



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ  
ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ



**Διδρυματικό Πρόγραμμα  
Μεταπτυχιακών Σπουδών**



**Φυλογένεση του σαπροξυλικού γένους *Dorcus* (Κολεόπτερα,  
Lucanidae) στη Μεσόγειο με έμφαση στον ελληνικό χώρο**

Αλέξη Γεωργία

Μεταπτυχιακή Εργασία Ειδίκευσης

**Ηράκλειο, Μάρτιος 2020**

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Επιβλέπων Καθηγητής**

Νικόλαος Πουλακάκης

*Αναπληρωτής Καθηγητής*

*Τμήμα Βιολογίας*

*Πανεπιστήμιο Κρήτης*

**2<sup>ος</sup> εξεταστής**

Μωσής Μυλωνάς

*Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης*

**3<sup>ος</sup> εξεταστής**

Απόστολος Τριχάς

*Επιμελητής Αρθροπόδων, ΜΦΙΚ, ΕΛΠΠ Σχ. Θετικών Επιστημών*

*Πανεπιστημίου Κρήτης*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια «Αρθροπόδων και Μοριακής Συστηματικής» του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών: «Περιβαλλοντική Βιολογία».

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υπεύθυνο του εργαστηρίου κι επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή, κο Νίκο Πουλακάκη ο οποίος με εμπιστεύτηκε και δέχτηκε να γίνω μέλος του εργαστηρίου όπου είναι υπεύθυνος, δίνοντάς μου την ευκαιρία να εκτελέσω ένα πρότζεκτ του οποίου τα αποτελέσματα διαφαίνονταν αμφίβολα. Η συνεχής στήριξη, η κατανόηση κι η καθοδήγηση που μου παρείχε σε συνδυασμό με τις συμβουλές και την διαρκή εμπύχωση από μέρους του, συνέβαλαν στην εκπόνηση της Διπλωματικής Εργασίας μου και στην επιτυχή ολοκλήρωση αυτής.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιμελητή αρθροπόδων του Μ.Φ.Ι.Κ., κο Απόστολο Τριχά, για τη στήριξη και την εμπιστοσύνη που έδειξε για άλλη μια φορά στο πρόσωπο μου. Χωρίς την πολύτιμη βοήθεια του στις δειγματοληψίες και τις αμέτρητες συμβουλές, η εκπόνηση της μελέτης αυτής φάνταζε ακατόρθωτη.

Οι θερμότερες ευχαριστίες δεν θα μπορούσαν να μην περιλαμβάνουν τα μέλη και των δύο εργαστηρίων των οποίων αποτελούσα «κομμάτι». Συγκεκριμένα, από το εργαστήριο των Αρθροπόδων θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φοιτητές Γιάννη Μπολανάκη και Βαλεντίνη Χρηστάκη, για την σημαντικότερη βοήθειά τους στις δειγματοληψίες και στις αναγνωρίσεις των ειδών. Από το εργαστήριο της Μοριακής Συστηματικής, όλα τα μέλη που στάθηκαν δίπλα μου καθόλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής, παρέχοντας ο καθένας την δική του βοήθεια. Ακόμη, δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ στην Λουκία Σπιλάνη και την Έρη Ανταλουδάκη, οι οποίες μου έδειξαν με προθυμία δύσκολες αναλύσεις, ενώ μου έδιναν συνεχώς προσωπικές συμβουλές και λύσεις σε προβλήματα και ερωτήματα που προέκυπταν.

Συνεχίζοντας, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω ιδιαιτέρως του εξωτερικούς συνεργάτες του εργαστηρίου των Αρθροπόδων του ΜΦΙΚ, Luca Bartolozzi και Χριστόδουλο Μακρή για τα δείγματα που συνέλεξαν από χώρες της

Μεσογείου (εκτός Ελλάδας) και τα προσέφεραν απλόχερα για τους σκοπούς της εργασίας αυτής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ξεχωριστά την Εμμανουέλλα Καραμέτα, η οποία ήταν εκείνη που από την αρχή μου έδειξε τα πάντα στο εργαστήριο με κάθε λεπτομέρεια και με καθοδήγησε σε όλων των ειδών τις αναλύσεις που έκανα. Ήταν δίπλα μου σε όλα τα βήματα απαντώντας σε κάθε μου ερώτημα. Ήταν εκεί να μοιράζεται μαζί μου τις γνώσεις της, να με καθησυχάζει, να με εμπυχώνει κάθε στιγμή και να με συμβουλεύει με λόγια τα οποία θα με συντροφεύουν σε όλη την μετέπειτα επιστημονική μου πορεία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους αγαπημένους μου γονείς, τη μοναδική αδερφή μου καθώς και τους εξαιρετικούς φίλους μου Κωνσταντίνα και Σήφη, για την αμέριστη στήριξη, εμπύχωση και συμπαράσταση τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου με τρόπο αναντικατάστατο, για να ακολουθήσω το όνειρό μου και να καταφέρω να ολοκληρώσω κι αυτόν τον στόχο μου.

Ηράκλειο, Μάρτιος 2020

Γεωργία Αλέξη

## Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT .....	6
<b>Εισαγωγή</b> .....	7
1.1 Φυλογένεση.....	8
1.2 Η περιοχή μελέτης: Μεσόγειος.....	9
1.2.1 Η λεκάνη της Μεσογείου .....	9
1.2.2 Ο ελληνικός χώρος .....	12
1.3 Στοιχεία της ομάδας των σαπροξυλικών.....	15
1.3.1 Γενικά στοιχεία για τα σαπροξυλικά κολεόπτερα .....	15
1.3.2 Η οικογένεια των Lucanidae .....	17
1.3.3 Το υπό εξέταση γένος <i>Dorcus</i> .....	18
1.3.4 Το καθεστώς διατήρησης των ειδών του γένους <i>Dorcus</i> στη Μεσόγειο .....	25
1.4 Σκοπός εργασίας.....	26
<b>Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	28
2.1 Συλλογή δεδομένων .....	29
2.2 Εργαστηριακές Αναλύσεις .....	31
2.2.1 Προσδιορισμός ειδών .....	31
2.2.2 Εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA.....	31
2.2.3 Πολλαπλασιασμός των επιθυμητών γενετικών δεικτών μέσω PCR .....	33
2.3 Φυλογενετικές αναλύσεις.....	35
2.3.1 Διόρθωση και στοίχιση των αλληλουχιών .....	35
2.3.2 Γενετικές αποστάσεις.....	36
2.3.3 Επιλογή μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης .....	37
2.3.4 Εκτίμηση των φυλογενετικών δέντρων.....	37
2.3.5 Μοριακή χρονολόγηση.....	39
<b>Αποτελέσματα</b> .....	40
3.1 Περί εξαγωγής και αλληλούχισης δειγμάτων .....	41

3.2 Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων .....	41
3.3.1 Επιλογή καταλληλότερου μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης .....	43
3.3.2 Γονιδιακό δέντρο συνδυασμένου συνόλου δεδομένων .....	44
3.3.3 Μοριακή χρονολόγηση μιτοχονδριακού συνόλου δεδομένων .....	46
<b>Συζήτηση</b> .....	50
4.1 Γενικά στοιχεία .....	51
4.2 Περί δειγμάτων.....	51
4.3 Βαθμός γενετικής διαφοροποίησης.....	52
4.4 Φυλογένεση του γένους <i>Dorcus</i> .....	53
4.4.1 Ο Κλάδος Α .....	54
4.4.2 Ο Κλάδος Β .....	55
4.5 Χρονολόγηση των κλάδων με χρήση ρυθμού υποκατάστασης του 16s.....	56
4.6 Συμπεράσματα.....	58
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ</b> .....	60
Παράρτημα Ι.....	69
Παράρτημα ΙΙ .....	70
Παράρτημα ΙΙΙ .....	74

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα Lucanidae αποτελούν μια σαπροξυλική και κοσμοπολίτικη οικογένεια κολεοπτέρων με σπουδαία συμβολή στην αποσύνθεση νεκρού ξύλου και στην ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών στα δασικά οικοσυστήματα. Το γένος *Dorcus*, αποτέλεσε αντικείμενο μακρόχρονων φυλογενετικών αντιπαραθέσεων, που αντικατοπτρίζεται σε πληθώρα ταξινομικών αναθεωρήσεων. Στον ευρωπαϊκό χώρο κατανέμονται 4 είδη, από τα οποία 2 εμφανίζονται στην Ελλάδα (*D. parallelipipedus* και *D. peyronis*) με το δεύτερο να είναι εξαιρετικά σπάνιο. Στην παρούσα έρευνα διερευνήθηκαν οι φυλογενετικές σχέσεις των 4 ευρωπαϊκών ειδών του γένους με έμφαση στην Ελλάδα (*D. parallelipipedus*, *D. alexisi*, *D. musimon* και *D. peyronis*), με τη χρήση μιτοχονδριακών και πυρηνικών δεικτών, περιλαμβάνοντας αντιπροσώπους από 23 θέσεις στην Ελλάδα και την Κρήτη και 7 από την Κύπρο, Σαρδηνία, Τουρκία, Ισπανία και Ιταλία. Το φυλογενετικό δέντρο υποδεικνύει την παρουσία 2 κλάδων: ο ένας περιλαμβάνει τα *D. parallelipipedus* της Μεσογείου χωρίς σημαντική ενδοειδική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ τους (~4%) καθώς και τα *D. alexisi* και *D. musimon* (με απόσταση 5 % και 8% αντίστοιχα από το πρώτο). Ο δεύτερος περιλαμβάνει τα *D. peyronis* της Κρήτης και της Τουρκίας, με μεγάλη διαφοροποίηση από τα υπόλοιπα *Dorcus* (25%) και φυλογενετικά συγγενέστερα άλλων μελών της οικογένειας (20%). Τα παραπάνω συνηγορούν στην ανάγκη ταξινομικής αναθεώρησης του γένους *Dorcus* (παραφυλετικό). Βάσει της τοπολογίας του δέντρου και των πληθυσμών που έχουν αναλυθεί (όλη η Μεσόγειος), αλλά και από την χρονολόγηση του δέντρου, πιθανολογείται μια παλιά διασπορά του τάξου (ενεργητική ή παθητική) στην περιοχή της Μεσογείου.

### Λέξεις κλειδιά

Δασικά οικοσυστήματα, μιτοχονδριακός δείκτης, πυρηνικός δείκτης, Ταξινομική

## ABSTRACT

Lucanidae is a saproxylic family of beetles with a cosmopolitan distribution and an important contribution to the decomposition of dead wood and the recycling of nutrients in forest ecosystems. The genus *Dorcus* has been the subject of long-term phylogenetic controversies, reflected in plenty of taxonomic reviews. There are 4 species in the European area, 2 of which are distributed in Greece (*D. parallelipedus* and *D. peyronis*) with the second one being extremely rare. The present study investigated the phylogenetic relationships of the 4 European species of the genus with emphasis on Greece (*D. parallelipedus*, *D. alexisi*, *D. musimon* and *D. peyronis*) using mitochondrial and nuclear markers, including individuals from 23 different sites of Greek mainland and Crete and 7 from Cyprus, Sardinia, Turkey, Spain and Italy. The phylogenetic tree indicates the presence of two branches: the one includes *D. parallelipedus* of the Mediterranean area without significant intraspecific genetic differentiation (~ 4%) and *D. alexisi* and *D. musimon* (5% and 8% respectively from the first one). The second includes *D. peyronis* of Crete and Turkey, with a great differentiation from the rest *Dorcus* spp. (25%) and phylogenetically more closely related to other family members (20%). The above leads to the need for taxonomic revision of the genus *Dorcus* (parapyletic). Based on the topology of the tree and the analysis of the populations (the entire Mediterranean) as well as the dating of the data, there is likely an old dispersion of the taxon (active or passive) in the Mediterranean region.

### Keywords

forest ecosystems, mitochondrial marker, nuclear marker, taxonomy



# Κεφάλαιο Πρώτο

---

## Εισαγωγή

## 1.1 Φυλογένεση

Ο όρος Φυλογένεση, εμφανίστηκε στη Βιολογία για πρώτη φορά από τον Γερμανό βιολόγο Ernst Haeckel το 1866 μέσω της αμφιλεγόμενης θεωρίας της ανακεφαλαίωσης (recapitulation theory) την οποία και ανέπτυξε. Η ετυμολογία της είναι ελληνική και προέρχεται από τις λέξεις *φυλή*, *φῶλον* και *γεννώ*, *γένεση*, *γενετικός*, που σημαίνει η προέλευση ή γέννηση της φυλής, η οποία και αποτελεί σκοπό της δημιουργίας του κλάδου αυτού. Ο τελευταίος, μελετάει τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ διαφορετικών ομάδων οργανισμών βασιζόμενος στη χρήση ομόλογων χαρακτήρων δηλαδή βιολογικών χαρακτηριστικών που έχουν προέλθει μέσω κοινής καταγωγής.

Η διερεύνηση των σχέσεων αυτών, πραγματοποιείται με τη χρήση είτε φαινοτυπικών (π.χ. μορφολογικοί χαρακτήρες) είτε γενετικών χαρακτήρων (π.χ. αλληλουχίες DNA), μέσω φυλογενετικών μεθόδων συμπερασματολογίας. Όταν χρησιμοποιούνται γενετικοί χαρακτήρες, για την απόκτηση πληροφοριών σχετικά με τις εξελικτικές σχέσεις των οργανισμών ή γονιδίων (Dowell, 2008), τότε αναφερόμαστε στην μοριακή φυλογένεση, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Η μοριακή φυλογένεση είναι μια πτυχή της μοριακής συστηματικής, η οποία είναι ένας τομέας που περιλαμβάνει εκτός των άλλων και τη χρήση μοριακών δεδομένων στη ταξινόμηση και τη βιογεωγραφία. Το αποτέλεσμα μιας φυλογένεσης αποτυπώνεται σε ένα φυλογενετικό δέντρο όπου τα «φύλλα» του δέντρου αντιπροσωπεύουν σύγχρονα είδη ή εξαφανισμένους προγόνους τους, και το οποίο αποτελεί μια υπόθεση της πραγματικής ιστορίας των εξελικτικών σχέσεων των οργανισμών. Τελικός σκοπός του κλάδου της φυλογένεσης είναι η κατασκευή του «δέντρου της ζωής» δηλαδή η επίλυση των εξελικτικών σχέσεων όλων των οργανισμών.

