

# Phylogeographische Analyse des *Lacerta viridis/bilineata* Komplexes: Molekulare Muster und Verbreitung

MARTINA BRÜCKNER, BIRGIT KLEIN, ANDREAS DÜRING, TOBIAS MENTEL,  
STEFANIE RABUS & JAN T. SOLLER

## Abstract

*Phylogeographic analysis of the Lacerta viridis/bilineata complex: Molecular patterns and distribution*

The *Lacerta viridis/bilineata* species complex consists of two nominal species, the western *L. bilineata* and the eastern *L. viridis*. To study the pattern of differentiation, especially of *L. bilineata* in Italy and of its separation from *L. viridis*, we analysed a part of the mitochondrial cytochrome *b* gene from individuals of different populations of both species. Additionally the variability of the glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G-6-PDH) enzyme and the plasma proteins was determined.

The results support the separation of the western *L. bilineata* and the eastern *L. viridis*. Whereas the genetic differentiation within *L. viridis* seems high, *L. bilineata* shows less variability. Only the basal split of one Calabrian population could indicate a longer geographic separation from the other Italian populations.

Key words: *Lacerta viridis*; *Lacerta bilineata*; mtDNA; cytochrome *b*; protein variability; phylogeography.

## Zusammenfassung

Der *Lacerta viridis/bilineata* Komplex zeigt in seinem Verbreitungsgebiet eine Differenzierung in eine westliche (*L. bilineata*) und eine östliche Form (*L. viridis*). Zur phylogeographischen Analyse der Differenzierungsmuster, insbesondere von *L. bilineata* in Italien und der Abgrenzung von *L. bilineata* gegen *L. viridis*, wurde von Individuen mehrerer Populationen beider Formen ein Abschnitt des für das Cytochrom *b* codierenden mitochondrialen Gens sequenziert. Weiterhin wurden die Allozymvariabilität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH) sowie die Variabilität der Blutplasmaproteine von mehreren Populationen bestimmt.

Die Ergebnisse trennen die westliche (*L. bilineata*) klar von der östlichen Form (*L. viridis*). Während die genetische Variabilität innerhalb von *L. viridis* hoch erscheint, zeigt *L. bilineata* nur geringe Unterschiede. Lediglich die basale Abspaltung einer kalabrischen Population innerhalb von *L. bilineata* könnte auf eine längere geographische Trennung von den übrigen Populationen hinweisen.

Schlagwörter: *Lacerta viridis*; *Lacerta bilineata*; mtDNA; Cytochrom *b*; Protein-Variabilität; Phylogeographie.

## 1 Einleitung

Der *Lacerta viridis/bilineata* Komplex weist in seinem Verbreitungsgebiet eine Differenzierung in eine westliche (*Lacerta bilineata* DAUDIN, 1802) und eine östliche Form (*L. viridis* [LAURENTI, 1768]) auf. Die Verbreitung von *L. bilineata* erstreckt sich dabei auf Frankreich, Nordspanien und Italien sowie auf einige isolierte Populationen im Rheingebiet. Das Verbreitungsgebiet von *L. viridis* schließt sich nordöstlich der Adria an das Gebiet von *L. bilineata* an und umfasst im wesentlichen Nord-Anatolien und die Balkanhalbinsel inklusive Griechenland sowie Populationen im Donaugebiet und eine isolierte Population in Brandenburg.

Morphologisch sind die beiden nominellen Arten nur schwer zu unterscheiden. Als Unterscheidungsmerkmal im Feld eignet sich bislang nur die Kehlfärbung der Jung-

tiere. Bei Kreuzungsversuchen wurde eine erhöhte Sterilitätsrate der Nachkommen gefunden, weshalb *L. bilineata* von *L. viridis* als eigene Art abgetrennt wurde (RYKENA 1991). Auch enzymelektrophoretische Untersuchungen ergaben zwischen *L. bilineata* und *L. viridis* genetische Distanzen, wie sie sonst im zwischenartlichen Bereich beobachtet wurden (AMANN et al. 1997).

