieën Vissen Onderzoek Nederland) gecoördineerde monitoring onderzoek (ZUIDERWIJK & SMIT 1992, 1993).

Genetisch onderzoek aan zandhagedissen is van recente datum. Een aantal populaties uit zuid Zweden zijn gebruikt in een onderzoek van GULLBERG ET AL. (1993) en vergeleken met een aantal individuen uit Hongarije, en in Engeland is herhaaldelijk op het nut van een genetisch onderzoek gewezen, met name in verband met een captive breeding programma, maar tot op heden zijn er geen concrete stappen genomen (CORBETT, 1994; J. CUTTING, pers. med.).

Voor het meten van genetische variatie in de Nederlandse populaties van de zandhagedis zijn twee complementaire onderzoeksmethoden gehanteerd. De genetische variatie is gemeten op eiwit niveau - de variatie in allelozymen door middel van elektroforese -, en op DNA niveau - door bepaling van de verschillen in het totaal aanwezige DNA met behulp van random primers.

Met enzymanalyse is het mogelijk om van afzonderlijke individuen de genetische variatiepatronen te bepalen en hiermee is het variatiepatroon van een populatie af te leiden. Omdat allozymen genproducten zijn, duiden verschillende verschijningsvormen van een specifiek allozym in meerdere individuen indirect op verschillen in genetische samenstelling tussen deze individuen. Bij analyse van tientallen allozymen wordt aldus een beeld verkregen van de aanwezige genetische variatie. Allozymanalyse is een gestabiliseerde techniek en is eerder toegepast in het genus *Lacerta* (zie bijvoorbeeld GORMAN ET AL. 1975). De verwerking van gegevens kan routinematig verlopen.

Met de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) techniek (WILLIAMS ET AL. 1990) kan direct variatie op het DNA niveau bepaald worden. Met een primer (met arbitraire sequentie en niet ontworpen voor een bepaald deel van het genoom) wordt DNA met behulp van een Polymerase Chain Reaction (PCR) geamplificeerd (MULLIS 1990). Stukken DNA kunnen door

individuele verschillen in DNA sequentie in het ene individu wel en in het andere individu niet geamplificeerd worden. Bij bepaling van variatiepatronen van meerdere individuen uit een populatie kan een beeld verkregen worden van de genetische variatie die aanwezig is in deze populatie. Omdat met RAPD direct gemeten wordt op het genotypisch niveau, veel genetische veranderingen neutraal zijn en niet alle genotypische veranderingen noodzakelijkerwijs tot expressie komen, zal er eerder variatie gevonden worden dan door indirecte bepaling met enzymanalyse. RAPD analyse is een relatief nieuwe techniek (WILLIAMS ET AL. 1990). Interpretatie van de resultaten bevindt zich nog in een ontwikkelingsfase en er zijn geen vergelijkbare onderzoeken in het genus *Lacerta* voorhanden.

2. METHODE

Technieken voor monsternames zijn ontwikkeld (NIJMAN 1993) en geperfectioneerd (HAMERS & VENEMA 1994). Spierweefsel en bloedmonsters worden verzameld door amputatie van de staartpunt. Gebleken is dat 1/3 deel van het caudale deel van de staart ruimschoots voldoende materiaal oplevert voor gelelectroforese van allozymen. Bij een schuine incisi treedt tevens een kleine bloeding op zodat tussen de 10 en 30 µl bloed verzameld kan worden. Hieruit kan minimaal 2,5 µg DNA geïsoleerd worden. Voor één PCR reactie met RAPD oligoprimers is 0,01 µg voldoende; de gehanteerde monstername levert ruimschoots voldoende materiaal op.

De door de monstername gedwongen amputatie van een staartdeel is vergelijkbaar met natuurlijke autotomie (zelfamputatie van de staart als anti-predatie mogelijkheid of als gevolg van onderlinge gevechten). In het veld zijn veelvuldig zandhagedissen gesignaleerd met geregenereerde staartdelen. VAN LEEUWEN & VAN DE HOEF (1976) vonden dat in een duinterrein op Oostvoorne 62 % (vrouwjes) tot 64% (mannetjes) van de zandhagedissen geregenereerde staarten hadden, in de Amsterdamse Waterleidingduinen was dit 15% (BRANDJES & GROENVELD 1995). Het regeneratievermogen van de staart bedraagt 1-2 mm per dag en na tien weken is er vrijwel geen verschil meer te zien in de lengte tussen de primaire en secundaire staarten; verschil in kleur en weefseltype blijft aanwezig.

In de zomermaanden van 1993 zijn 30 individuen bemonsterd uit 4 verschillende populaties en in de zomermaanden van 1994 zijn nog eens 53 individuen bemonsterd uit 7 populaties. Individuen uit het Meinweg gebied in Noord-Limburg en individuen uit de omgeving van Nijmegen zijn gebruikt als outgroup. Zie tabel 1.

Tabel 1: locaties waar zandhagedissen *Lacerta agilis* zijn verzameld voor genetisch onderzoek in de periode 1993-1995 (uit NIJMAN 1993; HAMERS & VENEMA 1994).

Table 1: Localities where sand lizards *Lacerta agilis* were sampled for genetic research during the years 1993-1995 (from NIJMAN 1993; HAMERS & VENEMA 1994).

Monstersname 1993		Monstername 1994	
Bergen en Castricum	4	Bergen	9
		Castricum	6
Santpoort tot Overveen	22	Overveen	8
		Vogelenzang	8
		Noordwijk	8
Katwijk	1	Katwijk	8
		Nijmegen	6
Meinweg	3		
totaal	30		53

3. RESULTATEN

3.1 Allozym analyse

Betrouwbare patronen van enzymkleuringen werden gevonden voor 22 enzymen, waarschijnlijk coderend voor 29 loci ($n=30$) (NIJMAN 1993) en voor 20 enzymen, waarschijnlijk coderend voor 27 loci ($n=51$) (VENEMA 1995). Zie appendix II.

Het gemiddeld aantal effectieve allelen bedroeg 1.4 met een spreiding van 1.3-1.5 (NIJMAN 1993) en 1.2 met een spreiding van 1.1-1.3 (VENEMA 1995).