## 1.2 Η περιοχή μελέτης: Μεσόγειος

### 1.2.1 Η λεκάνη της Μεσογείου

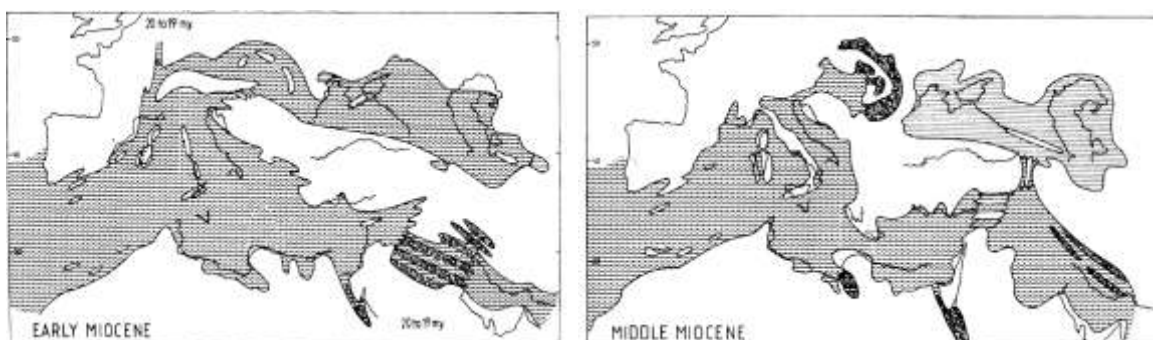
Στο σταυροδρόμι τριών ηπείρων, όπου οι ρίζες της ιστορίας και οι πολιτισμοί διαφορετικών εθνών μπλέκονται μεταξύ τους· εκεί όπου συναντάται ποικιλομορφία βιολογικών συστημάτων, τόσο επίγειων όσο και θαλάσσιων, δεσπόζει η περιοχή της Μεσογείου. Η περιοχή αυτή, περιλαμβάνει 24 χώρες ενωμένες ιστορικά με μια κοινή θάλασσα και εκτείνεται σε περίπου 5000 χιλιόμετρα με κατεύθυνση δυτικοανατολική, με τα όριά της να εκτείνονται από ανατολικά προς τα δυτικά, από τις ακτές του Λεβάντε μέχρι και την Ιβηρική Χερσόνησο, και βόρεια προς νότια, από τη νότια ακτή της Ευρώπης έως τη βόρεια ακτή της Αφρικής (García et al., 2018), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.1. Περιλαμβάνει συνολικά 11.879 νησιά και νησίδες, διαθέτοντας ένα από τα πιο μεγάλα αρχιπελάγη στον κόσμο, μετά την Καραϊβική, την Ινδονησία και τον Νότιο Ειρηνικό (Blondel et al. 2010).

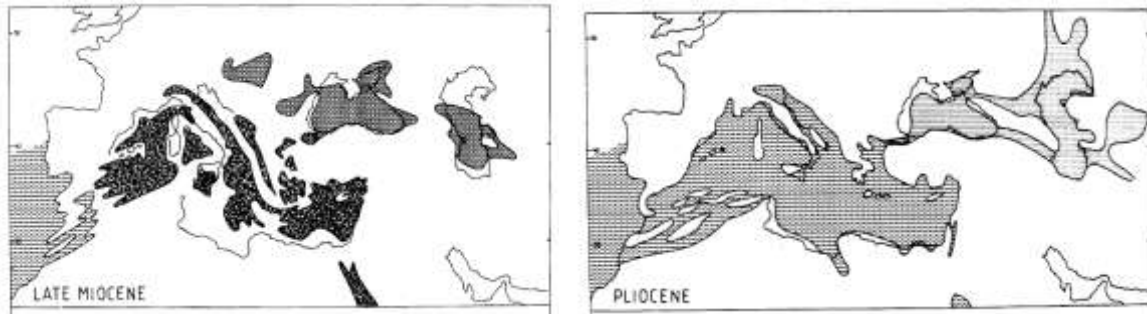


*Εικόνα 1.2.1:* Χάρτης της περιοχής της Μεσογείου (Wikipedia)

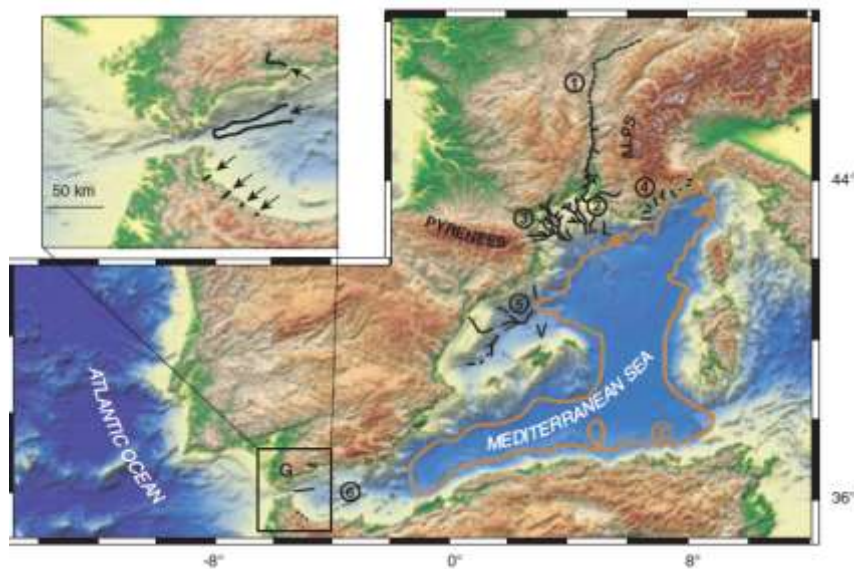
Χαρακτηρίζεται ως ένα από τα πιο αξιόλογα θερμά σημεία βιοποικιλότητας στη Γη (10% όλων των γνωστών χερσαίων φυτικών ειδών, 5,6% της παγκόσμιας θαλάσσιας πανίδας και 16,9% της θαλάσσιας χλωρίδας) με πληθώρα διαφορετικών τύπων θαλάσσιων και χερσαίων οικοτόπων, καθώς και με τη μορφή διαφορετικών βιογεωγραφικών συγγενειών, οικολογικών χαρακτηριστικών και γεωλογικής ηλικίας των εμπλεκόμενων οργανισμών (Herrera, 2010).

Ωστόσο, η λεκάνη της Μεσογείου εμφανίζει και περίπλοκη γεωλογική ιστορία. Η σημερινή Μεσόγειος αναφέρεται σε ότι απέμεινε από την πάλαι ποτέ θάλασσα της Τηθύς, η οποία εκτεινόταν από τον Ατλαντικό ωκεανό μέχρι και τα Ιμαλάια. Η Τηθύς, στα μέσα Μειόκαινου (15-19 εκ χρόνια) έκλεισε βαθμιαία έπειτα από τη σύγκρουση της Αφρικανικής με την Ευρασιατική τεκτονική πλάκα, ανοίγοντας ταυτόχρονα ο Ατλαντικός, ενώ συγχρόνως δημιουργήθηκε πλήθος μεγάλων οροσειρών, όπως τα Ιμαλάια, οι Άλπεις, ο Άτλαντας, ο Ταύρος καθώς και όλες οι οροσειρές της Ελλάδας (Rögl, 1999). Συνεχίζοντας στο τέλος του Μειόκαινου, η Μεσόγειος «αποξηράνθηκε» καθώς απομονώθηκε από τον Ατλαντικό Ωκεανό, οδηγώντας στη κρίση αλατότητας του Μεσσηνίου (5,96-5,33 εκ χρόνια). Κατά την κρίση αυτή, η στάθμη της θάλασσας έπεσε περίπου 1500 μ., ενώ λίγο αργότερα ακολούθησε το καταστροφικό γέμισμα της Μεσογειακής λεκάνης (Πλειόκαινο: 5,5-2,56 εκ χρόνια) από το άνοιγμα των στενών του Γιβραλτάρ, με κάποια μοντέλα να προτείνουν την ανάμειξη τεκτονικών κινήσεων και τον ευστατισμό στη δημιουργία αυτού του φαινομένου (Loget et al, 2005) (Εικόνα 1.2, Εικόνα 1.3).





**Εικόνα 1.2.2:** Χάρτες παλαιογεωγραφικών ανακατασκευών της Μεσογείου από το Κατώτερο Μειόκαινο μέχρι το Πλειόκαινο



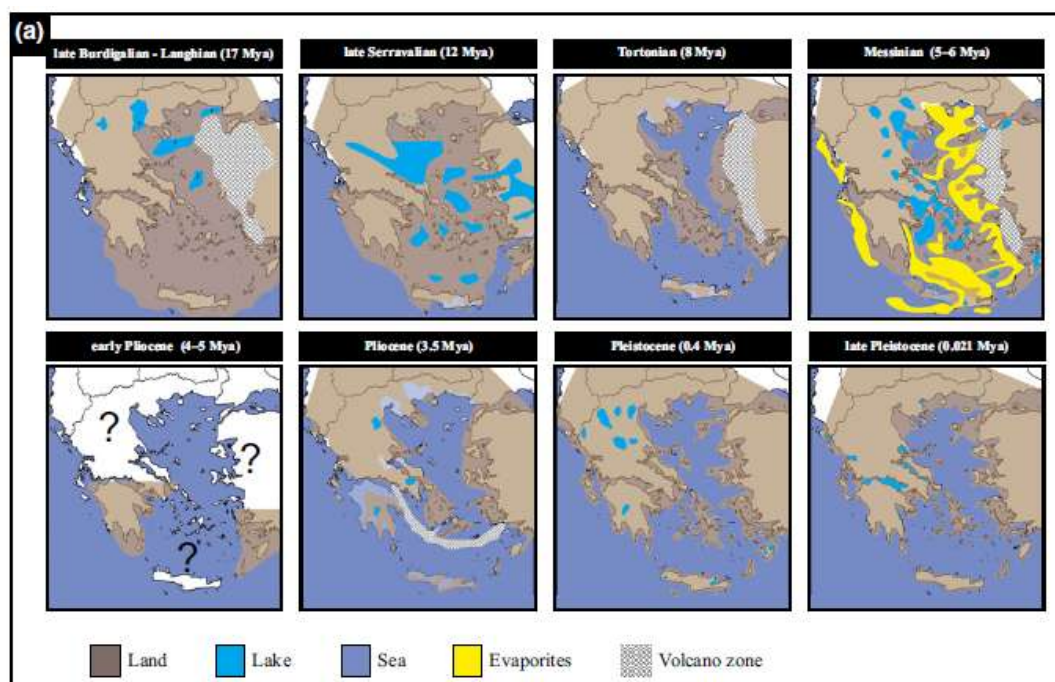
**Εικόνα 1.2.3:** Ψηφιακός χάρτης της δυτικής Μεσογείου κατά το Μεσσήνιο

Τα παραπάνω γεωλογικά γεγονότα στιγμάτισαν και συνέβαλαν στη μορφοποίηση της λεκάνης της Μεσογείου, ενώ παράλληλα επέτρεψαν την ανταλλαγή οργανισμών μεταξύ της Ευρασίας και της Αφρικής στα ανατολικά και μεταξύ της Ευρώπης και της βόρειας Αφρικής στα δυτικά. Ωστόσο κατά τη διάρκεια των τελευταίων 10 εκ χρόνων, κλιματικές ταλαντώσεις στη Βόρεια Αφρική (σημαντικά αυξημένη υγρασία ακολουθούμενη από ξηρασία) που συνδέονται με τους παγετώδεις κύκλους (deMenocal, 2004), έχουν προκαλέσει συνεχείς μεταβολές στο γύρω περιβάλλον, από έντονη βλάστηση μέχρι και

ερήμωση και ξανά το ίδιο. Η μεταβολή αυτή της οικολογικής σύνθεσης των τοπίων σε συνδυασμό με όλα τα γεγονότα που συνέβησαν στη Μεσόγειο ανά τα χρόνια, καθώς και με την ανάμειξη της δραστηριότητας του ανθρώπου, πιθανόν να επέβαλαν εξελικτικές πιέσεις ή / και γεωγραφική απομόνωση, οδηγώντας σε γενετική διαφοροποίηση, προσαρμογή ενώ πιθανό είναι και το αποτύπωμα τους στην φυλογένεση και βιογεωγραφία πολλών taxa (Kornillios et al, 2010).

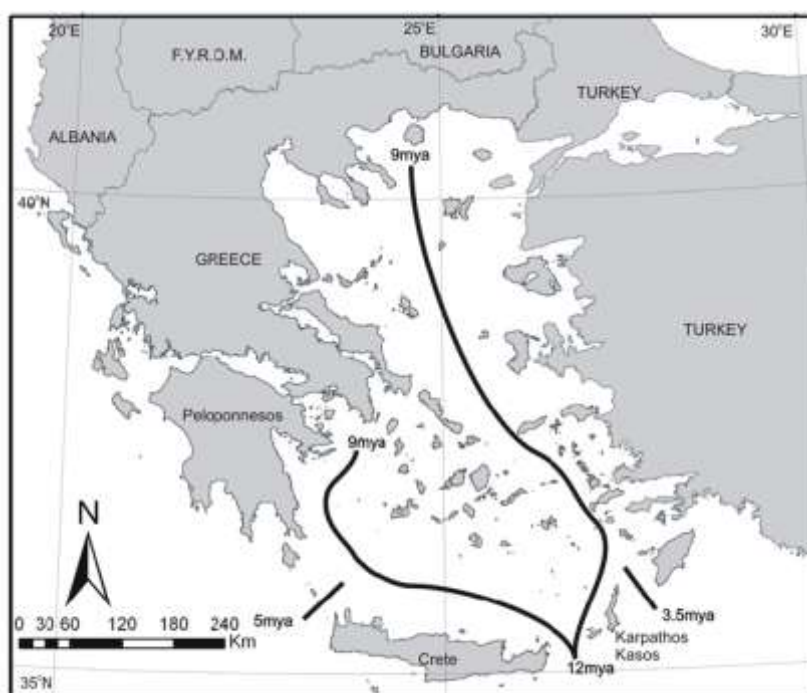
### 1.2.2 Ο ελληνικός χώρος

Ο ελληνικός χώρος, στον οποίο και εστιάζει η παρούσα εργασία, τοποθετείται στο ανατολικό τμήμα της Μεσογείου. Η πολύπλοκη γεωλογική ιστορία που τον διακρίνει αλλά και η περίοπτη θέση του ως ένα κεντρικό σταυροδρόμι τριών διαφορετικών ηπείρων, καθιστούν την βιοποικιλότητα της Ελλάδας εξαιρετικά υψηλή, με ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό ενδημισμού (Lymberakis and Poulakakis 2010).