Anhand eines Abschnitts des für das Cytochrom *b* codierenden mitochondrialen Gens soll die genetische Differenzierung zwischen *L. bilineata* und *L. viridis* untersucht werden. Besonderes Gewicht liegt dabei auf der innerartlichen Differenzierung von *L. bilineata* in Italien sowie ihrer Abgrenzung zu *L. viridis*. Die phylogenetische Analyse der mtDNA-Sequenzen und die statistische Analyse der Kladogramme geben einen ersten Überblick über die phylogeographische Differenzierung dieses Artenkomplexes. Zusätzlich wurden enzymelektrophoretische Untersuchungen durchgeführt, um mit unabhängigen genetischen Markern die Variabilität des *Lacerta viridis/bilineata* Komplexes zu bestimmen.

## 2 Material & Methoden

Zur Analyse der mtDNA wurde ein 429 bp langer Abschnitt des für das Cytochrom *b* (Cyt *b*) codierenden Gens inklusive eines Abschnitts der tRNA<sub>(Glu)</sub> von Tieren folgender Fundorte aus dem *Lacerta viridis/bilineata* Komplex via PCR amplifiziert und direkt sequenziert (Abb. 1): Venedig (Prov. Venetien), Livorno (Prov. Toskana), Anghiari (Prov. Toskana), Orvieto (Prov. Umbrien), Sessa Aurunca (Prov. Campanien), Melfi (Prov. Basilicata), Noci (Prov. Apulien) und Aspromonte (Prov. Kalabrien) (alle Italien) sowie Cres (Kroatien), Ártá, Euböa (beide Griechenland), Kecskemét (Ungarn) und Lausitz (Deutschland). Zusätzlich wurde die Sequenz von *L. trilineata* (Krk, Kroatien) bestimmt.

Die DNA-Extraktion erfolgte aus Blut oder Gewebematerial mit Hilfe des QIAamp Tissue Kits (QIAGEN). Für die PCR wurde das QIAGEN PCR Master Mix Kit verwendet. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 % Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) aufgereinigt. Die PCR erfolgte mit den Primern L 14724 (5'-CGAAGCTTGATATGAA AAACCATCGTTG-3') und H 15149 (5'-AAACTGCAGCCCCCTCAGAATGATATTT GTCCTCA-3') (IRWIN et al. 1991) bei folgenden Bedingungen: 5' 96 °C; 90'' 94 °C, 90'' 42 °C, 90'' 72 °C (5x); 90'' 94 °C, 90'' 50 °C, 90'' 72 °C (35x); 2' 72 °C. Die Direkt-Sequenzierung erfolgte auf einem ABI 373A Sequenzierer mit Hilfe des Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). Es wurden die Sequenzen beider DNA-Stränge bestimmt. Das Cycle-Sequencing wurde mit den gleichen Primern wie die Amplifikation bei folgenden Bedingungen durchgeführt: 2' 96 °C; 30'' 96 °C, 15'' 50 °C, 4' 60 °C (25x).

Das Alignment der DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms ClustalW (THOMPSON et al. 1994). Es wurde nur der 405 bp lange Proteinabschnitt ausgewertet. Zur Abschätzung des Homoplasiegehalts wurde die Topologielängenverteilung sowie die Schiefe dieser Verteilungskurve (Skewness) mit Hilfe des Programms PAUP 4.0b2 (SWOFFORD 1998) berechnet, wobei 10.000 Zufallsbäume ausgewertet wurden. Zur Analyse des Datensatzes wurden die Maximum Parsimony-Methode (MP) mit dem Programm PAUP 4.0b2, die Neighbor Joining-Methode (NJ) mit dem Programm MEGA (KUMAR et al. 1993) mit Einsatz der Jukes-Cantor-Distanz und die Maximum Likelihood-Methode (ML) mit dem Programm-Paket Phylip 3.5c (FELSENSTEIN 1993) angewendet. Die Unterstützung der Äste wurde mit dem Bootstrap-Verfahren überprüft. Als Außengruppenvertreter wurden *Lacerta trilineata* BEDRIAGA, 1886 und

*L. vivipara* JACQUIN, 1787 (GenBank Acc. No. U69834) in die Analyse einbezogen. Die in dieser Arbeit ermittelten DNA-Sequenzen wurden unter den Acc. No. AF233414-AF233427 in der GenBank deponiert.

Für die elektrophoretischen Enzym- und Plasmaproteinuntersuchungen wurden folgende Populationen bearbeitet: Melfi, Sessa Aurunca, Noci, Orvieto, Euböa, Cres und Lošinj (Abb. 1). Es wurden das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH) über eine horizontale Cellulose-Acetat-Elektrophorese sowie die Blutplasma-proteine über eine vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Die Methodik wurde von AMANN (1995) übernommen.