De gemiddelde heterozygotie [H] per individu was 0.041 (NIJMAN 1993) en 0.049 (VENEMA 1995). Deze waarden zijn in overeenstemming met eerder gevonden waarden binnen het genus *Lacerta* (*L. sicula*, $H=0.064$, *L. melisellensis*, $H=0.039$, *L. oxycephala*, $H=0.053$; GORMAN ET AL. 1975), en wijzen op een voldoende hoge variatie. In ieder geval geven deze waarden geen aanleiding te veronderstellen dat de populaties van zandhagedissen in de Nederlandse kustduinen door een genetische bottleneck zijn gegaan. De huidige populaties zandhagedissen die aanwezig zijn in de kustduinen stammen waarschijnlijk niet af van enkele individuen. Een relatief grote aanvangspopulatie moet de kustduinen gekoloniseerd hebben. De Nederlandse populaties hebben in vergelijking tot die in Zweden een grotere mate van variatie op eiwitniveau (GULLBERG ET AL., 1993). In Zweden zijn populaties te beschouwen als relictten uit de postglaciale periode (ca. 5000-6000 jaar geleden), toen het klimaat milder was, en zijn waarschijnlijk langer onderling geïsoleerd dan in Nederland het geval is.

Nei indexen voor genetische gelijkheid tussen populaties (Nei 1978; 1987) zijn berekend. De gemiddelde waarde was 0.96 (range 0.93-0.99) (NIJMAN 1993) en 0.99 (range 0.97-1.00) (VENEMA 1995). Bij een waarde van 1 zijn er geen verschillen tussen populaties en kunnen ze op genetische gronden (nog) als één populatie worden beschouwd. De gevonden gelijkheidsindexen duiden op weinig verschillen tussen populaties.

Genetische diversiteit tussen populaties was ongeveer twee maal zo groot als de genetische diversiteit binnen populaties. De variatie tussen populaties heeft dan ook het grootste aandeel in de totale genetische variatie van de zandhagedispopulaties (zie VENEMA 1995).

De gemiddelde N_m waarde is 2.01; per generatie migreren er gemiddeld 2 individuen tussen populaties en komen daar tot reproductie. Dit geeft aan dat er weinig sprake is van differentiatie tussen de geteste populaties en dat er een ruime mate van genetische uitwisseling plaatsvindt (VENEMA 1995), of dat de reductie in gene flow zo recent is dat dit nog geen, althans geen meetbare, invloed heeft gehad op de genetische populatiestructuur.

In het kort duiden de resultaten er op dat de populaties zandhagedissen in Nederland een met andere *Lacerta* soorten overeenkomstige genetische variatie bezit. Er zijn geen aanwijzingen dat de populaties door een aanzienlijke bottleneck zijn gegaan. In het verleden is geen sterke reductie in het aantal zandhagedissen opgetreden die een meetbare invloed kon uitoefenen op de genetische populatiestructuur. Verder vindt nog in voldoende mate uitwisseling plaats tussen

populaties, of zijn de barrières van zodanig recente oorsprong dat geen meetbare reductie van genetische uitwisseling plaats heeft gevonden.

3.2 DNA-analyse

In vier populaties zijn private allelen (allelen die slechts in één populatie voorkomen, maar niet noodzakelijkerwijs in alle individuen van deze populatie) aangetroffen: Bergen (2 private allelen), Castricum, Katwijk en Nijmegen (elk één privaat allel).

De Nei index varieert tussen 0.30 en 0.52 met een gemiddelde waarde van 0.40. De gemiddelde heterozygotie is 0.24 (HAMERS 1995). Deze met RAPD gevonden Nei indexen en heterozygotiewaarden zijn niet rechtstreeks vergelijkbaar met allozymen: bij RAPD patronen worden gelijke banden per definitie niet gescoord. Wel geven de gevonden Nei indexen informatie over de mate van overeenkomst tussen de verschillende populaties.

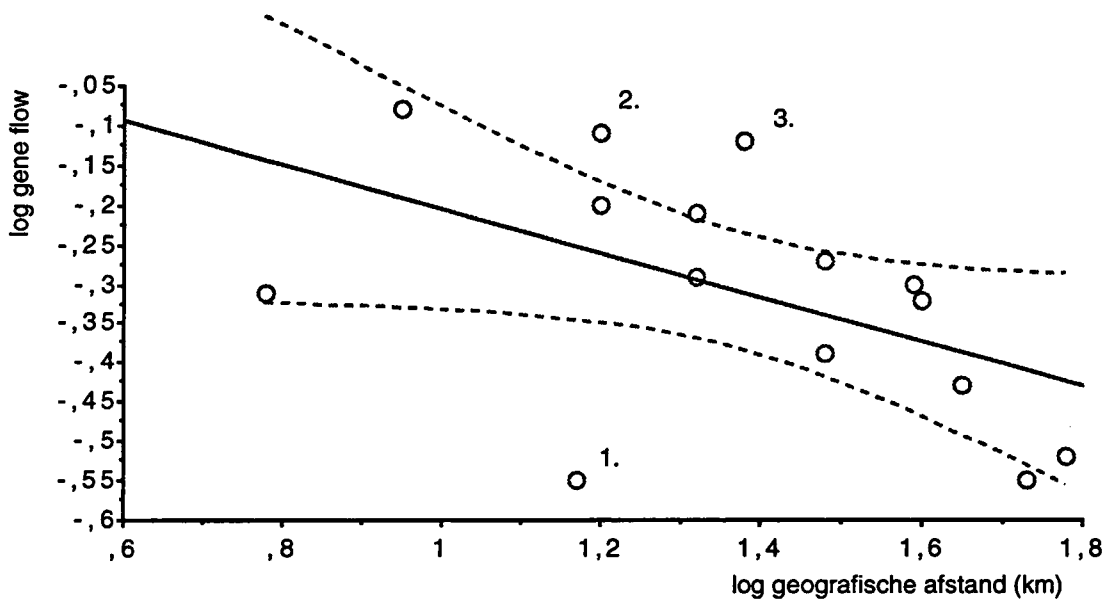


Fig. 1. Verband tussen mate van genetische uitwisseling en geografische afstand tussen populaties van de zandhagedis *Lacerta agilis* in de duinen, met het 95% betrouwbaarheidsinterval voor de gemiddelde waarde van y. Het verband kan worden beschreven als $y = -0,28x + 0,075$, $r = 0,515$, $p < 0,05$. 1.= Bergen-Castricum; 2.= Vogelenzang-Noordwijk; 3.= Overveen-Noordwijk. Mate van gene flow uit HAMERS (1994).

Fig. 1. Relationship between level of gene flow and geographic distance between populations of sand lizard *Lacerta agilis* in the dunes, with 95% confidence intervals of the mean value of y. The relationship is described by $y = -0,28x + 0,075$, $r = 0,515$, $p < 0,05$. 1.= Bergen-Castricum; 2.= Vogelenzang-Noordwijk; 3.= Overveen-Noordwijk. Level of gene flow taken from HAMERS (1994).