**Εικόνα 1.2.4** Ο ελληνικός χώρος από το Μέσο Μειόκαινο έως σήμερα [βάσει (Creutzburg, 1963; Daams and Van Der Weerd, 1980; Dermitzakis and Papanikolaou, 1981; Meulenkamp, 1985; Anastasakis and Dermitzakis, 1990, Poulakakis et al. (2014)].

Η παλαιογεωγραφική εξέλιξη της περιοχής της Ελλάδας, η οποία χαρακτηρίστηκε από πολλές αλλαγές - ιδιαίτερα στον χώρο του Αιγαίου- (Εικόνα 1.2.4 ), βασίστηκε κυρίως σε τρία γεωλογικά γεγονότα. Τα γεγονότα αυτά έθεσαν σημαντικούς γεωλογικούς φραγμούς (Εικόνα 1.2.5 ) μειώνοντας έτσι τις ευκαιρίες διασποράς για κάποια είδη οργανισμών με όχι τόσο καλές ικανότητες στον τομέα αυτό.



*Εικόνα 1.2.5* Κύριοι γεωλογικοί φραγμοί στο Αιγαίο δοσμένοι σε εκ. χρόνια

Τα τρία αυτά καταλυτικά συμβάντα, ήταν η δημιουργία του θαλάσσιου φράγματος του Αιγαίου, η κρίση αλατότητας του Μεσσηνίου και ο έντονος τεκτονισμός του Πλειόκαινου σε συνδυασμό με τον ευστατισμό του Πλειστοκαίνου.

Αναλυτικότερα, στο Κατώτερο και Μέσο Μειόκαινο (23-12 εκ χρόνια), το Αιγαίο ήταν μια ενωμένη μάζα γης, με τις επακόλουθες τεκτονικές εναλλαγές να αποτελούν την απαρχή της δημιουργίας των κυριότερων γεγονότων που οδήγησαν σε όλη την παλαιογεωγραφική ιστορία της περιοχής του Αιγαίου. Ο σχηματισμός

του θαλάσσιου φράγματος του Αιγαίου, άρχισε στο τέλος του μέσου Μειόκαινου (12 εκ χρόνια) και ολοκληρώθηκε πλήρως στα 10-9 εκ χρόνια, προκαλώντας το διαχωρισμό του κεντρικού Αιγαίου από τα νησιά του ανατολικού Αιγαίου.

Στη συνέχεια ακολούθησε η Μεσσηνιακή κρίση αλατότητας (5,96-5,33 εκ χρόνια), κατά τη διάρκεια της οποίας η Μεσόγειος Θάλασσα αποξηράνθηκε (Krijgsman et al. 1999) και κατ' επέκταση τα νησιά της έγιναν βουνά περιβαλλόμενα από στέπες ή τεράστιες ερήμους αλατιού, καθιστώντας εφικτή την διασπορά οργανισμών. Ωστόσο, την εποχή εκείνη, η Κρήτη απομονώθηκε από την υπόλοιπη περιοχή του Αιγαίου λόγω της ύπαρξης των εκτεταμένων ερήμων αλατιού αλλά και των αλμυρών/υπεραλμυρών λιμνών, με το εκ νέου γέμισμα της λεκάνης και την επαναλειτουργία της Μεσογείου, να οδηγήσουν αργότερα στην μόνιμη απομόνωση της Κρήτης από την Ανατολία, την Πελοπόννησο και τις Κυκλάδες.

Αναφορικά, με την βιοποικιλότητά της, η Κρήτη του Μειόκαινου είχε μια ισορροπημένη ηπειρωτική πανίδα, που σημαίνει ότι ήταν συνδεδεμένη με την ηπειρωτική χώρα (Dermitzakis, 1990b), ενώ κατά το Πλειόκαινο ήταν ως επί το πλείστον βυθισμένη και κατά το Πλειστόκαινο ήταν ένα νησί χωρίς συνδέσεις με την ηπειρωτική χώρα (Meulenkamp 1985). Οι μεταβολές αυτές που συνέβαιναν με τη στάθμη της θάλασσας ήταν υπεύθυνες για μεγάλο μέρος της απομόνωσης και διαφοροποίησης των νησιωτικών ειδών, όπως τα ασπόνδυλα (Parmakelis et al., 2006a).

Αν και στα παγετώδη μέγιστα, το επίπεδο της θάλασσας ήταν 200 μέτρα χαμηλότερα από ό, τι σήμερα, η Κρήτη παρέμεινε απομονωμένη από τις Κυκλάδες και την Πελοπόννησο, καθώς το Κρητικό πέλαγος είναι πολύ βαθύτερο. Κατά τη διάρκεια δε της τελευταίας χαμηλής κατάστασης (πριν από 21.500 χρόνια), πολλά παράκτια νησιά ενώθηκαν μεταξύ τους ή / και με την ηπειρωτική χώρα, ενώ πριν από 8000 χρόνια, η παράκτια διαμόρφωση ήταν σχεδόν όπως αυτή του σήμερα (Poulakakis et al 2015). Ωστόσο, παρόλα τα γεωλογικά συμβάντα η ανθρώπινη παρουσία και η διασπορά που υποβοηθείται από τον αυτόν, μπορούν να μεταβάλλουν τα μοντέλα κατανομής διαφόρων οργανισμών, οπότε ο ρόλος τους πρέπει να ληφθεί υπόψη σε οποιαδήποτε φυλογεωγραφική αξιολόγηση κάποιας περιοχής, όπως εκείνη του ελληνικού χώρου (Poulakakis et al 2015).



## 1.3 Στοιχεία της ομάδας των σαπροξυλικών

### 1.3.1 Γενικά στοιχεία για τα σαπροξυλικά κολεόπτερα

Τα σαπροξυλικά (= ξύλο-εξαρτώμενα) είναι μια ομάδα οργανισμών που περιλαμβάνει εκπροσώπους από όλα τα μεγάλα έντομα (ειδικά σκαθάρια και μύγες), αντιπροσωπεύοντας ένα μεγάλο ποσοστό της πανίδας των εντόμων στα δασικά οικοσυστήματα με σπουδαίο ρόλο στην αποσύνθεση του ξυλώδους υλικού σε αυτά (Buse et al 2010, Quinto et al. 2012, García, N., 2018). Στα δασικά οικοσυστήματα η παρουσία νεκρού ξύλου και άλλων δομών παλαιάς ανάπτυξης, διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη βιοποικιλότητα των συστημάτων αυτών, καθώς δημιουργούν πλήθος μικροκοινοτήτων περιλαμβάνοντας διαφορετικού τύπου σαπροξυλικά έντομα. Οι τύποι αυτοί διαχωρίζονται χωρικά ανάλογα τα είδη των δένδρων και των ιστών που προτιμούν καθώς και τη θέση τους πάνω στο δέντρο, αλλά και χρονικά σχετικά με την διαδοχή τους κατά τη διάρκεια αποικοδόμησης του ξύλου (Quinto et al, 2012).

Τα σαπροξυλικά κολεόπτερα συγκεκριμένα, αποτελούν μια ομάδα εντόμων που εξαρτώνται για κάποιο μέρος της ζωής τους, από το νεκρό ξύλο ή τους μύκητες που το διασπούν (Spreight, 1989). Αποτελούν ένα από τα βασικά συστατικά της δασικής πανίδας λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας τους. Εμπλέκονται σε σημαντικές διαδικασίες αυτού του τύπου οικοσυστημάτων, όπως η διάσπαση του νεκρού ξύλου και η ανακύκλωση των θρεπτικών ουσιών (Stokland and Sittonen, 2012), ενώ παράλληλα παίζουν ρόλο στη διατήρηση υγείων και παραγωγικών δασών (Ulyshen, 2013). Ο πλούτος τους, εξαρτάται από την ποσότητα και την ποιότητα του νεκρού ξύλου που υπάρχει στο δάσος αλλά και από το μέγεθός του, την ιστορία και τη διαχείρισή του (Seibold et al. 2016). Κατηγοριοποιούνται σε πρώιμα, μεσαία και αργά ανάλογα με τη διαδοχή τους πάνω στο αποσυντιθέμενο ξύλο, ενώ αναγνωρίζονται σημαντικές διαφορές στις κοινότητές τους που σχετίζονται με το μέγεθος του αποσυντιθέμενου «υλικού», τη θέση, τη γεωγραφία, το είδος του αλλά και το μακρο-περιβάλλον γύρω από αυτό (Ulyshen, 2018). Επομένως, σχηματίζουν αυστηρά εξειδικευμένες κοινότητες από άποψη τροφικού επιπέδου και απαιτήσεων σε οικότοπους.

Παρά την εξαιρετική βιοποικιλότητα τους, στα Μεσογειακά εύκρατη δάση παρατηρείται σημαντική μείωση των αντιπροσώπων της ομάδας αυτής λόγω της αποψίλωσης και της ανεπαρκούς διαχείρισης, κατάσταση που σταδιακά γίνεται εντονότερη. Ο ολοένα και αυξανόμενος κατακερματισμός των οικοτόπων, μειώνει ιδιαίτερα την πιθανότητα μακροχρόνιας επιβίωσης για τα περισσότερα από τα είδη της πανίδας αυτής λόγω της περιορισμένης ικανότητας διασποράς και της εξειδίκευσης που έχουν για συγκεκριμένα μικροπεριβάλλοντα. Η εντατικοποίηση δε της δασοκομίας και της γεωργίας και η εγκατάλειψη παραδοσιακών δασοκομικών πρακτικών και οι πυρκαγιές, έχουν οδηγήσει σε μείωση του αριθμού των παλαιών δέντρων και ειδικότερα του ξύλου μεγάλης διαμέτρου, το οποίο και προτιμούν πολλά από τα είδη των σαπροξυλικών (García, N.,2018).

Από τα παραπάνω, συμπεριλαμβανομένης και της έλλειψης συστηματικών μελετών για εκτίμηση της πανίδας αυτών των οργανισμών στα μεσογειακά δάση, ο αριθμός των σαπροξυλικών αρθροπόδων που είναι απειλούμενα προς εξαφάνιση γίνεται ολοένα και μεγαλύτερος (Jonsson και Kruijs 2001, Buse et al,2010). Αυτό οδήγησε ορισμένους να υποδείξουν ότι τα σαπροξυλικά έντομα μπορεί να είναι ένας δείκτης έγκαιρης προειδοποίησης για αξιολόγηση της υγείας των δασών, οπότε και χρήζουν επιπλέον μελέτης για εκτίμηση της κατάστασής τους (Langor et al., 2006). Μέχρι στιγμής και σύμφωνα με την «κόκκινη» λίστα του IUCN (2018) για τα σαπροξυλικά κολεόπτερα της Μεσογείου, το ποσοστό εκείνων που θεωρούνται απειλούμενα φτάνει το **32%**, εκείνο των κινδυνευόντων είναι αρκετά υψηλό και αγγίζει το **12%**, ενώ το **~25%** ολόκληρης της Ευρώπης είναι αδύνατον να αξιολογηθεί λόγω έλλειψης δεδομένων (Cálix et.al., 2018, García, N., 2018 ).

### 1.3.2 Η οικογένεια των Lucanidae

Τα Lucanidae, (stag beetles ή ελαφοκάνθαροι), αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες και πιο δημοφιλείς και αναγνωρίσιμες ομάδες σαπροξυλικών κολεοπτέρων. Σύμφωνα με τον Ulyshen (2018), η οικογένεια αυτή περιέχει πάνω από 1200 είδη παγκοσμίως, αριθμός ο οποίος φαίνεται να είναι διαφορετικός, αυξημένος ή μειωμένος, όπως αναφέρουν άλλες, ελαφρώς παλαιότερες εργασίες (Kim & Farrell, 2015, Ling et al., 2016). Ο όρος «stag» σχετίζεται με το σχήμα των γνάθων (έχουν διακλαδώσεις και ακίδες), που μοιάζουν με τα κέρατα από αρσενικά ελάφια (Hudson 1934). Η οικογένεια αυτή έχει λάβει μεγάλη προσοχή από τους επιστήμονες εξαιτίας του έντονου φυλετικού διμορφισμού που εμφανίζει και της ποικιλομορφίας των αρσενικών αναφορικά με το σχήμα των γνάθων (Tatsuta et al., 2001). Κατανέμονται σε όλες τις κύριες ζωογεωγραφικές περιοχές του πλανήτη, πλην της Ανταρκτικής, με τα περισσότερα από αυτά τα είδη να συναντώνται στη Νοτιοανατολική Ασία, ενώ μόλις 18 από αυτά στη Μεσόγειο (Kim & Farrell, 2015, Garcia et al., 2018, Ulyshen, 2018).

Οι περισσότεροι από τους αντιπροσώπους της οικογένειας είναι σαπροξυλικοί. Οι προνύμφες τους περνούν το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους σε ξυλώδη ή άλλου είδους υλικά τα οποία είναι σε φάση αποσύνθεσης, τρεφόμενα με υλικά πλούσια σε μυκητιακή βιομάζα ή με το ίδιο «νεκρό» ξύλο σε διάφορα στάδια αποσύνθεσης, συμβάλλοντας έτσι στην καταστροφή του. Τα θηλυκά άτομα συνήθως ωστοκοούν τα αυγά είτε απευθείας μέσα στο αποσυντιθέμενο ξύλο, είτε στην επιφάνεια κάτω από αυτά, είτε στο έδαφος (Garcia et al., 2018).

Το ευρωπαϊκό γιγαντιαίο σκαθάρι της οικογένειας, το *Lucanus cervus* (Linnaeus, 1758), αποτελεί ένα έμβλημα αυτής και είναι ίσως το πιο καλά μελετημένο είδος της οικογένειας παγκοσμίως με τις περισσότερες μελέτες να έχουν επικεντρωθεί στη κατανομή του (Harvey et al., 2011). Τα θηλυκά του είδους εμφανίζουν μορφολογική ομοιότητα με το *Dorcus* spp., το οποίο και είναι το δεύτερο σε μέγεθος σκαθάρι της Ευρώπης.