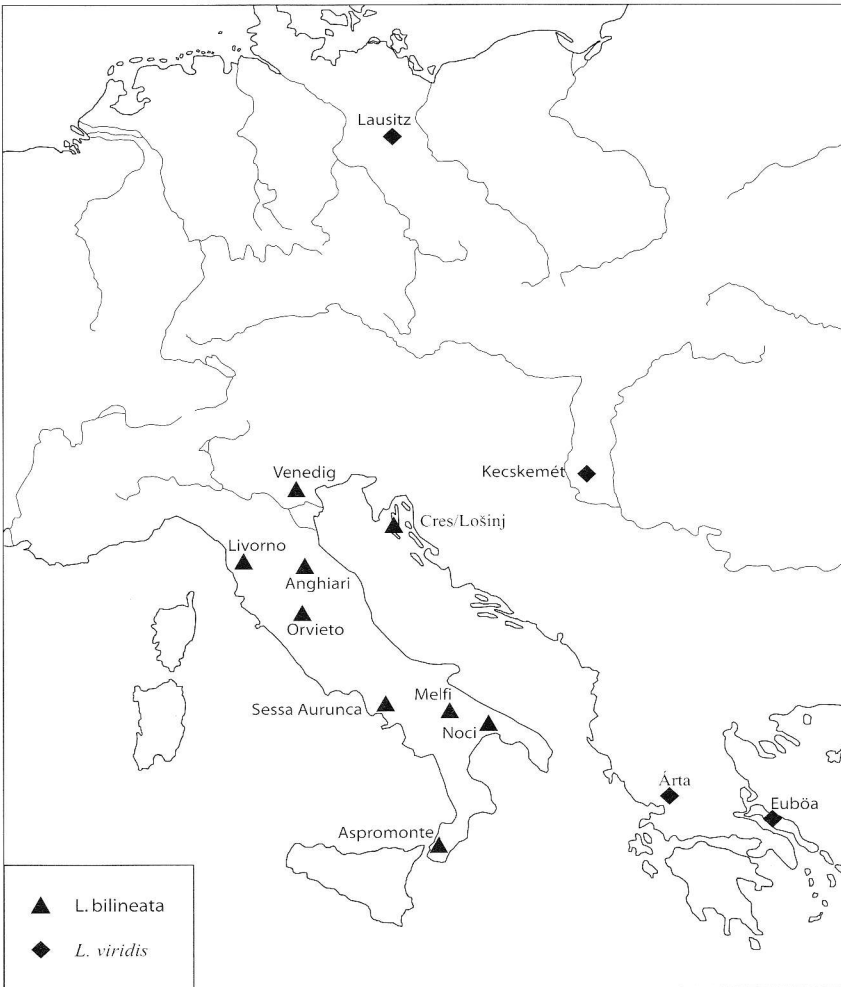


Abb. 1: Untersuchte Populationen des *Lacerta viridis/bilineata* Komplexes.  
Investigated populations of the *Lacerta viridis/bilineata* complex.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Die Auswertung des Cytochrom *b* Datensatzes ergab bei allen drei Auswertestrategien (MP, NJ, ML) bei Sequenzunterschieden von ca. 5 % in einem nach der Topologielängenverteilung homoplasiearmen Datensatz ( $g_1 = -0,98$ ) eine klare, mit hohen Bootstrap-Werten gestützte Zusammenfassung der morphologisch als *L. bilineata* klassifizierten Tiere. Hierzu gehören neben allen italienischen Populationen auch die der kroatischen Adriainsel Cres. Die morphologisch als *L. viridis* klassifizierten Tiere aus Ártá, Euböa, Kecskemét und der Lausitz werden durch die phylogenetischen Analysen ebenfalls zusammengefasst (Abb. 2).