De relatie tussen geografische afstand tussen populaties en mate van genetische uitwisseling is niet significant ($r = -0,36$, $p > 0,10$). Vergelijken we alleen de duinpopulaties (figuur 1), dan vinden we wel een significant verband tussen geografische afstand en gene flow hetgeen overeenkomt met de verwachte opbouw van de metapopulatie binnen de duinen. Hoe groter de afstand tussen twee populaties hoe lager de genetische uitwisseling tussen deze populaties.

Voor populaties uit Bergen en Castricum werd ondanks de kleine afstand (15 km) slechts een relatief lage genetische uitwisseling gemeten. Daarbij werd een hoge mate van genetische uitwisseling gemeten tussen populaties uit Katwijk en Nijmegen (HAMERS 1995); dit moet duiden op een geringe differentiatie tussen deze twee geografisch gescheiden populaties.

Inteeltcoëfficiënten in subpopulaties (F_{st}) zijn berekend. De inteeltcoëfficiënt geeft de reductie van heterozygotie aan in een bemonsterde populatie ten opzichte van de totaal bemonsterde populatie, als gevolg van random genetic drift. De op deze manier verkregen inteeltcoëfficiënten kunnen beschouwd worden als een maat voor genetische fixatie. Bij een F_{st} waarde van 1 tussen twee populaties is er een maximale differentiatie gemeten, bij 0 totaal geen.

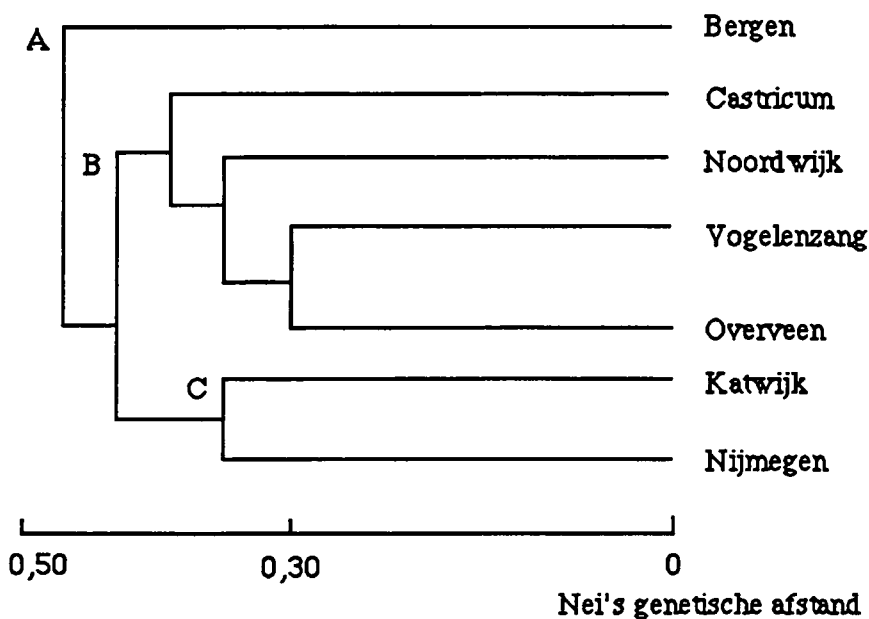


Fig.2. Mate van genetische overeenkomst tussen populaties van de zandhagedis *Lacerta agilis*. De groepering is verkregen uit een unweighted pair group arithmetic average (UPGMA) cluster analyse gebruik makend van Nei indici (Data uit HAMERS 1995).

Fig. 2. Genetic similarity between populations of sand lizard *Lacerta agilis*. Clustering was obtained with unweighted pair group arithmetic average (UPGMA) cluster analysis, using Nei indicies (Data taken from HAMERS 1995).

De gemiddelde Fst waarde bedraagt 0.36, met een maximum waarde van 0.48, dus een hoge mate van differentiatie, tussen populaties uit Bergen en Noordwijk en een bijna even hoge waarde (0.47) tussen populaties uit Bergen en Castricum. Een laagste waarde van 0.22 is gevonden tussen populaties uit Nijmegen en Katwijk.

Een UPGMA (Unweighted Pair Group Arithmetic Average) cluster analyse gemaakt met behulp van de gevonden Nei indexen, geeft een beeld over de verwantschap tussen de bemonsterde zandhagedispopulaties (zie figuur 2).

De populaties van Katwijk en Nijmegen worden geclusterd (groep C), Noordwijk, Vogelenzang en Overveen komen samen met Castricum in een groep terecht (groep B) en Bergen wordt als aparte groep (A) beschouwd.

Samenvattend komt uit de RAPD analyse naar voren dat de populaties van zandhagedissen op DNA niveau duidelijk gedifferentieerd zijn en dat deze differentiatie in het algemeen samenhangt met het tijdstip waarop een scheiding tussen de populaties heeft plaatsgevonden. De mate van genetische uitwisseling en de afstand tussen populaties binnen de duinen vertoont een significant negatieve correlatie, wat duidt op een verwachte opbouw van de metapopulaties binnen dit deel van Nederland. Wanneer de populatie uit de omgeving van Nijmegen echter bij de analyse betrokken wordt dan is er geen significante correlatie. De populatie uit Nijmegen is minder van de duinpopulaties gedifferentieerd dan op grond van afstand alleen verwacht zou worden; ofwel de populaties binnen de duinen zijn meer van elkaar gedifferentieerd dan op grond van hun differentiatie met de binnenlandse populatie (Nijmegen) verwacht zou worden. De implicaties voor het gevondene zijn nog niet duidelijk. De positie die de populatie uit Bergen inneemt is niet conform de gevonden correlatie.

3.3 Oecologisch onderzoek in de duinen

Een studie van VAN LEEUWEN & VAN DE HOEF (1976) naar de oecologie en populatiedynamica van de zandhagedis in de duinen van Oostvoorne schetst de randvoorwaarden van een geschikt biotoop voor zandhagedissen. Juvenielen, volwassen mannetjes in de paartijd en drachtige wijfjes in de periode van eiafzetting vertonen de grootste neiging tot (lokale) trek. Dispersie treedt op in eerste- tot derde-jaars individuen. Populatieaanwas in het studiegebied van 11 ha, met 35 seditaire individuen, is geschat op 131 (VAN LEEUWEN & VAN DE HOEF 1976).

Home ranges verschillen tussen de beide sexen en is afhankelijk van het biotoop. In geschikt heidebiotoop liep dit uiteen van 250 m² voor vrouwtjes tot 550 m² voor mannetjes en in een volledig vergrast biotoop bedroeg dit respectievelijk 400 m² en 1350 m². In grote binnenlandse populaties worden dichtheden gerapporteerd van tussen de 90 en 100 individuen per hectare (STRIJBOSCH *in* HARTUNG & KOCH 1988).