Επιπλέον, τα Lucanidae χρησιμεύουν ως σημαντικοί βιοδείκτες της ακεραιότητας των δασών, καθώς έχει βρεθεί ότι σε μια δεδομένη περιοχή, τα δάση με την υψηλότερη βιοποικιλότητα σε Lucanidae, χαρακτηρίζονται γενικά από χαμηλότερα επίπεδα διαταραχής και μεγαλύτερες ποσότητες από «ξερά» άρα και σε

αποσύνθεση ξύλα (Ulyshen, 2018). Στην Ευρώπη, για παράδειγμα, η μελέτη των Lachat et al. (2012) έδειξε ότι μεταξύ των σαπροξυλικών τάξεων που μελετήθηκαν, τα Lucanidae ήταν τα πιο ευαίσθητα στην ποσότητα των «νεκρών» δέντρων και στη θερμοκρασία.

Παρ' όλα αυτά και παρά την εκτεταμένη έρευνα για τη βιολογία και την ταξινομική της ομάδας αυτής, η φυλογένεση και η εξελικτική η ιστορία τους παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστες (Kim & Farrell, 2015).

### 1.3.3 Το υπό εξέταση γένος *Dorcus*

Τα *Dorcus* (lesser stag beetle) είναι ένα από τα μικρά γένη της σαπροξυλικής οικογένειας κολεοπτέρων Lucanidae. Είναι τα δεύτερα σε μέγεθος σκαθάρια της Ευρώπης και είναι γνωστά ως "σκαθάρια πολεμιστές" λόγω των ισχυρών, καμπυλωτών σιαγόνων που έχουν τα αρσενικά και ομοιάζουν με σχήμα σπαθιού. Πολλά από αυτά αποτέλεσαν πολύτιμα «κομμάτια» ιδιωτικών συλλογών ακόμα και δημοφιλή κατοικίδια ζώα, λόγω της εντυπωσιακής μορφολογίας τους (Chen et al., 2018). Είναι κυρίως νυχτερινά ζώα, βρίσκοντας καταφύγιο κάτω από σάπια κούτσουρα, πέτρες, φλοιούς δέντρων ή τη φυλλοστρωμή των δασών (Sherley, 1994).

Χαρακτηρίζεται ως κοσμοπολίτικο γένος, αναφορικά με την κατανομή των ειδών του, τα οποία ξεπερνούν σε αριθμό τα 80 παγκοσμίως, εκτεινόμενα από Αμερική μέχρι και Ασία (Paulsen, 2010, Chen et al., 2018, Ulyshen, 2018). Στον ευρωπαϊκό χώρο αλλά και στη Μεσόγειο, εμφανίζονται μόλις 4 είδη: *Dorcus parallelipedus* (Linnaeus, 1758), *Dorcus peyronis* (Reiche & Saulcy, 1856), *Dorcus musimon* (Gené, 1836), *Dorcus alexisi* (Muret & Drumont, 1999), τα οποία μελετώνται στην παρούσα εργασία και φαίνονται στην Εικόνα 1.3.1. Από αυτά μόνο τα δύο πρώτα συναντάμε στην Ελλάδα (Löbl, 2016).



*Εικόνα 1.3.1 Τα μεσογειακά είδη του γένους Dorcus- a. Dorcus parallelipedus, b. Dorcus musimon, c. Dorcus peyronis, d. Dorcus alexisi (Α. Τριχάς, alsphotopage.com )*

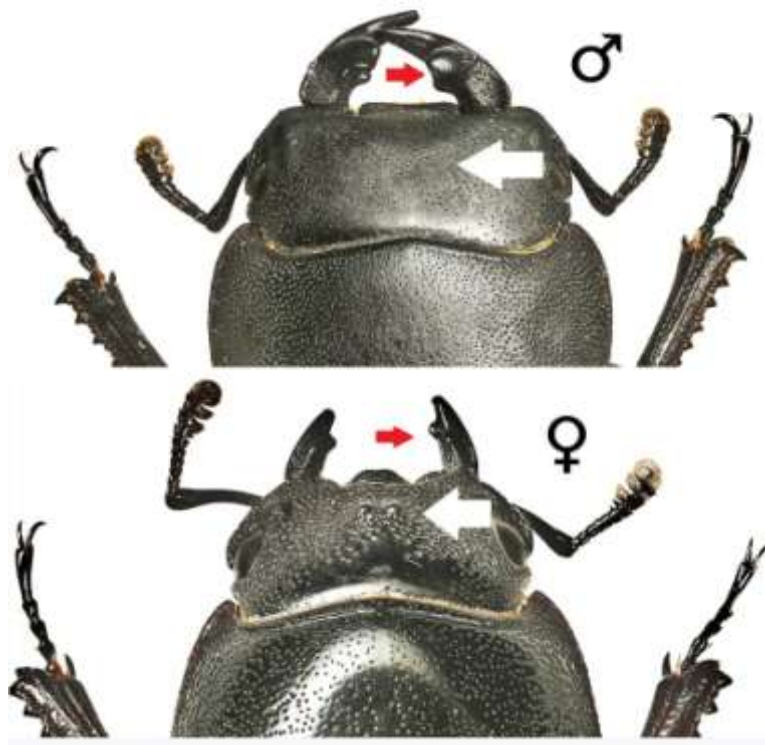
Από τα παραπάνω είδη που υπάρχουν στη Μεσόγειο, το πρώτο (*D. parallelipedus*) είναι το πιο κοινό από όλα και εμφανίζεται σχεδόν σε ολόκληρη την Ευρώπη, νότια Σκανδιναβία, Ελλάδα (με εμφανή έλλειψη από τη βιβλιογραφία για την παρουσία του στην Κρήτη-τελευταία αναφορά το 1886), Τουρκία και στη νότια Ρωσία (E. v. Oertzen. 1886, Hendriks, 2013)(Εικόνα 1.3.2).



**Εικόνα 1.3.2** Κατανομή του είδους *Dorcus parallelipedus* (Linnaeus, 1758) στην Ευρώπη- Με πράσινο σημειώνεται η παρουσία και με λευκό η απουσία του είδους από την κάθε περιοχή (de Jong, Y. et al., 2014)

Το είδος αυτό ζει σε σάπιο ξύλο και εναποθέτει τα αυγά του εκεί όπου και περνάει τα στάδια των προνυμφών και της νύμφης (Klausnitzer 1995, Fremlin and Hendricks, 2013). Αν και σχετίζεται με το γιγαντιαίο *Lucanus cervus* (Linnaeus, 1758), η εμφάνισή του είναι λιγότερο εντυπωσιακή, με μήκος δύο έως τρία εκατοστά, ομοιόμορφο μαύρο χρώμα και πολύ μικρότερες γνάθους. Τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά, εμφανίζονται παρόμοια σε μήκος, με εμφανείς

ωστόσο διαφορές στη μορφολογία αναφορικά τόσο με το μέγεθος των γνάθων και της κεφαλής, όσο και με την παρουσία ή μη επαρμάτων στην κεφαλή και τις σιαγόνες αλλά και την διαφορετικού τύπου βοθρίωση (Klausnitzer 1995, προσωπική παρατήρηση) (Εικόνα 1.3.3).

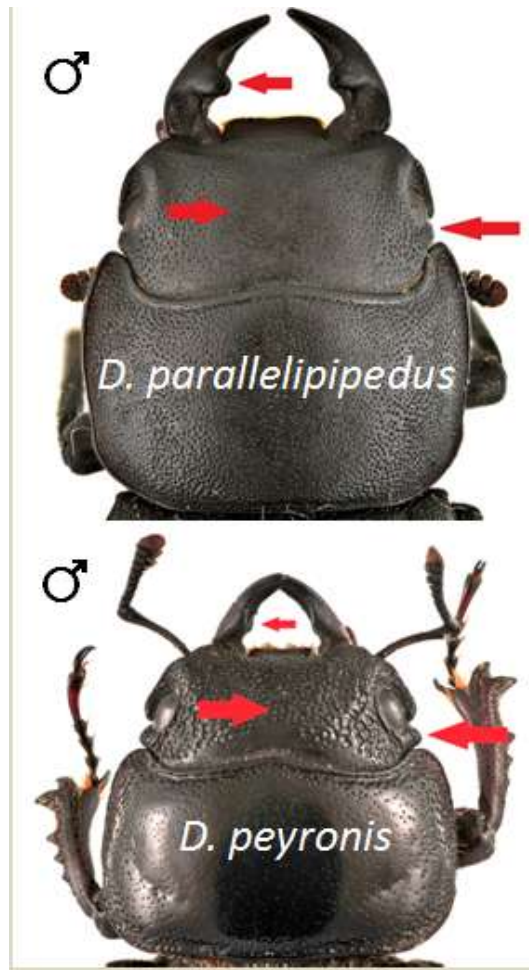


**Εικόνα 1.3.3** Αρσενικός και θηλυκός αντιπρόσωπος του είδους *D. parallelipedus* (Linnaeus, 1758)- Με βέλη επισημαίνονται οι κύριες διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα του είδους (κόκκινο βέλος: παρουσία ή μη επαρμάτων στις σιαγόνες, λευκό βέλος: παρουσία ή μη επαρμάτων στην κεφαλή και η εμφανής διαφορά στο μέγεθος, την πυκνότητα και την όψη των βοθρίων). (Α. Τριχάς)

Το επόμενο στη λίστα των ειδών του γένους *Dorcus* που κατανέμονται στον μεσογειακό χώρο, είναι το *Dorcus peyronis* (Reiche & Saulcy, 1856). Χαρακτηρίζεται ως εξαιρετικά σπάνιο, με σαφή ανατολική προέλευση αφού η κατανομή του περιλαμβάνει την Ελλάδα, τη Βουλγαρία, την Αρμενία, το Ισραήλ, τη Συρία, την Τουρκία και το Ιράν (Bartolozzi & Sprecher-Uebersax 2006, Bunalski et al., 2014, Bartolozzi et al., 2014). Ωστόσο, η αναφορά στους πρόσφατους καταλόγους για παρουσία του είδους στην Ελλάδα, δεν έχει επιβεβαιωθεί επίσημα με πρόσφατα δείγματα παρά μόνο από αναφορές παλιών καταλόγων (E. v. Oertzen. 1886). Παρόλα αυτά, διάφοροι ερασιτέχνες φυσιδίφες, έχουν βρει μέσα στα χρόνια ελάχιστα άτομα από τα βουνά της βορείου Ελλάδας, χωρίς όμως αυτό να αναφέρεται επίσημα σε κάποιον σύγχρονο κατάλογο. Αναφορικά με την κατανομή παρουσία του στην Κρήτη, έχει βρεθεί εξίσου ελάχιστες φορές, με τις δύο πιο πρόσφατες από αυτές να εντοπίζεται από την ομάδα του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας της Κρήτης του Πανεπιστημίου Κρήτης αποκλειστικά σε βουνά του νησιού (Λευκά Όρη και Ψηλορείτης).

Ταξινομικά, ο μορφολογικός διαχωρισμός του από άλλα είδη και ιδιαίτερα από το *D. parallelipedus*, φαίνεται να είναι εξαιρετικά δύσκολος, καθώς ο έντονος φυλετικός διμορφισμός δημιουργεί πρόβλημα, με το αρσενικό *D. peyronis* να ομοιάζει πολύ περισσότερο με το θηλυκό του *D. parallelipedus* παρά με το αντίστοιχο αρσενικό (Bartolozzi et al., 2014, προσωπική παρατήρηση) (Εικόνα 1.3.4).





**Εικόνα 1.3.4** Αρσενικά των *Dorcus parallelipedus* (Linnaeus, 1758) και *Dorcus peyronis* (Reiche & Saulcy, 1856) - Με βέλη επισημαίνονται οι κύριες διαφορές ανάμεσα στα δύο είδη (παρουσία ή μη επαρμάτων στις σιαγόνες, παρουσία ή μη οπισθοφθάλμιων μάγουλων και εμφανής διαφορά στο μέγεθος, την πυκνότητα και την όψη των βοθρίων). (Α. Τριχάς)

Τα δύο τελευταία είδη που κατανέμονται στη Μεσόγειο και μάλιστα χαρακτηρίζονται ως ενδημικά του χώρου, είναι τα *D. musimon* (Gené, 1836) και *D. alexisi* (Muret & Drumont, 1999). Το πρώτο κατανέμεται στην Σαρδηνία Αλγερία και Τυνησία, ενώ το δεύτερο είναι ενδημικό της Κύπρου, όπως φαίνεται και στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 1.3.5 & Εικόνα 1.3.6).



**Εικόνα 1.3.5** Κατανομή του είδους *D. musimon* (Gené, 1836) - Με πορτοκαλί σημειώνεται η παρουσία και με σκούρο γκρι η πιθανή παρουσία (όχι εξακριβωμένη) του είδους σε κάθε περιοχή. (<https://www.iucnredlist.org/search>)



**Εικόνα 1.3.6** Κατανομή του είδους *D. alexisi* (Muret & Drumont, 1999)- Με πορτοκαλί σημειώνεται η παρουσία του είδους σε κάθε περιοχή. (<https://www.iucnredlist.org/search>)

Ταξινομικά, το *D. alexisi*, το οποίο προς το παρόν είναι το μόνο γνωστό είδος για την Κύπρο, είναι μορφολογικά πολύ στενά συνδεδεμένο με το πολύ κοινό *D. parallelipedus*, προκαλώντας πλήθος αντιπαραθέσεων. Γενετικά, ενώ δεν έχει μελετηθεί το ζήτημα αυτό, πιθανότατα θα έδινε φως στη διαλεύκανση της ταξινόμησής του (είδος, υποείδος ή τοπικός πληθυσμός) κάτι που θα επιχειρηθεί στην παρούσα μελέτη (Muret and Drumont, 1999, Bartolozzi et al., 2016).

Από τα παραπάνω και δεδομένης της υπόλοιπης βιβλιογραφίας, μέχρι στιγμής, το γένος *Dorcus* υπήρξε ένα από τα πιο προβληματικά γένη των Lucanidae. Συγκεκριμένα, εξαιτίας της μορφολογικής του ποικιλομορφίας και του πλήθους των διαφορετικών απόψεων για τα αποδεκτά είδη σήμερα, οι αντιπρόσωποι του γένους έχουν αποτελέσει αντικείμενο μακρόχρονων φυλογενετικών αντιπαραθέσεων, που αντικατοπτρίζεται σε πληθώρα ταξινομικών αλλαγών και συγχύσεων (Bartolozzi and Sprecher-Uebersax, 2006, Fujita 2010, Löbl, 2016). Παρόλο που τα μοριακά δεδομένα μπορεί να δώσουν μια καλύτερη κατανόηση της συστηματικής προβληματικών ομάδων, σε αυτήν την περίπτωση υπάρχουν λίγες μελέτες βασισμένες στο DNA σχετικά με την ταξινόμηση του γένους, με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα να δίνει πιο ολοκληρωμένα και σημαντικά γενετικά δεδομένα για τη φυλογένεσή τους (Kim & Farrell, 2015, Chen et al., 2018)

#### **1.3.4 Το καθεστώς διατήρησης των ειδών του γένους *Dorcus* στη Μεσόγειο**

Από το προηγούμενο υποκεφάλαιο, επισημάνθηκε ότι τα είδη του γένους *Dorcus* τα οποία φιλοξενεί η Μεσόγειος είναι τέσσερα. Από αυτά, μόνο το ένα είναι κοινό και διαθέτει μεγάλη εξάπλωση (*D. parallelipedus*), ενώ τα υπόλοιπα από αυτά, χαρακτηρίζονται ως σπάνια και κάτω από απειλή.