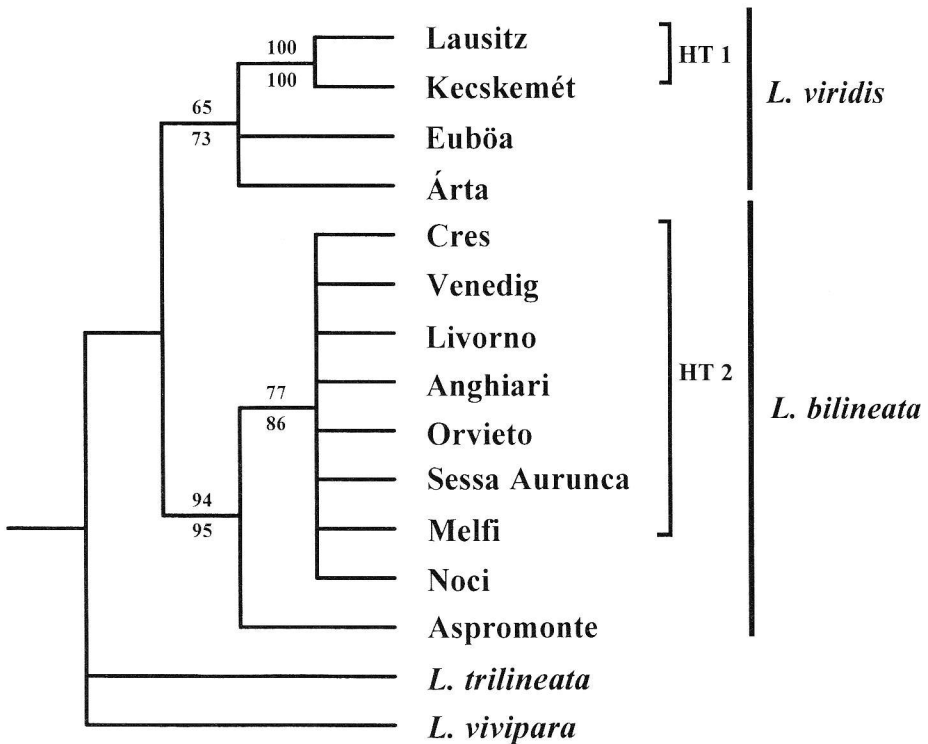


Abb. 2: Gebietskladogramm des *Lacerta viridis/bilineata* Komplexes.

Länge: 162 Schritte, strict consensus tree aus 3 MPTs.

Zahlen: Bootstrap-Werte, 1000 Pseudoreplikationen (heuristic search); über den Ästen: ungewichtet; unter den Ästen: Tv=2.

Sequenzidentische Tiere: *L. viridis* (HT 1): Lausitz, Kecskemét; *L. bilineata* (HT 2): Cres, Venedig, Livorno, Anghiari, Orvieto, Sessa Aurunca, Melfi.

Artzugehörigkeit nach morphologischen Merkmalen.

Area cladogram of the *Lacerta viridis/bilineata* complex.

length: 162 steps, strict consensus tree of 3 MPTs.

numbers: bootstrap values, 1000 pseudoreplicates (heuristic search); above the branches: unweighted parsimony; below the branches: transversions weighted twofold.

Lacertids with identical sequences: *L. viridis* (HT 1): Lausitz, Kecskemét; *L. bilineata* (HT 2): Cres, Venedig, Livorno, Anghiari, Orvieto, Sessa Aurunca, Melfi.

Species determination following morphological characters.

Auch die enzymelektrophoretischen Untersuchungen weisen in diese Richtung. Das Enzym G-6-PDH erwies sich als monomorph. Die Ergebnisse der Plasmaprotein-Analyse unterstützen die Trennung in eine westliche und eine östliche Gruppe (Tab. 1). Vier der Banden (a1, b2, c1, c2) treten in allen untersuchten Populationen auf, zeigen dabei aber innerhalb der italienischen Populationen z. T. Frequenzen unter 1, was als Verluste gedeutet werden kann. Die Banden b3 und c3 hingegen treten nur in den *L. bilineata* zugeordneten Populationen auf. Die Bande b3 ist hierbei als eine Neubildung der süditalienischen Populationen zu interpretieren. Ein größerer Stichprobenumfang könnte diese Ergebnisse untermauern.

		n	a0	a1	b1	b2	b3	c1	c2	c3
<i>L. viridis</i>	Euböa	11	0.1	1	1	1	0	1	1	0
	Kecskenémét	1	0	1	1	1	0	1	1	0
<i>L. bilineata</i>	Cres	3	0	1	1	1	0	0.3	1	1
	Lošinj	2	0	1	1	0.5	0	1	1	1
	Orvieto	4	0	1	1	1	0	0.3	1	0.5
	Sessa Aurunca	6	0	1	0	1	0	0.7	1	0.5
	Melfi	8	0	1	0.7	0.8	0.1	0.3	1	0.4
	Noci	4	0	1	0	0.8	0.8	1	0.8	0.8
	Aspromonte	7	0	1	0	1	0.4	1	1	0

n = Anzahl der untersuchten Individuen pro Population

Tab. 1: Plasmaprotein-Frequenzen der untersuchten Populationen von *Lacerta viridis* und *L. bilineata*