Voor een meer volledig overzicht over de oecologische eisen van de zandhagedis zie OVERLEG DUINHAGEDIS (1994). Recent oecologisch onderzoek naar de zandhagedis in de

kustduinen heeft zich toegespitst op eiafzetplaatsen (KEETMAN & DE VRIES 1994) en biotoopvoorkeur (BRANDJES & GROENVELD 1995). Een populatieschatting voor de Amsterdamse Waterleidingduinen (BRANDJES & GROENVELD 1995) geeft een minimum van 22.866 individuen, met een gemiddelde waarde van 7,4 individuen per hectare.

4. DISCUSSIE

4.1 Genetische variatie in de zandhagedis

De ontwikkelde techniek voor monstername levert voldoende weefsel op voor het genetisch onderzoek. Het is niet nodig dieren te doden. De mate en duur van verstoring die de monstername oplevert voor zandhagedissen lijkt acceptabel; monstername kan in het veld gebeuren en dieren hoeven niet per se uit hun habitat genomen te worden. Amputatie van éénderde deel van de lengte van de staart levert een verlies op voor het individu in termen van absoluut gewicht en energie, maar daar monstername in de meest gunstige periode, de zomermaanden, gebeurt, is het waarschijnlijk dat er voldoende tijd en gelegenheid is om tot een snelle regeneratie te komen. Waargenomen gevallen van staartbreuk (autotomie) in het veld was in het algemeen niet beperkt tot slechts eenderde deel van de lengte, maar vrijwel altijd meer, tot bijna de gehele staart aan toe.

De bemonsterde populaties verschillen weinig van elkaar op eiwitniveau. De gevonden gelijkheidsindici en de mate van genetische uitwisseling zijn relatief hoog en duiden op een geringe mate van differentiatie tussen populaties.

De gevonden heterozygotiewaarden zijn in overeenstemming met eerder gevonden waarden binnen het genus *Lacerta* (GORMAN ET AL., 1975) en geven geen aanleiding te veronderstellen dat de populaties zandhagedissen in Nederland een ernstige reductie in mate van genetische variatie vertonen. Tevens geeft het een aanwijzing dat zandhagedissen in de kustduinen niet door een zodanige bottleneck zijn gegaan dat deze een meetbaar effect kon uitoefenen op de genetische populatiestructuur.

Op DNA niveau zijn, zoals verwacht, grotere verschillen tussen populaties gevonden. De gevonden RAPD patronen geven in een UPGMA cluster analyse een verdeling in drie groepen populaties: a) Bergen, b) Castricum, Noordwijk, Vogelenzang en Overveen en c) Katwijk en Nijmegen. De geïsoleerde positie die de populatie uit Bergen hierin inneemt is van onduidelijke oorsprong en kan duiden op een genetische scheiding van Bergen en de overige populaties in het verleden.

De metapopulatie-opbouw binnen de duinen is conform het verwachte patroon: geografische afstand tussen populaties en mate van genetische uitwisseling zijn significant negatief gecorreleerd. De significantie verdwijnt wanneer de populatie uit Nijmegen bij de analyse betrokken wordt.

De mate van genetische variatie die resteert in de verschillende populaties, zoals bepaald met de RAPD techniek, kan (nog) niet vergeleken worden met die uit andere onderzoeken of andere gebieden daar deze gegevens niet voor handen zijn. GULLBERG ET AL (1993) bestudeerde mtDNA variatie van zandhagedispopulaties in zuid Zweden en vergeleek die met een populatie van Hongarije. De variatie binnen de Hongaarse populatie was groter dan die binnen de verschillende Zweedse populaties samen, wat aangeeft dat de Zweedse populaties genetisch weinig van elkaar verschillen.

4.2 Verspreidingspatronen

Anders dan ZUIDERWIJK ET AL. (1992) veronderstelden, worden de populaties zandhagedissen niet in de eerste plaats gescheiden door het lage land van Holland (ouderdom ca. 1000 jaar), maar door de ligging van de grote rivieren. Voor de obligaate terrestrische zandhagedis is een brede rivier een onoverkomelijke barriere. Een mogelijk scenario om de verspreiding van de verschillende populaties zandhagedissen in Nederland te verklaren is de volgende.

De Rijn vormt in dit scenario de eerste scheiding tussen de populaties van Nijmegen en Katwijk met de overige bemonsterde populaties. Ten noorden van Katwijk stroomt de Oude Rijn de Noordzee in. De scheiding tussen populaties zandhagedissen van Noordwijk en Katwijk is in ruimte slechts een paar kilometer, maar de hogere mate van overeenkomst tussen de populaties van Katwijk en Nijmegen in vergelijking met die tussen Katwijk en Noordwijk is een aanwijzing dat de laatste twee populaties in de tijd veel langer gescheiden zijn. Pas na de scheiding van zandhagedissenpopulaties in een noordelijke en zuidelijke groep heeft er waarschijnlijk een verdere scheiding plaatsgevonden in een westelijke en een oostelijke groep ten gevolge van de ongeschiktheid van het lage land van Holland als habitat voor de zandhagedis. De meer recente opdeling van zandhagedispopulaties in de kustduinen ten gevolge van de aanleg van het Noordzeekanaal in 1876, heeft geresulteerd in een geringe differentiatie (gemeten op het DNA niveau) tussen populaties ten zuiden (Overveen, Vogelenzang en Noordwijk) en de populatie ten noorden van het Noordzeekanaal (Castricum).

De zandhagedispopulatie uit Bergen is gedifferentieerd, alweer op het DNA niveau gemeten met RAPD's, van populaties direct in het zuiden (Castricum) en er vindt een mindere gene flow plaats dan tussen overige populaties. Een mogelijke verklaring kan komen uit de habitatverschillen: tussen Bergen en Castricum vindt een scherpe scheiding plaats van kalkarme duinen naar kalkrijk. De bodems ten noorden en ten zuiden van deze scheidingslijn hebben een andere origine, wat o.a. resulteert in een verschil in samenstelling van de flora (WEEDA 1990). De bemonsterde populaties uit Bergen komen uit een heidegebied op kalkarme grond, die uit Castricum uit een meer 'typische' duinvegetatie van kalkrijke grond. Mogelijk stamt de populatie uit Bergen af van een andere aanvangspopulatie dan die van populaties meer uit het zuiden en zijn de populaties via verschillen in habitatvoorkeur ruimtelijk gescheiden. Nader onderzoek hiernaar is gewenst.