Συγκεκριμένα, η παρουσία του *D. peyronis* έχει καταγραφεί ελάχιστες φορές στη Μεσόγειο σε νεκρές ρίζες φυλλοβόλων δένδρων (*Platanus* spp., *Quercus* spp., *Populus* spp.), ενώ στους «κόκκινους» καταλόγους της IUCN για τους Μεσογειακούς οργανισμούς, αναφέρεται ως Κινδυνεύον (**Endangered**), λόγω της κοπής δέντρων, των δασικών πυρκαγιών και της αστικής ανάπτυξης (García, N.,

2018). Τα άλλα δύο είδη *D. musimon* και *D. alexisi*, χαρακτηρίζονται ιδιαίτερα ευάλωτα και υπό απειλή εξαιτίας της ανεπαρκούς διαχείρισης των δασών και της απώλειας ενδιαιτημάτων τους λόγω της εκμετάλλευσης από τη δασοκομία και τις πυρκαγιές. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τις «κόκκινες» λίστες, το *D. musimon* αναφέρεται ως Κινδυνεύον (**Endangered**), ενώ το *D. alexisi* ως τρωτό (**Vulnerable**) (Muret and Drumont 1999, de Jong, Y. et al., 2014, Bartolozzi et al., 2016, Löbl, 2016, Muona, J. Et al., 2017).

## 1.4 Σκοπός εργασίας

Τα σαπροξυλικά κολεόπτερα όπως αναφέρθηκε στα προηγούμενα κεφάλαια, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία των δασικών οικοσυστημάτων, μέσω της συμβολής τους στην αποσύνθεση του «νεκρού» ξύλου και στην ανακύκλωση των θρεπτικών ουσιών. Ωστόσο, υπάρχει μια σαφής έλλειψη συστηματικών μελετών σχετικά με τις κοινότητές τους στα μεσογειακά δάση, οπότε και λεπτομέρειες σχετικά με το ρόλο τους και με την κατάσταση των πληθυσμών τους, παραμένουν άγνωστες. Αυτό σε συνδυασμό με την έλλειψη σωστής διαχείρισης των δασικών εκτάσεων, εντείνουν το πρόβλημα της απειλής για πολλά από αυτά που ήδη χαρακτηρίζονται ως κινδυνεύοντα (Buse et al 2010, García, N., 2018).

Παράλληλα, διαπιστώνεται ένα έντονο πρόβλημα στην ταξινόμηση κάποιων ειδών και συγκεκριμένα του γένους *Dorcus*, στο οποίο και εστιάζει η παρούσα μελέτη. Ο έντονος φυλετικός διμορφισμός των ειδών αλλά και η μορφολογική ομοιότητα κάποιων από αυτά (παρόλα τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που εμφανίζουν), έχουν οδηγήσει τα τελευταία χρόνια σε πληθώρα ταξινομικών αναθεωρήσεων, με τη λύση να βρίσκεται πιθανότατα στις αναλύσεις με τη χρήση μοριακών εργαλείων.

Έχοντας λοιπόν υπ' όψιν τη σπουδαιότητα των οργανισμών αυτών για τα δάση και δεδομένης της ταξινομικής σύγχυσης του γένους *Dorcus* στο χώρο της Ανατολικής Μεσογείου, στην παρούσα εργασία εξετάζονται οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών του γένους στη Μεσόγειο με έμφαση τον ελληνικό χώρο. Κύριο

ζητούμενο είναι η εύρεση των φυλογενετικών σχέσεων των ειδών και η εξελικτική ιστορία του γένους στην περιοχή, χρησιμοποιώντας πυρηνικούς και μιτοχονδριακούς γενετικούς τόπους. Με τον τρόπο αυτό, πιθανότατα θα μπορέσουν να αναδειχθούν τα ταξινομικά προβλήματα της συγκεκριμένης ομάδας που απασχολούν τους επιστήμονες, αλλά και να ενισχυθούν οι γνώσεις μας για τους αντιπροσώπους της.

## Κεφάλαιο Δεύτερο

---

### Υλικά και Μέθοδοι

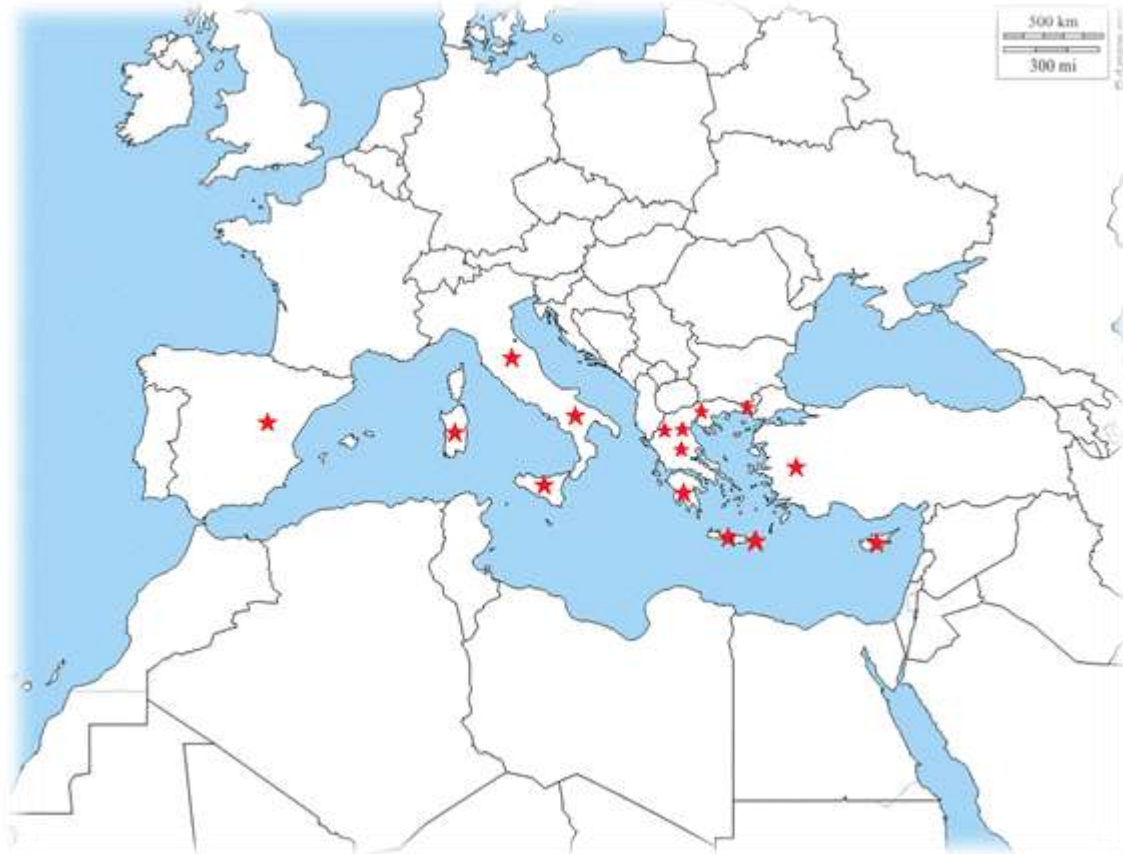
## 2.1 Συλλογή δεδομένων

Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από τις συλλογές του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης του Πανεπιστημίου Κρήτης (ΜΦΙΚ-ΠΚ) ενώ ένας μικρός αριθμός από αυτά δόθηκαν στο Μουσείο από εξωτερικούς συνεργάτες.

Τα παραπάνω αφορούν δείγματα που προέρχονται τόσο από όλη την Ελλάδα όσο και από άλλες χώρες της Μεσογείου. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 72 άτομα προερχόμενα από περισσότερες από 30 τοποθεσίες. Από αυτά, 58 δείγματα προέρχονται από τον ελλαδικό χώρο τα οποία συλλέχθηκαν στο πλαίσιο ερευνητικών αποστολών των μελών του ΜΦΙΚ περιλαμβάνοντας άτομα που ανήκουν σε δύο διαφορετικά είδη του γένους *Dorcus* (57 *D. parallelipipedus*, 1 *D. peyronis*). Τα υπόλοιπα 14 δείγματα προέρχονται από την υπόλοιπη Μεσόγειο και δόθηκαν για τους σκοπούς της εργασίας αυτής, από τον Luca Bartolozzi, επιμελητής στο Τμήμα Εντομολογίας του Ζωολογικού Μουσείου La Specola στο Πανεπιστήμιο της Φλωρεντίας και από τον εξωτερικό συνεργάτη του ΜΦΙΚ στην Κύπρο, Χριστόδουλο Μακρή. Τα δείγματα αυτά, περιλαμβάνουν 5 *D. parallelipipedus* και 2 *D. musimon* από Ιταλία και Σαρδηνία, 1 *D. parallelipipedus* από Ισπανία, 2 *D. parallelipipedus* και 1 *D. peyronis* από Τουρκία και 3 *D. alexisi* από Κύπρο.

Όλα τα δείγματα ήταν αποθηκευμένα σε απόλυτη αιθανόλη, από τα οποία ένα μέρος προέρχονταν από δειγματοληψίες με το χέρι (χωρίς παρεμβολή παγίδων με πρόσθετες χημικές ουσίες –π.χ προπυλενογλυκερόλη- που μπορεί να αποτελέσουν ανασταλτικό παράγοντα στη διαδικασία εξαγωγής και πολλαπλασιασμού του DNA) ενώ αρκετά ήταν εκείνα που προέρχονταν και από παγίδες παρεμβολής (pitfalls).

Τα δείγματα αυτά καλύπτουν μέρος της κατανομής του υπό εξέταση γένους, με τις πληροφορίες όσον αφορά το είδος, την περιοχή προέλευσης και το αν χρησιμοποιήθηκαν ή όχι στις φυλογενετικές αναλύσεις να παρατίθενται στο Παράρτημα Ι. Επιπλέον, η θέση δειγματοληψίας τους φαίνεται στον παρακάτω χάρτη (Χάρτης 2.1.).



**Χάρτης 2.1** Ενδεικτικός χάρτης με τις τοποθεσίες των δειγματοληψιών των δειγμάτων στην Μεσόγειο.

Επιπρόσθετα, στις φυλογενετικές αναλύσεις και για τα δύο γονίδια που μελετήθηκαν, προστέθηκαν επιπλέον αλληλουχίες (10 για το 16S rRNA και 9 για το wingless) από τη γενετική βιβλιοθήκη GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), με στόχο την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αντιπροσώπευση του γένους γίνεται και την επιπλέον χρήση εξωομάδας και αντιπροσώπους άλλων συγγενικών ειδών. Για τις αλληλουχίες αυτές, όλες οι πληροφορίες παρατίθενται στο Παράρτημα Ι.



## 2.2 Εργαστηριακές Αναλύσεις

Όλες οι εργαστηριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στα εργαστήρια Αρθροπόδων και Μοριακής Συστηματικής του ΜΦΙΚ-ΠΚ, με το καθένα από αυτά να είναι χρήσιμα σε συγκεκριμένου είδους αναλύσεις. Εργαζόμενοι κάτω από ειδικές συνθήκες ώστε να αποφευχθούν επιμολύνσεις των δειγμάτων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αλλοίωση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες αναλύσεις με τη σειρά:

- α) προσδιορισμός ειδών
- β) εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA
- γ) πολλαπλασιασμός των επιθυμητών γενετικών δεικτών μέσω PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction – αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)
- δ) προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing) των προϊόντων της PCR

### 2.2.1 Προσδιορισμός ειδών

Η αναγνώριση σε επίπεδο είδους βασίστηκε σε εξωτερικούς μορφολογικούς χαρακτήρες και πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των μελών του εργαστηρίου Αρθροπόδων του ΜΦΙΚ, χρησιμοποιώντας ειδικές για το γένος κλείδες αναγνώρισης (Baraud, 1993 και Bartolozzi et al, 2014.).

### 2.2.2 Εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA

Για την απομόνωση του ολικού γενωμικού DNA χρησιμοποιήθηκε ο μυς από το μεσαίο πόδι όλων των ατόμων τεμαχίζοντάς το ολόκληρο και ανάλογα το είδος της παγίδευσης του οργανισμού από όπου προέρχονταν, ακολουθήθηκε διαφορετικός τρόπος χειρισμού. Συγκεκριμένα, για τα άτομα τα οποία προέρχονταν από παγίδες παρεμβολής, πραγματοποιήθηκαν 3-4 πλύσεις με Tris-HCL 10mM το

οποίο ανανεώνονταν ανά 8 ώρες, ενώ για τα άτομα που ήταν φρέσκα και διατηρήθηκαν σε «απόλυτη» αιθανόλη, έγινε εξάτμιση της αιθανόλης στους 36°C για 1 ώρα.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή του DNA χρησιμοποιώντας τυπικό πρωτόκολλο εξαγωγής DNA με βάση τη δραστική ουσία οξικού αμμωνίου (ammonium acetate) (Hillis et al., 1996), το οποίο τροποποιήθηκε κατάλληλα όπως περιγράφεται παρακάτω. Σύμφωνα με το τροποποιημένο αυτό πρωτόκολλο, τα δείγματα επωάζονται overnight στους 56°C έπειτα από προσθήκη 600 µl set buffer, 20 µl 10% SDS και 15 µl πρωτευσάσης K (20 mg/ml) ώστε να πραγματοποιηθεί πέψη αυτών. Έπειτα προστέθηκαν 340 µl 4M Ammonium Acetate και αναδεύοντας τα συνεχώς για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου πραγματοποιήθηκε η κατακρήμνιση πρωτεϊνών και άλλων κυτταρικών συστατικών. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 20 min όπου και συλλέχθηκε το υπερκείμενο και μεταφέρθηκε σε νέο eppendorf των 2ml. Στη συνέχεια στοχεύοντας στην κατακρήμνιση του DNA προστέθηκε 1 ml παγωμένης (100%) ισοπροπανόλης και έγινε ανάδευση αρκετές φορές ενώ αμέσως μετά τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -20°C για 1 ώρα με επιπλέον ανάδευση ανά 15 λεπτά. Ακολούθως, έγινε φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στα 13.000 rpm. Έπειτα από την αφαίρεση της ισοπροπανόλης, προστέθηκαν 100µl 70% EtOH (θερμοκρασίας δωματίου) ώστε να «ξεπλυθεί» η πελέτα με το DNA από τυχόν άλατα και άλλα πρόσθετα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 13.000 rpm και αφαιρέθηκε η αιθανόλη, επαναλαμβάνοντας τα τρία αυτά βήματα δύο φορές συνολικά. Τέλος, η πελέτα με το DNA που πλέον βρίσκεται κολλημένη στον πάτο του eppendorf αφήνεται να στεγνώσει πλήρως overnight στους 25°C πριν προστεθούν 50 µl υπερκάθαρου νερού ώστε να επαναδιαλυτοποιηθεί. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C και είναι έτοιμα για να χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω αναλύσεις.