Plasmaprotein-frequencies of the investigated populations of *Lacerta viridis* and *L. bilineata*

Innerhalb von *L. bilineata* zeigt das untersuchte Cytochrom *b* Fragment nur wenig Variabilität. Mit Ausnahme der kalabrischen Population sind alle untersuchten Vertreter nahezu sequenzidentisch (Tab. 2). Die basale Abspaltung der kalabrischen Population wird hingegen gut gestützt (Abb. 2). Dies weist auf eine längere geographische Separation dieser Population, z. B. in einem eigenen eiszeitlichen Refugium, hin.

Die Verwandtschaftsbeziehungen der morphologisch als *L. viridis* eingeordneten Tiere lassen sich aus der Analyse der Cytochrom *b* Sequenzen nicht zweifelsfrei ableiten. Der Ast, der diese Gruppe zusammenfasst, wird nur mit niedrigen Bootstrap-Werten gestützt. Auch morphologisch zeigt zumindest die Population aus Euböa deutliche Unterschiede zu den anderen Vertretern des untersuchten Artenkomplexes (RYKENA et al. 2001). Abweichend von diesen Ergebnissen wurde die Population aus Árta in einer Analyse der mitochondrialen rRNA-Gene als nächstverwandt zu der kalabrischen Population von *L. bilineata* dargestellt (MAYER & BEYERLEIN 2001). Diese Einordnung würde in der MP-Analyse des Cytochrom *b* Datensatzes jedoch sieben zusätzliche Merkmalstransformationen erfordern und kann daher als unwahrscheinlich angesehen werden. Desweiteren wird durch eine höhere Wichtung der Transversionen, die weniger zu Konvergenzen neigen als Transitionen, die Bootstrap-Unterstützung des Astes, der die morphologisch als *L. viridis* eingeordneten Tiere zusammenfasst, besser (Abb. 2). Zur Auflösung des Widerspruchs und zur detaillierten phylogeographischen Analyse der Differenzierungen innerhalb von *L. viridis* sollten weitere Populationen sowie weitere Sequenzabschnitte einbezogen werden.

		<i>L. viridis</i>			<i>L. bilineata</i>			<i>L. trilineata</i>	<i>L. vivipara</i>
		(HT 1)	Euböa	Árta	(HT 2)	Noci	Aspro.		
<i>L. vir.</i>	(HT 1)		21	17	23	23	23	62	87
	Euböa	5,2		16	22	24	20	59	83
	Árta	4,2	4,0		16	18	18	61	85
<i>L. bil.</i>	(HT 2)	5,7	5,5	4,0		2	7	57	85
	Noci	5,7	5,9	4,5	0,5		7	58	84
	Aspromonte	5,7	5,0	4,5	1,7	1,7		56	85
<i>L. trilineata</i>		15,4	14,6	15,1	14,1	14,4	13,9		90
<i>L. vivipara</i>		21,5	20,5	21,0	21,0	20,8	21,0	22,3	

*L. viridis* (HT 1): Lausitz, Kecskemét; *L. bilineata* (HT 2): Cres, Venedig, Livorno, Anghiari, Orvieto, Sessa Aurunca, Melfi; die unter den beiden Haplotypen (HT) zusammengefassten Populationen sind jeweils sequenzidentisch. Artzugehörigkeit nach morphologischen Merkmalen.

Tab. 2: Genetische Distanzen im untersuchten Cytochrom *b*-Abschnitt zwischen den untersuchten Populationen von *Lacerta viridis* und *L. bilineata*; oben rechts: Anzahl der Nukleotidaustausche; unten links: Austausch [%].

Genetic distances of the sequenced Cytochrom *b* fragment between the investigated populations of *Lacerta viridis* and *L. bilineata*; upper right: number of different nucleotides; lower left: percentage of divergence.