De historische barrieres die het areaal van de zandhagedis in Nederland opgedeeld hebben, zijn van verschillende ouderdom. Indien een barriere vanaf zijn ontstaan constant is gebleven kunnen we een hiërarchisch systeem opstellen waarin in de loop der tijd door verdere fragmentatie steeds kleinere eenheden zijn ontstaan. Voor de bemonsterde populaties is dit schema als volgt. Eerst vond een scheiding plaats tussen het leefgebied ten noorden en ten zuiden van de grote rivieren, vervolgens (ongeveer 1000 jaar geleden) een isolatie van de populaties in de duinen en die van de zandgronden in midden en oost Nederland, met daarna de scheiding tussen Noord en Zuid Holland door de aanleg van het Noordzeekanaal (120 jaar geleden) en tenslotte de verdere versnippering binnen de duinen (laatste decennia).

4.3. Isolatie op populatieniveau

De populaties zandhagedissen in de duinen zijn duidelijk geïsoleerd van de overige populaties in Nederland zoals bijvoorbeeld die op de Utrechtse Heuvelrug of de Veluwe. Er vindt blijkbaar geen uitwisseling plaats tussen deze populaties en de scheiding tussen deze populaties bestaat naar alle waarschijnlijkheid al duizenden jaren. De zandhagedispopulaties in de kustduinen dienen dan ook als genetisch gescheiden van de overige Nederlandse populaties beschouwd te worden.

De door ZUIDERWIJK ET AL. (1992) en OVERLEG DUINHAGEDIS (1995) vastgestelde fragmentatie van populaties binnen de duinen is genetisch gering en differentiatie van de verschillende populaties is alleen op DNA niveau vast te stellen. Wellicht is de fragmentatie genetisch minder dan op grond van oecologische waarnemingen gesuggereerd wordt. Enerzijds zijn veel barrières nog van te recente oorsprong om in aantoonbare verschillen te resulteren, anderzijds moet een barrière zeer effectief zijn om tot een genetische differentiatie te leiden. Bij lang levende organismen, met overlappende generaties, hoeven slechts zeer weinig individuen jaarlijks tussen populaties te migreren om tot een genetische link van populaties te komen. De door ZUIDERWIJK & SMIT (1993) onderscheiden populaties binnen de duinen bestaan stuk voor stuk uit duizenden individuen, die jaarlijks een veelvoud aan jongen produceren. Het zijn juist deze juvenielen (en ongepaarde mannetjes) die de grootste neiging tot migreren vertonen en daarmee mogelijk een genetische verbinding kunnen vormen tussen populaties. Van de negen door ZUIDERWIJK & SMIT (1992, 1993) gevonden barrières zijn er waarschijnlijk maar een beperkt aantal effectief genoeg om genetische uitwisseling te voorkomen. Hierbij moet gedacht worden aan het Noordzeekanaal, de Kromme Rijn, en andere waterwegen. Barrières als de Hondsbosse en Pettemer Zeewering zullen een zeer grote reductie in geneflow tot gevolg hebben, waarschijnlijk groot genoeg om uiteindelijk tot genetische gedifferentieerde populaties te leiden. Echter, af en toe komen er waarnemingen binnen van zandhagedissen die gevonden zijn op juist die plaatsen die als barrière aangemerkt worden zoals de Hondsbosse en Pettemer Zeewering, de weg naar Zandvoort die het duingebied doorsnijdt en smalle duinstroken. Tevens zijn zandhagedissen op het strand aangetroffen, waarmee het strand en tevens de zeereep als mogelijke migratieroute niet uitgesloten kunnen worden. Er zijn gebieden in de duinen te herkennen die geschikter zijn voor zandhagedissen dan andere en deze kunnen gescheiden zijn door ongeschikt gebied. Uitgestrekte dennenbossen worden als zeer ongeschikt habitat aangemerkt. Bepaalde gebieden binnen dit habitatype, bijvoorbeeld zandwegen en gebieden met jonge aanplant, kunnen echter voldoende geschikt zijn voor zandhagedissen (DENT & SPELLERBERG 1987).

Om tot een duidelijke genetische differentiatie te komen dienen scheidingen absoluut en van lange duur te zijn en tevens, om het proces te versnellen, dienen de populaties aan beide zijden van de barrière relatief klein in omvang te zijn. Dit is voor de meeste barrières, met uitzondering van de grote waterwegen, niet het geval.

Inteeltdressie is een reëel verschijnsel in kleine populaties en treedt versneld op in populaties met discrete generaties. Daar zandhagedissen 12 tot 15 jaar oud kunnen worden zal een reductie in genetische variatie in een populatie, die afgescheiden is geraakt van andere

populaties, gering zijn en pas na relatief lange tijd aantoonbaar. De meeste van de in de duinen aangemerkte geïsoleerde populaties zijn dit pas sinds enkele tientallen jaren. De gebieden zijn, op enkele uitzonderingen na, waarschijnlijk elk nog groot genoeg om, zeker in het recente verleden, enkele honderden individuen te dragen. Het aantonen van inteeltdepressie in dergelijke populaties is nog niet, of zeer moeizaam, aantoonbaar.

De zandhagedis is een soort die van nature in de duinen voorkomt en als zodanig ook aan dit milieu aangepast is. Het duinlandschap is een dynamisch milieu: door successie, brand en verstuiwing kunnen bepaalde gebieden plaatselijk ongeschikt raken. Dit kan tot gevolg hebben dat lokale populaties uitsterven. Door migratie vanuit naburige populaties kunnen deze gebieden weer herbevolkt worden. De sociale structuur van de zandhagedis leidt er toe dat elk jaar een zeer groot deel van de populatie in min of meerdere mate neiging tot migratie vertoont. Zandhagedissen in optimale biotopen vertonen een mindere mate van verplaatsing dan zandhagedissen in suboptimale biotopen. De jaarlijkse verplaatsing van dieren in bosgebieden, via (zand)wegen, brandgangen en randen, kan 2 tot 4 km bedragen (KLEWEN 1988).

Polygamie, het paren van één mannetje met meerdere wijfjes, leidt tot een verminderde genetische variatie in een volgende generatie in vergelijking met een monogame voorplantingsstrategie. Het surplus aan mannetjes vertoont echter een vergrote neiging tot migratie, wat leidt tot een toename van uitwisseling van genetische informatie tussen populaties en daarmee tot een vergroting van de genetische variatie binnen populaties.