Για τον έλεγχο του αποτελέσματος της παραπάνω διαδικασίας, έπειτα από το τέλος κάθε εξαγωγής 3 µl από τα προϊόντα ηλεκτροφορούνταν για 35-40 λεπτά στα 120 volt σε πήκτωμα αγαρόζης 1% το οποίο περιείχε 5 µl βρωμιούχο αιθίδιο για την οπτικοποίηση του DNA. Στη συνέχεια, το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφιζόταν κάτω από υπεριώδη φωτισμό για τον έλεγχο της ποσότητας και της ποιότητας του DNA που πάρθηκε από κάθε εξαγωγή. Όπως ήταν αναμενόμενο, σε κάποια από τα δείγματα τα αποτελέσματα δεν ήταν και τόσο ενθαρρυντικά

(DNA όχι ορατό στις φωτογραφίες), είτε λόγω παλαιότητας ή κακής διατήρησης των δειγμάτων είτε λόγω της μικρής ποσότητας του DNA, γεγονός που δεν μας εμπόδισε να χρησιμοποιήσουμε τα δείγματα αυτά στις περαιτέρω αναλύσεις εφόσον μερικά από αυτά έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

### **2.2.3 Πολλαπλασιασμός των επιθυμητών γενετικών δεικτών μέσω PCR**

Η μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) εφαρμόστηκε για τον στοχευμένο πολλαπλασιασμό μέρους της αλληλουχίας ενός μιτοχονδριακού γονιδίου που κωδικοποιεί τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα του RNA (*16S rRNA*) καθώς επίσης και μέρος ενός πυρηνικού γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη NPC (*wingless*). Για τον πολλαπλασιασμό των δύο αυτών τύπων χρησιμοποιήθηκαν τρία ζεύγη εκκινητών, 1 για τον μιτοχονδριακό τόπο και δύο για τον πυρηνικό τόπο χρησιμοποιώντας την τεχνική της nested PCR. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως είτε όταν υπάρχει λιγοστή ποσότητα DNA ή σπασμένα κομμάτια DNA είτε σε «δύσκολα» δείγματα κατά την οποία χρησιμοποιούνται δύο ζεύγη εκκινητών, το ένα εκ των οποίων υβριδοποιείται πιο εσωτερικά από τη θέση που υβριδοποιείται το άλλο. Σε αυτή την τεχνική γίνεται αρχικά πολλαπλασιασμός του επιθυμητού τύπου με τους εξωτερικούς εκκινητές (Wg550F-WgAbRZ) και στη συνέχεια το προϊόν αυτής της αντίδρασης χρησιμοποιείται ως μήτρα για την επόμενη αντίδραση που πραγματοποιείται με τους εσωτερικούς εκκινητές (Wg578F-WgAbR). Τα ζεύγη των εκκινητών, καθώς και πληροφορίες σχετικά με την αλληλουχία τους και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος παρατίθενται στον Πίνακα 2.3.

*Πίνακας 2.3: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων μαζί με πληροφορίες των αλληλουχιών τους, το μέγεθος των προϊόντων τους και την πηγή προέλευσής τους ( Kim and Farrell, 2015).*

Γενετικός τύπος	Εκκινητής	Μέγεθος Προϊόντος	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')	Μήκος	Αναφορά
16S rDNA	16SC(forward)	~550	TACCTTGTGTATCAGGGTTTAT	22 mer	Hosoya et al. (2001)
	16SD(reverse)		ATTATGCTACCTTTGCACGGTC	22 mer	Hosoya et al. (2001)
Wingless	Wg550F (forward)	~800	ATGCGTCAGGARTGYAARTGYCAYGGYATGTC	32 mer	Wild and Maddison (2008)
	WgAbRZ (reverse)		CACTTNACYTCRCARCACCARTG	23 mer	Wild and Maddison (2008)
	Wg578F (forward)	~500	TGCACNGTGAARACYTGCTGGATG	24 mer	Ward and Downie (2008)
	WgAbR (reverse)		ACYTCGCAGCACCARTGGAA	20 mer	Abouheif and Wray (2008)

Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκε ο πολλαπλασιασμός των παραπάνω γονιδίων (θερμοκρασία και συγκέντρωση MgCl<sub>2</sub>), διέφεραν για τις διάφορες αντιδράσεις και προέκυψαν έπειτα από δοκιμαστικά πειράματα. Έτσι κάθε γονίδιο είχε διαφορετικές συνθήκες, κάτι που συνέβαινε και για κάποια άτομα, το γενετικό υλικό των οποίων μπορεί να μην ήταν συντηρημένο με τον ίδιο τρόπο με τα υπόλοιπα. Οι διάφορες συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων δίνονται στον Πίνακα 2.4.

*Πίνακας 2.4: Οι συνθήκες των αντιδράσεων των PCR για τα εννιά ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.*

Γενετικός τύπος	Εκκινητές	Συνθήκες (35 κύκλοι)			Συγκέντρωση MgCl <sub>2</sub>
		Στάδιο	Θ°C	Χρόνος	
<b>16S rRNA</b>	16sC	Denaturation	94	1 min	1.5 mM ή 3 mM
		Annealing	47-52	1 min	
	16SD	Extension	72	1 min	
<b>Wingless</b>	Wg550F	Denaturation	94	1 min	3 mM
		Annealing	45-47	1 min	
	WgAbRZ	Extension	72	1 min	
	Wg578F	Denaturation	94	1 min	1.5 mM
		Annealing	52-54	1 min	
	WgAbR	Extension	72	1 min	

Τέλος, τα προϊόντα από τον πολλαπλασιασμό των επιθυμητών γονιδίων, στάλθηκαν στην αυτοματοποιημένη συσκευή αλληλούχισης (Sanger sequencing) της εταιρίας CeMIA SA, για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους.

## 2.3 Φυλογενετικές αναλύσεις

### 2.3.1 Διόρθωση και στοίχιση των αλληλουχιών

Αρχικά, αφού έγινε προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος της PCR, όλες οι αλληλουχίες που παράχθηκαν ελέγχθηκαν ως προς την ομολογία τους έναντι της βάσης γενετικών δεδομένων NCBI, με τη χρήση του

εργαλείου αναζήτησης BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul *et al.*, 1990), ώστε να αποκλειστούν αλληλουχίες που πιθανότατα να ήταν προϊόντα μόλυνσης.

Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες διορθώθηκαν μια προς μια με τα προγράμματα CodonCode Aligner (v. 3.7.1) και Geneious 8.1.2. Κατά τη διαδικασία αυτή, διορθώθηκαν τυχόν λάθη του αλληλουχητή στην αντιστοίχιση σήματος και βάσης και αφαιρέθηκαν τα άκρα των αλληλουχιών όπου το «διάβασμα» από τον αλληλουχητή ήταν χαμηλής ποιότητας.

Ακολούθησε η στοίχιση των αλληλουχιών με τον αλγόριθμο Mafft 1.3.3 στο πρόγραμμα Geneious 8.1.2 για τον προσδιορισμό των ομόλογων θέσεων, καθώς βάσει αυτών θα γίνει ο υπολογισμός των εξελικτικών σχέσεων των ατόμων. Κατά τη διαδικασία αυτή, δόθηκε προσοχή στα κενά (gaps) τα οποία δεν αναμένεται να υπάρχουν στις αλληλουχίες που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, ενώ δυσκολεύουν αισθητά τη διαδικασία της στοίχισης όταν συναντώνται στις μη κωδικές αλληλουχίες.

### **2.3.2 Γενετικές αποστάσεις**

Έγινε εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των αλληλουχιών, μεταξύ των ειδών, αλλά και μεταξύ των κύριων κλάδων του δέντρου. Οι αποστάσεις υπολογίστηκαν ξεχωριστά για κάθε ένα τόπο και η εκτίμηση έγινε με βάση το μοντέλο p-distance και το μοντέλο Tamura-Nei (Tamura and Nei, 1993) όπως αυτό εφαρμόζεται στο πρόγραμμα MEGA version X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, and Tamura 2018). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τα δύο παραπάνω μοντέλα, θέλοντας να υπάρχουν δεδομένα συγκρίσιμα με άλλες αντίστοιχες έρευνες, καθώς και οι περισσότερες τις χρησιμοποιούσαν ευρέως και τις δύο.

### 2.3.3 Επιλογή μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης

Για τις ανάγκες των αναλύσεων που ακολουθήθηκαν, δημιουργήθηκαν δύο σύνολα δεδομένων, ένα για το κάθε γονίδιο που μελετήθηκε. Το πρώτο περιελάμβανε τις αλληλουχίες για τον μιτοχονδριακό τόπο (16s) των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (Παράρτημα II) και εκείνων που πάρθηκαν από την GenBank. Το δεύτερο περιελάμβανε τις αλληλουχίες για τον πυρηνικό τόπο (wingless) των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (Παράρτημα II) και εκείνων που πάρθηκαν από την GenBank αντίστοιχα. Και για τα δύο σύνολα χρησιμοποιήθηκε η ίδια εξωομάδα, της οποίας η αλληλουχία πάρθηκε από την GenBank [*Aeg laevicollis/Kim-Farell(2015)*].

Η επιλογή του κατάλληλου μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης για κάθε γονίδιο και για όλες τις φυλογενετικές αναλύσεις, έγινε ξεχωριστά για κάθε γονίδιο με τη χρήση του προγράμματος PartitionFinder 2 (Lanfear et al., 2016).

### 2.3.4 Εκτίμηση των φυλογενετικών δέντρων

Τα δύο σύνολα δεδομένων, υποβλήθηκαν σε συνδυασμένη φυλογενετική ανάλυση για όλα τα γονίδια ενοποιώντας τις αλληλουχίες τους οι οποίες και αντιστοιχούσαν σε διαφορετικούς γενετικούς τόπους. Η ενοποίηση αυτή, πραγματοποιήθηκε συμπεριλαμβάνοντας σε κάθε ανάλυση διαφορετικές παραμέτρους για κάθε γονίδιο που προέκυπταν από τη διαφορετική «φύση» αυτών, παρόλο που τέτοιου είδους ενοποιήσεις, ενέχουν μικρές πιθανότητες για μη αμερόληπτα αποτελέσματα.

Για τη διερεύνηση λοιπόν των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών των *D. parallelipipedus*, αλλά και μεταξύ αυτών και άλλων ειδών του γένους ή ακόμα και άλλων γενών, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Η μια ήταν αυτή της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood, ML) (Felsenstein, 1973, 1981) και η δεύτερη, αυτή της

Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας (Bayesian Inference, BI) (Huelsenbeck et al., 2001; Rannala and Yang, 1996).

Η ML ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα RAxML 8.2.12 (Stamatakis, 2015), το οποίο χρησιμοποιεί GTR+G, [(General Time Reversible model, με κατανομή Γ, για τα διάφορα διαχωρισμένα τμήματα τα οποία προέκυψαν από τις αναλύσεις στο Partitionfinder ως εξής: 16S = 1-535, Wingless\_pos1\_pos2 = 537-985\3, 536-985\3 και Wingless\_pos3 = 538-985\3. Τα μοντέλα στα οποία συμπεριλαμβάνεται η Γ κατανομή των πολυμορφικών θέσεων (+G) ταυτόχρονα με νουκλεοτιδικές θέσεις μηδενικής ποικιλομορφίας (Invariant sites, +I) αγνοήθηκαν, καθώς η Γ κατανομή επιτρέπει και συνυπολογίζει την ύπαρξη αυτών των θέσεων, όταν η τιμή της παραμέτρου σχήματος  $\alpha \leq 1$  (Yang, 1996, 2006). Η επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου έγινε με βάση το κριτήριο BIC (Bayesian Information Criterion, Sullivan and Joyce, 2005) μέσω του PartitionFinder ενώ για τη στατιστική υποστήριξη του δέντρου χρησιμοποιήθηκε η thorough bootstrap επιλογή με 200 τρεξίματα (runs) και 500 επαναλήψεις (bootstrap).

Η BI ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το MrBayes 3.2.7a, με τέσσερα τρεξίματα (runs) και 4 ανεξάρτητες αλυσίδες (MCMC chains) για κάθε τρέξιμο. Ο αριθμός των γενεών (generations) ορίστηκε στις  $10^7$  σε κάθε αλυσίδα, με αποθήκευση ενός δέντρου ανά 1000 γενεές ώστε συνολικά να προκύψει ένα σύνολο  $10^4$  δέντρων. Το 25% αυτών απορρίφθηκαν (burnin phase) καθώς αυτό είναι το διάστημα μέχρι να σταθεροποιηθεί η τιμή της πιθανοφάνειας (-lnL). Κατά την «εδραίωση» του τελικού BI δέντρου (majority rule consensus tree), ελέγχθηκαν διαγνωστικά όπως αυτά περιγράφονταν από το εγχειρίδιο του προγράμματος MrBayes. Μερικά από αυτά είναι η τυπική απόκλιση των διαχωρισμένων συχνοτήτων (standard deviation of split frequencies), η οποία θα πρέπει να είναι πολύ μικρή ( $<0,01$ ), ο δείκτης PSRF+, του οποίου η τιμή θα πρέπει να είναι κοντά στο 1, το διάγραμμα που περιλαμβάνει και τα 4 διαφορετικά τρεξίματα να έχει μορφή scattered, χωρίς να εμφανίζονται συγκεκριμένα πρότυπα κ.ά.