Die Cytochrom *b*-Sequenz der kroatischen Population aus Cres ist mit denen der nord- und mittellitalienischen Populationen identisch (Tab. 2; HT 2). Auch auf der Halbinsel Istrien findet man morphologisch *L. bilineata* zuzuordnende Tiere, während im Dinarischen Karst *L. viridis* beobachtet wurde (TVRJKOVIC et al. 1998). Da zum Maximum der letzten Eiszeit der nördliche Teil der Adria oberhalb des Meeresspiegels lag (BENNETT et al. 1991), konnte dieser Meeresarm während des späten Pleistozäns keine geografische Barriere bilden. Dies kann die Zugehörigkeit der Smaragdeidechsen-Population der kroatischen Adriaküste zur westlichen *L. bilineata* erklären.

Es ergibt sich die Frage, wie weit *L. bilineata* an der Adriaküste nach Südosten vordringt. Eine genauere Untersuchung der Artgrenzen und der möglichen Kontaktzonen im Dinarischen Karst wäre wünschenswert und würde durch eine vereinfachte analytische Methodik erleichtert (BRÜCKNER & DÜRING 2001).

### Dank

Wir danken Dr. W. MAYER, Dr. K. ELBING, Dipl. Biol. S. RYKENA und Dr. H.K. NETTMANN für die Überlassung und Beschaffung von Tieren und DNA-Proben, Dr. H.K. NETTMANN und Prof. Dr. D. MOSSAKOWSKI für ihre kritischen Diskussionen sowie I. BURFEIND für ihre Hilfe bei der grafischen Gestaltung.

### Schriften

- AMANN, T. (1995): Genetisch-taxonomische Untersuchungen an deutschen Reliktpopulationen der Smaragdeidechse (*Lacerta viridis*-Komplex). – Diplomarbeit Technische Hochschule Darmstadt, 74 S.
- , RYKENA S., U. JOGER, H.K. NETTMANN & M. VEITH (1997): Zur Trennung von *Lacerta bilineata* DAUDIN, 1802 und *L. viridis* (LAURENTI, 1768). – *Salamandra*, Rheinbach, **33**(4): 255-268.
- BENNETT, K.D., P.C. TZEDAKIS & K.J. WILLIS (1991): Quarternary refugia of northern european trees. – *J. Biogeogr.*, **18**: 103-115.

Phylogeographische Analyse des *Lacerta viridis/bilineata* Komplexes

- BRÜCKNER, M. & A. DÜRING (2001): PCR-RFLP: Eine schnelle und preisgünstige biochemische Methode zur Artgrenzen-Erkennung im *Lacerta viridis/bilineata* Komplex. – Mertensiella, Rheinbach, **13**: 40-44.
- FELSENSTEIN, J. (1993): PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Vers. 3.5c. – University of Washington.
- KUMAR, S., K. TAMURA & M. NEI (1993): MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Vers. 1.01. – The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.
- MAYER, W. & P. BEYERLEIN (2001): Genetische Differenzierung des *Lacerta viridis/bilineata* Komplexes und von *Lacerta trilineata* in Griechenland: Mitochondriale DNA-Sequenzen. – Mertensiella, Rheinbach, **13**: 52-59.
- RYKENA S. (1991): Kreuzungsexperimente zur Prüfung der Artgrenzen im Genus *Lacerta* sensu stricto. – Mitt. Zool. Mus. Berlin, **67**(1): 55-68.
- , H.K. NETTMANN & W. MAYER (2001): *Lacerta viridis guentherpetersi* ssp. nov., eine neue Unterart der Smaragdeidechse aus Griechenland. – Mertensiella, Rheinbach, **13**: 89-97.
- SWOFFORD, D.L. (1998): PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and other Methods), Version 4. – Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- THOMPSON, J.D., D.G. HIGGINS & T.J. GIBSON (1994): ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. – Nucl. Acids. Res., **22**(22): 4673-4680.
- TVRTKOVIC, N., B. LAZAR, S. TOME & I. GRBAC (1998): The western green lizard *Lacerta (viridis) bilineata* DAUDIN, 1804 (Sauria: Lacertidae) in Slovenia and Croatia. – Nat. Croat., **7**(4): 363-369.

Manuskript abgeschlossen: Mai 2000

MARTINA BRÜCKNER, BIRGIT KLEIN, ANDREAS DÜRING, TOBIAS MENDEL, STEFANIE RABUS & JAN T. SOLLER, Institut für Ökologie und Evolutionsbiologie, Universität Bremen, Postfach 33 04 40, D-28334 Bremen.