De zandhagedis is wellicht een geschikte soort voor het monitoren van beheerseffecten in de duinen, voor het bepalen van genetische effecten van isolatie en reductie in populatieaantallen is ze minder geschikt gebleken. In de meeste duinpopulaties is het niet waarschijnlijk dat de genetische variatie drastisch gereduceerd is. De sociale structuur en de relatief lange levensduur voorkomen een snelle reductie in genetische variabiliteit in een kort tijdsbestek. De genetische veranderingen die plaatsvinden in een soort ten gevolge van habitatdegradatie en habitatfragmentatie kunnen waarschijnlijk effectiever bestudeerd worden in organismen met een kortere generatietijd en met discrete generaties, zoals bijvoorbeeld sommige soorten dagvlinders.

Daar isolatie en fragmentatie van de zandhagedispopulaties in de duinen op genetisch niveau gering is, mag verondersteld worden dat het in omvang toenemen van populaties en het met elkaar in contact brengen van gescheiden populaties geen negatieve gevolgen zal hebben voor die populaties.

5. AANBEVELINGEN

5.1 Beheer van populaties

De meeste aanbevelingen ten behoeve van het beheer die voortkomen uit genetisch onderzoek verschillen niet veel van aanbevelingen gebaseerd op oecologisch (VAN LEEUWEN 1991; HAMERS & VENEMA 1994), en/of verspreidingsoecologisch onderzoek (ZUIDERWIJK ET AL., 1992; ZUIDERWIJK & SMIT 1992, 1993).

Om de negatieve effecten van habitatfragmentatie op het schaalniveau van lokale populaties terug te dringen, zal de grootste aandacht besteed moeten worden aan het beheer van gebieden. Het voorkomen van verdergaande isolatie binnen leefgebieden zal daarbij één van de hoofddoelstellingen moeten zijn.

Een doelgericht beheer, gericht op het bevorderen van variatie in de vegetatiestructuur en het vergroten van mogelijkheden voor incubatie en thermoregulatie, zal mogelijk bijdragen tot een toename van het aantal individuen binnen een populatie. Naar verwacht mag worden zal dit leiden tot een toename van de migratiedruk naar naburige populaties en andere gebieden.

Voor een uitvoeriger discussie over de effecten van beheer op zandhagedissenpopulaties in de duinen zie OVERLEG DUINHAGEDIS (1994), en voor de benaderingen in Groot Brittanië zie CORBETT & TAMARIND (1979), HOUSE & SPELLERBERG (1983) en CORBETT (1994).

4.2 Fragmentatie op populatieniveau

Voor het op lange termijn behouden van de zandhagedis in Nederland is het noodzakelijk dat er een zekere mate van uitwisseling bestaat tussen een aantal deelpopulaties. Dit geeft de mogelijkheid tot genetische uitwisseling en tevens vergroot het de kans op herkolonisatie van gebieden na het lokaal uitsterven van de aanwezige populatie.

Om uitwisseling tussen populaties mogelijk te maken zullen een aantal daadwerkelijke barrières opheffen of verzacht dienen te worden. Bij het bepalen van barrières dient rekening gehouden te worden met de migratiemogelijkheden en habitatvoorkeuren van de zandhagedis. Verspreiding via migratiebanen in suboptimaal habitat (brandgangen in bosgebieden, paden e.d.) kan tot 4 km per jaar bedragen (KLEWEN, 1988) en door het creëren van 'suboptimale' plekken (bijvoorbeeld de aanleg van relatief grootschalige open plekken in het bos) kunnen mogelijk verder gelegen gebieden met elkaar in verbinding gebracht worden.

In het algemeen kan gesteld worden dat genetische factoren niet behoren tot de belangrijkste redenen voor het uitsterven van soorten; habitatdestructie en -fragmentatie zijn dat wel. Dus, hoewel genetische factoren belangrijk zijn in het voortbestaan van populaties op de lange termijn, hebben bedreigde populaties meer belang bij korte termijn oecologisch management, en oecologisch management moet als de goedkoopste en meest effectieve manier voor het behouden van genetische diversiteit in zandhagedissen beschouwd worden.

4.3 Verder onderzoek

Verder onderzoek zou gericht kunnen worden op de genetische effecten van isolatie en de daadwerkelijke mate van genetische uitwisseling tussen populaties. Voor het aantonen van inbreeding of een reductie in genetische variabiliteit zijn de meeste populaties in de duinen nog te groot van omvang en is de reductie in populatiegrootte nog een te recent verschijnsel. Bovendien zijn de meeste duinpopulaties zeer recent van elkaar geïsoleerd geraakt en een aantal barrières zijn niet effectief genoeg om het uitwisselen van individuen tegen te gaan.