Τέλος, για την απεικόνιση και επεξεργασία των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2009) και TreeGraph2 (Stöver B C and Müller K F, 2010).



### 2.3.5 Μοριακή χρονολόγηση

Έπειτα από τα δέντρα που προέκυψαν από τις παραπάνω φυλογενετικές αναλύσεις, για τους κλάδους που προέκυψαν υπολογιστήκαν οι χρόνοι απόκλισης με τη βοήθεια του προγράμματος BEAST 2 [ v.2.5 (Bouckaert et al., 2019)] υπό το πλαίσιο της Μπεϋζιανής Συμπερασματολογίας.

Για την ανάλυση αυτή, χρησιμοποιήθηκε μόνο ένα σύνολο δεδομένων που περιελάμβανε το γονίδιο 16s (Παράρτημα III). Οι παράμετροι της ανάλυσης ορίστηκαν μέσω του προγράμματος BEAUti 2 (Bouckaert et al., 2019), ενώ πηγή για τον ρυθμό υποκατάστασης του γονιδίου που χρησιμοποιήθηκε για τη βαθμονόμηση του δέντρου αποτέλεσε η εργασία των Papadopolou et al (2010).

Το μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης που χρησιμοποιήθηκε, εκτιμήθηκε μέσω του προγράμματος PartitionFinder και ήταν το HKY. Οι εκ των προτέρων παράμετροι που ορίστηκαν με τη βοήθεια του BEAUti 2, αναφέρονται στη συνέχεια. Για την εκτίμηση του μοριακού ρολογιού χρησιμοποιήθηκε το Αυστηρό Ασυσχετίστο Ρολόι (Strict Clock), ως μοντέλο σύμφυσης/σύγκλισης του δέντρου του είδους (Multi Species Coalescent) ορίστηκε το Yule model και η ανάλυση έτρεξε για  $10^8$  γενιές, αποθηκεύοντας δεδομένα κάθε 1000.

Τα αποτελέσματα των διαφορετικών εκτελέσεων της ανάλυσης, συνενώθηκαν με τη χρήση του προγράμματος LogCombiner v2.6 (Bouckaert et al., 2019) ενώ αξιολογήθηκε με το λογισμικό Tracer v1.7.1. Από τα δέντρα που προέκυψαν, επιλέχθηκε εκείνο του οποίου οι κλάδοι παράγουν το μέγιστο γινόμενο των εκ των υστέρων πιθανοτήτων (maximum clade credibility tree), όπως αυτό εκτιμήθηκε μέσω του λογισμικού TreeAnnotator v2.4.6. Τέλος, υπολογίστηκε η ηλικία κάθε κόμβου από τη μέση τιμή της στο σύνολο των δέντρων (Mean heights) και το 95% διάστημα της υψηλότερης πυκνότητας των εκ των υστέρων πιθανοτήτων (95% highest posterior densities, HPD). Το τελικό δέντρο, οπτικοποιήθηκε και επεξεργάστηκε με τη βοήθεια των προγραμμάτων FigTree και TreeGraph2.

## Κεφάλαιο Τρίτο

---

### **Αποτελέσματα**

### 3.1 Περί εξαγωγής και αλληλούχισης δειγμάτων

Από τα 72 άτομα που συμπεριλήφθηκαν στη διαδικασία εξαγωγής γενετικού υλικού δεν χρησιμοποιήθηκαν όλα στις φυλογενετικές αναλύσεις. Ο λόγος σχετίζεται με το γεγονός ότι κάποια δείγματα ήταν πολύ παλιά και δεν είχαν συντηρηθεί υπό κατάλληλες συνθήκες για διατήρηση του γενετικού τους υλικού. Έτσι, τα παραπάνω είχαν ως συνέπεια την εξαγωγή ελλιπούς ποσότητας ή κακής ποιότητας (π.χ. κατακεραματισμένο) DNA, με αποτέλεσμα να μη μπορεί να γίνει πολλαπλασιασμός όλων των επιθυμητών γονιδίων ή να γίνεται κακής ποιότητας «διάβασμα» της αλληλουχίας από τον αυτοματοποιημένο αλληλουχητή.

Συνολικά αλληλουχήθηκαν με επιτυχία 57 άτομα *D. parallelipedus*, 2 *D. peyronis*, 2 *D. musimon* και 3 *D. alexisi* για το μιτοχονδριακό 16S rRNA γονίδιο και 59 άτομα *D. parallelipedus*, 2 *D. peyronis*, 2 *D. musimon* και 3 *D. alexisi* για το πυρηνικό wingless γονίδιο.

### 3.2 Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων

Οι γενετικές αποστάσεις για τα άτομα του είδους *D. parallelipedus*, (ενδοειδική απόσταση) (Εικόνα 3.1), είναι 4% για το 16sRNA και 0.6% για το wingless.

Συνεχίζοντας, οι γενετικές αποστάσεις των ατόμων του είδους *D. parallelipedus*, σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη του γένους κυμαίνονται από 5% έως 27% για το 16sRNA και από 0,7% έως 7% για το wingless. Τέλος, οι γενετικές αποστάσεις των ειδών του γένους *Dorcus* με εκείνα άλλων γενών αλλά και με το ορισμένο ως outgroup κυμαίνονται από 23% έως 31% για το 16sRNA και από 4% έως 14% για το wingless.

Ωστόσο, οι παραπάνω εκτιμήσεις των γενετικών αποστάσεων, προκειμένου να μπορούν να είναι συγκρίσιμες με αντίστοιχες άλλων εργασιών, υπολογίστηκαν και με βάση το μοντέλο Tamura-Nei, δίνοντας τιμές οι οποίες δεν απείχαν πολύ από εκείνες που περιγράφηκαν παραπάνω.

Οι αναλυτικοί πίνακες των αποστάσεων μεταξύ των ειδών, φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 3.1 και 3.2).

**Πίνακας 3.1:** Πίνακας γενετικών αποστάσεων μεταξύ των υπό εξέταση ειδών με βάση το μοντέλο *p-distance*. Ο τριγωνικός πίνακας αφορά τις γενετικές αποστάσεις (%): μιτοχονδριακού γονιδίου (*16sRNA*)\πυρηνικού γονιδίου (*wingless*)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>1. <i>D. parallelipedus</i></b>	4\0,6								
<b>2. <i>D. alexisi</i></b>	5\0,7	-							
<b>3. <i>D. musimon</i></b>	8\0,9	10\2	-						
<b>4. <i>D. peyronis</i></b>	25\7	24\7	26\6	-					
<b>5. <i>D. parallelipedus</i> (GenBank)</b>	5\-	8\-	8\-	25\-	-				
<b>6. <i>D. rectus</i></b>	11\2	10\2	11\7	25\7	11\-	-			
<b>7. <i>other Dorcus</i></b>	19\4	19\4	19\4	27\7	19\-	18\6	-		
<b>8. <i>other genera</i></b>	25\6	24\5	26\5	23\4	25\-	24\7	26\7	-	
<b>9. <i>outgroup</i></b>	30\12	29\11	30\12	31\14	30\-	31\13	30\12	30\11	-

**Πίνακας 3.2:** Πίνακας γενετικών αποστάσεων μεταξύ των υπό εξέταση ειδών με βάση το μοντέλο Tamura-Nei. Ο τριγωνικός πίνακας αφορά τις γενετικές αποστάσεις (%): μιτοχονδριακού γονιδίου (*16sRNA*)\πυρηνικού γονιδίου (*wingless*)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>D. parallelipedus</i>	5\0,6								
2. <i>D. alexisi</i>	5\0,7	-							
3. <i>D. musimon</i>	10\0,9	12\2	-						
4. <i>D. peyronis</i>	44\8	41\8	47\7	-					
5. <i>D. parallelipedus</i> ( <i>GenBank</i> )	5\-	9\-	9\-	44\-	-				
6. <i>D. rectus</i>	13\2	13\2	14\3	42\8	14\-	-			
7. <i>other Dorcus</i>	28\5	27\4	28\5	49\8	28\-	25\7	-		
8. <i>other genera</i>	42\7	39\6	45\6	38\4	43\-	38\8	43\8	-	
9. <i>outgroup</i>	54\15	51\14	58\14	59\18	54\-	58\17	55\14	57\14	-

### 3.3 Φυλογενετικές αναλύσεις

#### 3.3.1 Επιλογή καταλληλότερου μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης

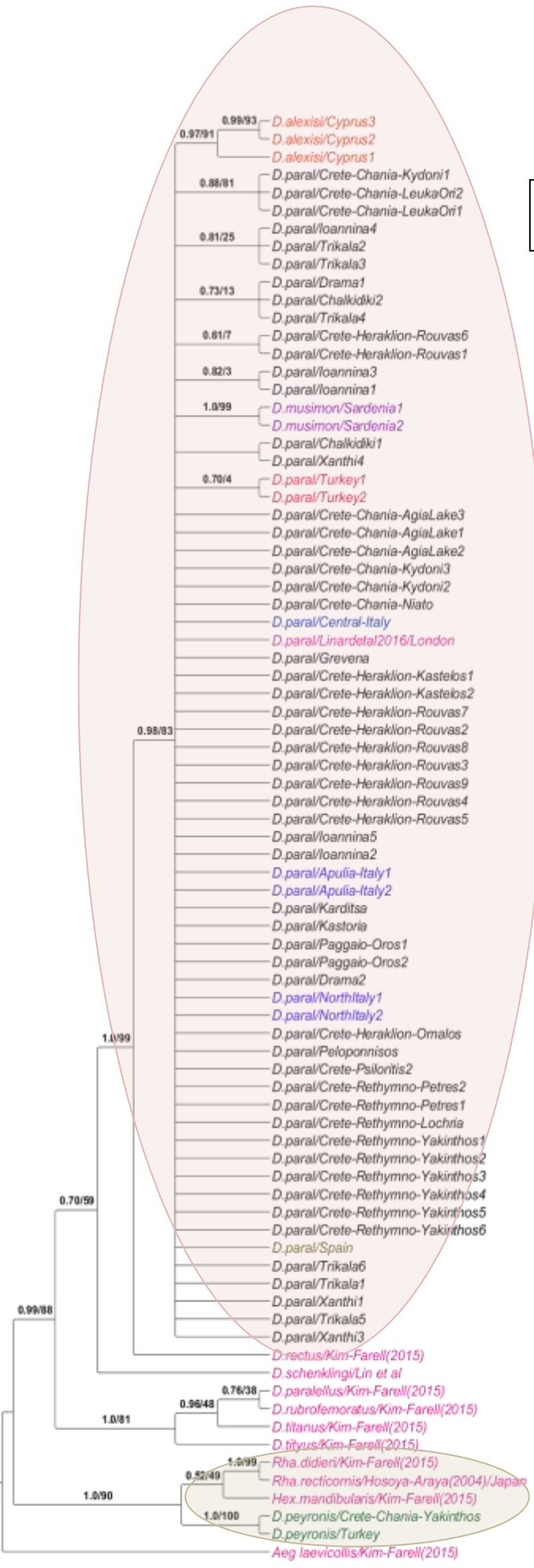
Τα μοντέλα που επιλέχθηκαν από το PF και τα επιμέρους διαχωριστικά πλαίσια (partitions) των δύο συνόλων δεδομένων για τις δύο διαφορετικές αναλύσεις, παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.3).

**Πίνακας 3.3:** Υποσύνολα partitions και μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης που επιλέχθηκε μέσω του προγράμματος PartitionFinder 2 για την ανάλυση Maximum Likelihood (ML) και για την ανάλυση Bayesian Inference (BI)

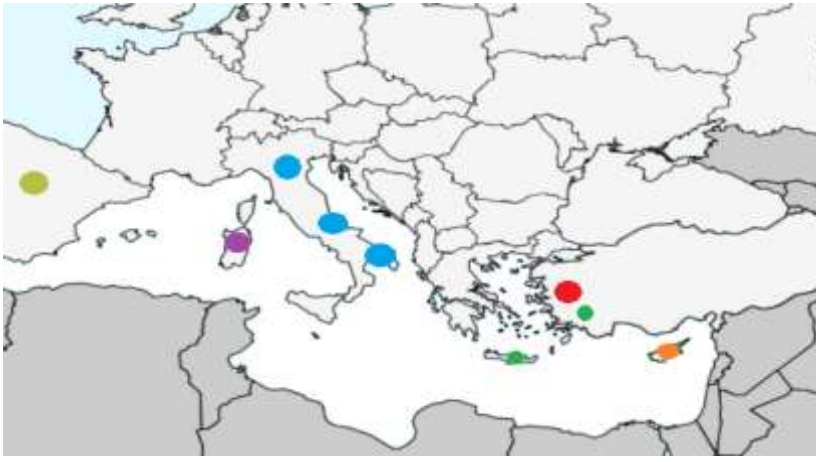
	Best Model	# sites	Partition names
<b>ML</b>			
1	GTR+G	535	16S
2	GTR+G	300	Wingless_pos1_pos2
3	GTR+G	150	Wingless_pos3
<b>BI</b>			
1	HKY+G	535	16S
2	HKY+I	249	Wingless_pos1_pos2
3	GTR+I	124	Wingless_pos3

### 3.3.2 Γονιδιακό δέντρο συνδυασμένου συνόλου δεδομένων

Για την περίπτωση της BI, χρησιμοποιήθηκαν και οι τέσσερις διαφορετικές διεξαγωγές της ανάλυσης (runs), καθώς μετά το τέλος των αναλύσεων φάνηκε να έχουν «ταξιδέψει» σε όλο τον χώρο των πιθανοτήτων. Στη συνέχεια υπολογίστηκε το φυλογενετικό δέντρο (50% majority rule tree) των  $4 \times 15 \times 10^4$  δέντρων που έμειναν μετά την απόρριψη του πρώτου 25% των δέντρων και η μέση τιμή της πιθανοφάνειάς τους ήταν  $\ln L = -6224.50$ . Για την ML το δέντρο με τη μεγαλύτερη τιμή πιθανοφάνειας είχε τιμή  $\ln L = -6084.94$ . Από τις δύο αυτές φυλογενετικές μεθόδους, προέκυψαν δέντρα με παρόμοια τοπολογία η οποία απεικονίζεται στην Εικόνα 3.1.