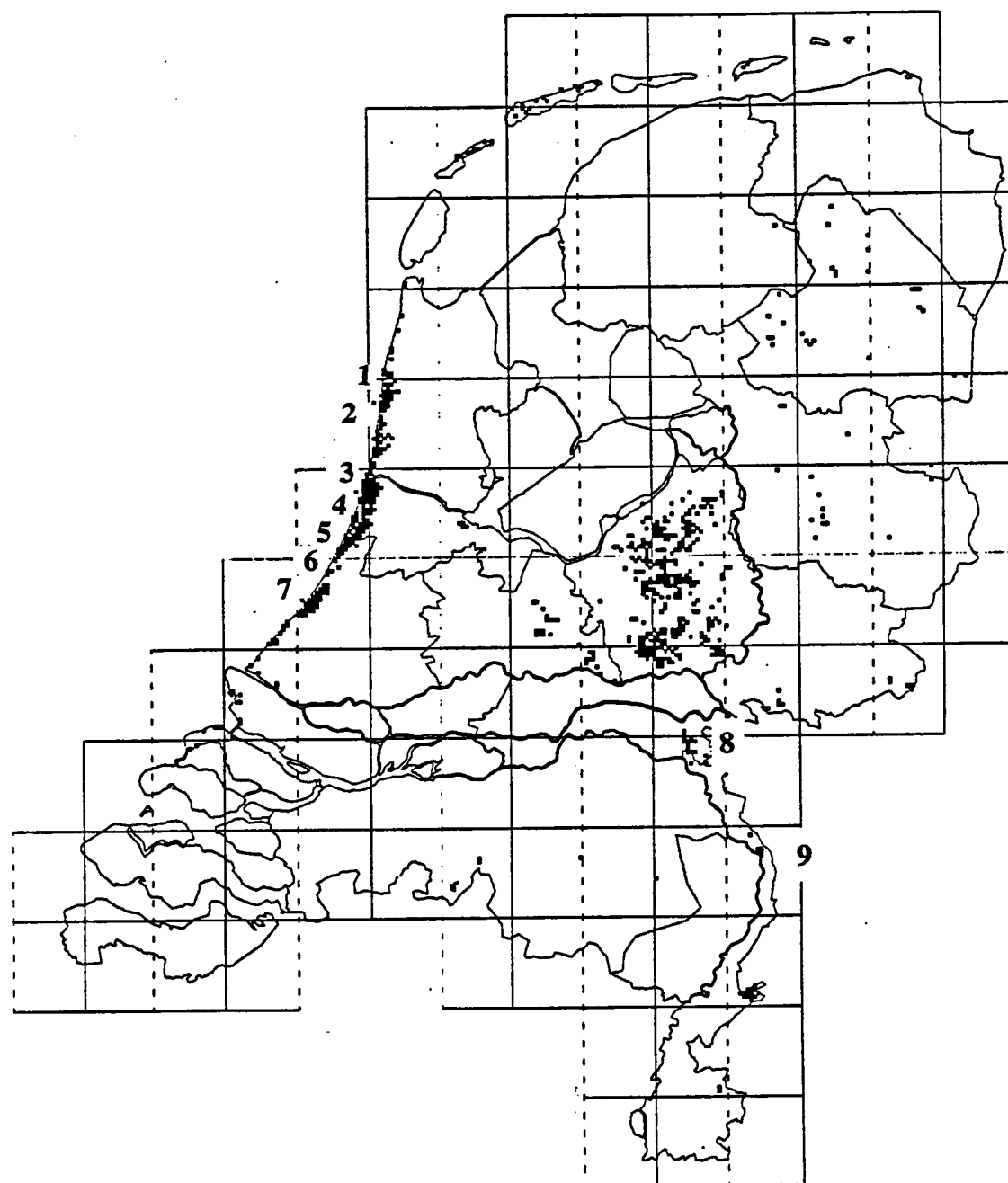
Mogelijke kandidaatpopulaties voor een onderzoek toegespitst op de genetische effecten van isolatie en geringe populatiegrootte zijn te vinden op de Waddeneilanden of eilanden in het Deltagebied. Recente gegevens geven aan dat dit mogelijk moet zijn voor populaties zandhagedissen die zich bevinden op Vlieland, Terschelling en Voorne (A. Zuiderwijk, pers. med. 1995). Populaties op deze eilanden zijn sedert het Atlanticum (ca. 5-6000 jaar geleden) effectief van elkaar en van de rest van de duinen gescheiden en zijn van voldoende kleine omvang om tot een versnelde reductie in genetische variatie te leiden. Deze populaties zouden als model kunnen dienen voor het voorspellen van effecten van een verdere fragmentatie van zandhagedissenhabitat in de kustduinen van het vasteland. Bij een eventueel vervolgonderzoek kunnen dan tevens individuen uit Bergen betrokken worden om beter inzicht in de hier gevonden resultaten te verkrijgen.

Samenwerking met organisaties in het buitenland zoals English Nature en de Herpetological Conservation Trust in Groot-Britannië en het opzetten van een gezamenlijk onderzoek naar de effecten van genetische isolatie geeft inzicht in de evolutionaire geschiedenis van de zandhagedis en kan tevens leiden tot nieuwe ideeën inzake de instandhouding van de soort.

LITERATUUR

- BERGMANS, W. & ZUIDERWIJK, A. 1986. Atlas van de Nederlandse amfibieën en reptielen en hun bedreiging. Koninklijke Nederlandse Natuurhistorische Vereniging & Nederlandse Vereniging voor Herpetologie en Terrariumkunde *Lacerta*, Hoogwoud.
- BRANDJES, G.J. & GROENVELD, A. 1995. Biootoopvoorkeur van de zandhagedis (*Lacerta agilis*) in de Amsterdamse Waterleidingduinen. ISP, Universiteit van Amsterdam.
- CORBETT, K.F. 1994. Pilot study for sand lizard UK recovery programme. English Nature Research Reports no. 102. English Nature, Peterborough.
- CORBETT, K.F. & TAMARIND, D.L. 1979. Conservation of the sand lizard, *Lacerta agilis*, by habitat management. *Brit. J. Herpetol.* 5: 799-823.
- DENT, S. & SPELLERBERG, I.F. 1987. Habitats of the lizards *Lacerta agilis* and *Lacerta vivipara* on forest ride verges in Britain. *Biol. Conserv.* 42: 273-286.
- GORMAN, G.C., SOULÉ, M., YANG, S.Y. & NEVO, E. 1975. Evolutionary genetics of insular Adriatic lizards. *Evolution* 29: 52-71.
- GULLBERG, A., TEGELSTRÖM, H. & OLSSON, M. 1993. Genetic analysis of a species with fragmented distribution: the sandlizard (*Lacerta agilis*). Unpublished MS, Dept. of Genetics, Uppsala University, Sweden.
- HAMERS, J. 1995. Populatie differentiatie in 'Randomly Amplified Polymorphic DNA' van de zandhagedis *Lacerta agilis*. Rapport ISP. Universiteit van Amsterdam.
- HAMERS, J. & VENEMA, W. 1994. Zandhagedissen in de Nederlandse kustduinen. Een referentiekader ter onderbouwing van de methodiek van het lopende monitoring onderzoek aan zandhagedissen *Lacerta agilis*. Rapport ISP. Universiteit van Amsterdam.
- HARTUNG, H. & KOCH, A. 1988. Zusammenfassung der Diskussionsbeiträge des Zauneidechsen-Symposiums in Metelen. Pp 245-257 in GLANDT, D. & BISCHOFF, W. (eds) *Biologie und Schutz der Zauneidechse (Lacerta agilis)*. Mertensiella, Bonn.
- HOUSE, S.M. & SPELLERBERG, I.F. 1983. Ecology and conservation of the sand lizard (*Lacerta agilis* L.) habitat in southern England. *J. Appl. Ecol.* 20: 417-437.
- KEETMAN, M. & DE VRIES, M. 1994. Onderzoek naar de verspreiding van de zandhagedis *Lacerta agilis* in Zuid-Kennemerland, gerelateerd aan het aantal eiafzetplekken. Rapport ISP. Universiteit van Amsterdam.
- KLEWEN 1988. Verbreitung, Ökologie und Schutz von *Lacerta agilis* im Ballungsraum Duisburg/Oberhausen. Pp 178-194 in GLANDT, D. & BISCHOFF, W. (eds) *Biologie und Schutz der Zauneidechse (Lacerta agilis)*. Mertensiella, Bonn.
- LEEUWEN, B.H. VAN & VAN DE HOEF, J.C.M. 1976. Onderzoek naar de oecologie en de populatie-dynamica van de zandhagedis (*Lacerta agilis* L.) in de duinen van Oostvoorne. Rijnsinstituut voor Natuurbeheer, Leersum.
- L.N.V. 1990. Natuurbeleidsplan. Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. Den Haag.
- MULLINS, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Amer* 262: 36-43.
- NEI, M. 1978. Estimation of the average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- NIJMAN, V. 1993. Genetische variatie bij de zandhagedis *Lacerta agilis*. Een populatiegenetisch onderzoek naar genetische variabiliteit van zandhagedissen in de Nederlandse kustduinen. Rapport ISP. Universiteit van Amsterdam.
- NIJMAN, V. 1994. Genetisch onderzoek aan zandhagedissen. Nieuwsbrief Meetnet Reptielen 2: 10-11.
- OVERLEG DUINHAGEDIS 1995. De duinhagedis voor de toekomst behouden, over duinbeheer, versnippering en monitoring. Rapport Overleg Duinhagedis, Amsterdam.
- STRIJBOSCH, H. 1988. Reproductive biology and conservation of the Sand lizard. Pp 132-145 in GLANDT, D. & BISCHOFF, W. (eds) *Biologie und Schutz der Zauneidechse (Lacerta agilis)*. Mertensiella, Bonn.
- VENEMA, W. 1995. Genetische variatie bij zandhagedissen. Genetische variatie binnen en tussen zandhagedissen populaties *Lacerta agilis* in de Nederlandse kustduinen. Rapport ISP. Universiteit van Amsterdam.
- WEEDA, E.J. 1990. Over de plantengeografie van Nederland. Pp 16-24 in VAN DER MEIJDEN. Heukels' flora van Nederland. Wolters Noordhoff, Groningen.
- WILLIAMS, G.K.J., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J. RALFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- ZUIDERWIJK, A. & SMIT, G. 1992. Reptielen monitoring 1991. Nieuwsbrief 7. Mededelingenblad N.V.H.T. *Lacerta* 22: 7-24.
- ZUIDERWIJK, A. & SMIT, G. 1993. Reptielen monitoring 1990-1992. Nieuwsbrief 9. Mededelingenblad N.V.H.T. *Lacerta* 23: 9-24.
- ZUIDERWIJK, A., SMIT, G & KRUYNTJES, B. 1992. De Nederlandse hagedissen in de jaren tachtig. Beschrijving en analyse van de landelijke verspreidingspatronen. *Lacerta* 51: 1-40.
- ZUIDERWIJK, A. 1993. Herwaardering beheersmaatregelen voor de zandhagedis. Project evaluatie beheer zandhagedis. Rapport ISP. Universiteit van Amsterdam.

APPENDIX I



Verspreiding van de zandhagedis *Lacerta agilis* in Nederland (naar ZUIDERWIJK ET AL., 1993). Aangegeven zijn de locaties waar monsters zijn genomen voor genetisch onderzoek. 1. Bergen, 2. Castricum, 3. Overveen, 4. Vogelenzang, 5. Amsterdamse Waterleidingduinen (Overveen), 6. Noordwijk, 7. Katwijk, 8. Nijmegen, 9. Meinweg.

Distribution of sand lizards Lacerta agilis in the Netherlands (after ZUIDERWIJK ET AL., 1993). Localities where samples were taken are indicated. 1. Bergen, 2. Castricum, 3. Overveen, 4. Vogelenzang, 5. Amsterdamse Waterleidingduinen (Overveen), 6. Noordwijk, 7. Katwijk, 8. Nijmegen, 9. Meinweg.

APPENDIX II

Enzym	loci	buffer
Aconitase (ACON 4.2.1.3) *	2	B
Aldolase (ALD 4.1.2.13)	1	B
Carbonic anhydrase (CA 4.2.1.1) *	2	B-C-D
Esterase (EST 3.1.1.1) *	2	B-E
Fumerase (FH 4.2.1.2)	1	F
Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT 2.6.1.1)	2	A-D
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPD 1.1.1.8)	1	A
Glucose phosphate isomerase (GPI 5.3.1.9)	1	B
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH 1.1.1.49)	1	D
Hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH 1.1.1.30)	2	D
Isocitrate dehydrogenase (IDH 1.1.1.42) *	2	B-D
Leucine-alanine peptidase	1	E-F
Leucine-glycine-glycine peptidase	1	F
Leucine-proline peptidase	1	E
Leucine-tyrosine peptidase	1	E
Lactate dehydrogenase (LDH 1.1.1.28)	2	A-B
Malic enzyme (ME 1.1.1.40)	1	B-C-D
Mannose-phosphate isomerase (MPI 5.1.3.8) *	1	A-B
NADH dehydrogenase (NADH DH1.6.99.3)	1	B
6-phosphogluconic-anhydrase (6PGD 1.1.1.43) *	1	B-C
Phospho-glucomutase (PGM 5.4.2.2) *	2	B-D-F
Super oxide dismutase	1	B
Sucrase (SUCR 3.2.1.48)	1	F-G

Allozymvariatie in de zandhagedis *Lacerta agilis*. Enzymen (met afkorting en E.C. nummer tussen haakjes) die getest zijn voor polymorfieën en waarvoor betrouwbare kleuringen verkregen zijn, het waarschijnlijke aantal loci, en het buffersysteem waarop getest is. Indien een locus polymorf was is dit aangegeven met een asterix (*). Gelelektroforesebuffer A = Tris citroenzuur pH 7,0; B = Tris citroenzuur pH 8,0; C = Tris maleïnezuur pH 5,8; D = Tris maleïnezuur pH 7,4; E = Fosfaat (Na_2HPO_4) pH 6,7; en Cellulose-acetaatbuffer F = Fosfaat pH 7,0; G = Tris citroenzuur pH 8,6. [Uit NIJMAN, 1993 en VENEMA, 1995].

Allozym variation in sand lizard Lacerta agilis. Enzymes (with abbreviation and E.C. number between brackets), tested for polymorphisms which yielded reliable patterns, the presumable number of polymorphic loci, and the buffer system used. When a locus was polymorph it is indicated with an asterix (). Gelelectrophorese buffer A = Tris citric acid pH 7.0; B = Tris citric acid pH 8.0; C = Tris maleic acid pH 5.8; D = Tris maleic acid pH 7.4; E = Phosphate (Na_2HPO_4) pH 6.7; and Cellulose-acetate buffer F = Phosphate pH 7.0; G = Tris citric acid pH 8.6. [From NIJMAN, 1993 and VENEMA, 1995].*