Κλάδος Α



**Εικόνα 3.1:** Το φυλογενετικό δέντρο συνδυασμένου συνόλου δεδομένων (μιτοχονδριακός και πυρηνικός γενετικός τόπος) όπως προέκυψε από την BI. Πάνω στους κλάδους φαίνεται η υποστήριξη από τις δύο αναλύσεις BI/ML - Με μαύρο χρώμα φαίνονται τα *D. parallelipipedus* από όλη την Ελλάδα, με μπλε, λαδί και κόκκινο τα αντίστοιχα της Ιταλίας, Ισπανίας και Τουρκίας, με ροζ όλες οι αλληλουχίες που πάρθηκαν από την GenBank, με πορτοκαλί και μωβ χρώμα τα *D. alexisi* και *D. musimon* αντίστοιχα και με πράσινο τα *D. peyronis* Τουρκίας και Κρήτης.

Κλάδος Β

Στο παραπάνω δέντρο, με χρώμα έχουν επισημανθεί οι «ομάδες» ατόμων που διαφοροποιούνται, είτε λόγω προέλευσης είτε λόγω αντιπροσώπευσης διαφορετικών taxa. Από αυτό προέκυψαν δύο διακριτοί κλάδοι, Κλάδος Α και Κλάδος Β. Στον Κλάδο Α, ομαδοποιούνται τα *D. parallelipipedus* από την Ελλάδα, αλλά και οι αντιπρόσωποι του είδους από Ιταλία (μπλε χρώμα), Ισπανία (λαδί χρώμα) και Τουρκία (κόκκινο χρώμα). Στον Κλάδο Β ωστόσο, ομαδοποιήθηκαν οι αντιπρόσωποι του μορφολογικά προσδιορισμένου *D. peyronis*, από Τουρκία και από Κρήτη (πράσινο χρώμα), αποτελώντας ένα ξεχωριστό κλαδί, που εμφανίζεται με αρκετά καλή υποστήριξη (posterior probabilities, p.p.=1.0/ bootstrap support, b.s.=90%) συγγενέστερο των άλλων γενών που υπάρχουν στο δέντρο, παρά με τα υπόλοιπα είδη του ίδιου γένους.

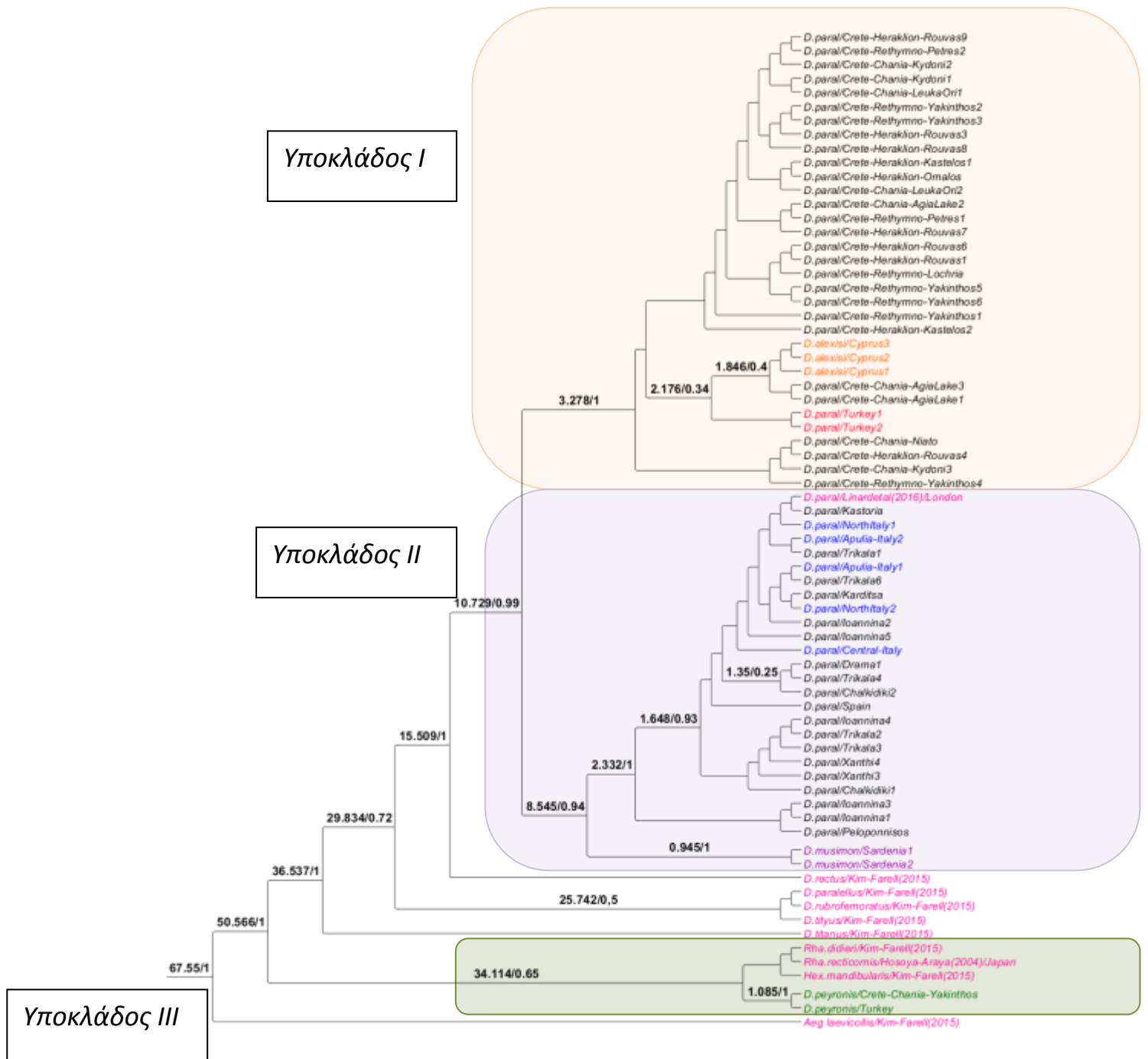
Από τα παραπάνω, η παραφυλία του γένους *Dorcus* υποστηρίζεται αρκετά και από τις δύο αναλύσεις, με τα μεσογειακά είδη του γένους (*D. parallelipipedus*, *D. alexisi*, *D. musimon*), ανεξαρτήτου χώρα προελεύσεως, να ομαδοποιούνται στον ίδιο κλάδο (p.p.=0.98/b.s.=83%) και μόνο το *D. peyronis* να διαχωρίζεται σε άλλο κλαδί μαζί με άλλα είδη του γένους (p.p.=0.99/b.s.=88%) αλλά ακόμα και με άλλα γένη (p.p.=1.0/b.s.=90%).

### 3.3.3 Μοριακή χρονολόγηση μιτοχονδριακού συνόλου δεδομένων

Για την εκτίμηση του χρόνου απόκλισης των κλάδων που προέκυψαν από τις παραπάνω αναλύσεις, έγινε χρονολόγηση με το πρόγραμμα Beast 2 και χρησιμοποιώντας για τη βαθμονόμηση, ρυθμό υποκατάστασης γονιδίων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας μόνο το σύνολο δεδομένων για το μιτοχονδριακό γονίδιο (16sRNA), αξιοποιήθηκε ο αντίστοιχος ρυθμός υποκατάστασης, ο οποίος ήταν ίσος με 0.054 και προερχόταν από την εργασία των Papadopoulos et al., 2010.

Έτσι, προέκυψε ένα δέντρο όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 2.3.5, του οποίου η τοπολογία φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.2).





Εικόνα 3.2: Το φυλογενετικό δέντρο για το μιτοχονδριακό σύνολο δεδομένων όπως αυτό προκύπτει από μέσω του Beast 2. Πάνω στους κλάδους φαίνονται οι χρόνοι απόκλισης δοσμένοι σε εκ. χρόνια μαζί με τα posterior probabilities (p.p.>0.2).

Παρόλο που το παραπάνω δέντρο, προέκυψε μόνο από τις αλληλουχίες του μιτοχονδριακού γονιδίου (16sRNA), η τοπολογία του είναι η αντίστοιχη (αναφορικά με τις ομαδοποιήσεις των ειδών) με εκείνη που προέκυψε από τις προηγούμενες φυλογενετικές αναλύσεις (BI/ML), στις οποίες είχαν χρησιμοποιηθεί οι αλληλουχίες και για τα δύο γονίδια (16sRNA & Wingless). Ωστόσο, εντοπίζεται διαφορά στον κλάδο που περιελάμβανε όλα τα μεσογειακά είδη του γένους *Dorcus* -πλην του *D. peyronis*- (Κλάδος Α), καθώς σε αυτό το δέντρο παρατηρείται ότι χωρίζεται σε δύο υποκλάδους (υποκλάδος Ι και υποκλάδος ΙΙ). Ο πρώτος από αυτούς περιλαμβάνει όλα τα *D. parallelipedus* της Κρήτης και της Τουρκίας και τα *D. alexisi* της Κύπρου, ενώ ο δεύτερος εμπεριέχει τους αντιπροσώπους του *D. parallelipedus* από την ηπειρωτική Ελλάδα, την Ισπανία και την Ιταλία καθώς και τα *D. musimon* της Σαρδηνίας. Τέλος, ο τρίτος κλάδος που φαίνεται να σχηματίζεται (υποκλάδος ΙΙΙ), περιλαμβάνει τα *D. peyronis* της Κρήτης και της Τουρκίας μαζί με τα διαφορετικά γένη της οικογένειας Lucanidae, των οποίων οι αλληλουχίες βρέθηκαν από την Genbank.

Από τη μοριακή χρονολόγηση, προκύπτει ότι οι δύο μεγάλες «ομάδες» (υποκλάδος Ι και υποκλάδος ΙΙ), διαχωρίστηκαν στο Μέσο Μειόκαινο και συγκεκριμένα πριν από 10.73 εκατομμύρια χρόνια, με τη διαφοροποίηση του πρώτου να χρονολογείται στο Πλειόκαινο και συγκεκριμένα στα 3.28 εκατομμύρια χρόνια ενώ του δεύτερου στα τέλη του Μειόκαινου στα 8.55 εκατομμύρια χρόνια.

Εσωτερικά του υποκλάδου Ι, οι πληθυσμοί της Τουρκίας από εκείνους της Κρήτης διαχωρίζονται πριν από 2.18 εκατομμύρια χρόνια (Πλειστόκαινο) αλλά με χαμηλή στατιστική υποστήριξη ( $p=0.34$ ), κάτι που παρατηρείται και στον διαχωρισμό του υποκλάδου που περιλαμβάνει τα *D. alexisi*, με 1.85 εκατομμύρια χρόνια (Πλειστόκαινο) αλλά με στατιστική υποστήριξη 0.4.

Όσον αφορά τον υποκλάδο ΙΙ, παρατηρείται διαχωρισμός του υποκλάδου που περιέχει τα *D. musimon* της Σαρδηνίας στα 8.55 εκατομμύρια χρόνια (Ανώτερο Μειόκαινο) με πολύ καλή στατιστική υποστήριξη ( $p=0.94$ ) και τη διαφοροποίηση αυτής της γενεαλογικής γραμμής να χρονολογείται στα 0,95 εκατομμύρια χρόνια ( $p=1$ ) (Μέσο Πλειστόκαινο). Αντίθετα, κάτι τέτοιο δεν θα μπορούσε να υπολογιστεί για τους αντιπροσώπους του *D. parallelipedus* της Ιταλίας, οι οποίοι και δεν φαίνεται να «συγκεντρώνονται» σε μία γενεαλογική

γραμμή που διαχωρίστηκε πριν κάποια εκατομμύρια χρόνια από τα υπόλοιπα άτομα του είδους που προέρχονται από τον ελληνικό χώρο.

Τέλος, όσον αφορά τον υποκλάδο III, διαχωρίστηκε στα 34.11 εκατομμύρια χρόνια (Αρχές Ολιγόκαινου) ( $p.p=0.65$ ), με τη δημιουργία του υποκλάδου που περιλαμβάνει τα *D. peyronis* να δημιουργείται στα 1.085 εκατομμύρια χρόνια (Πλειστόκαινο) και με πολύ καλή υποστήριξη ( $p.p=1$ ).

## Κεφάλαιο Τέταρτο

---

### Συζήτηση

## 4.1 Γενικά στοιχεία

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια πρώτη προσπάθεια αποτύπωσης των φυλογενετικών σχέσεων των πληθυσμών του είδους *D. parallelipedus* στη Μεσόγειο (με έμφαση στους πληθυσμούς του στον ελληνικό χώρο), καθώς και των σχέσεων του είδους αυτού με τα υπόλοιπα είδη του γένους που βρίσκονται στη Μεσόγειο. Μέχρι σήμερα, ελάχιστα ήταν γνωστά για τις φυλογενετικές σχέσεις αυτών των ειδών εφόσον δεν υπάρχουν μελέτες που να πραγματεύονται αυτό το θέμα. Έτσι, από τις φυλογενετικές αναλύσεις με τη χρήση δύο γενετικών τόπων, ενός μιτοχονδριακού και ενός πυρηνικού, προκύπτει, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω, ότι τα γένος *Dorcus* δεν είναι μονοφυλετικό. Η διαφοροποίηση του κλάδου που περιλαμβάνει τα *D. parallelipedus*, *D. alexisi* και *D. musimon* χρονολογείται στο Μέσο Μειόκαινο με τους δύο υποκλάδους που σχηματίζονται να διαφοροποιούνται στο Πλειόκαινο. Επίσης προκύπτουν στοιχεία, που δείχνουν την πιθανότητα ύπαρξης υπολειμματικού είδους στην Κρήτη, του *D. peyronis*, καθώς και ενδείξεις για πιθανές ταξινομικές αλλαγές στο γένος.

## 4.2 Περί δειγμάτων

Όπως αναφέρθηκε και στο υποκεφάλαιο 3.1, δεν χρησιμοποιήθηκαν όλα τα δείγματα για τις φυλογενετικές αναλύσεις, καθώς δεν ήταν όλα συντηρημένα υπό κατάλληλες συνθήκες για διατήρηση του γενετικού τους υλικού. Συγκεκριμένα, κάποια από τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν συλλεχθεί με τη χρήση παγίδων παρεμβολής (pitfall traps) στις οποίες χρησιμοποιήθηκε προπυλενιογλυκόλη για συντήρηση των δειγμάτων, υλικό το οποίο έχει «διχάσει» για τις πιθανές επιδράσεις του στην ποιότητα του DNA το οποίο τελικά απομονώνεται (Ferro, M. L. & Park, J. S., 2013, Ballare, K. M. Et al., 2019).

### 4.3 Βαθμός γενετικής διαφοροποίησης

Η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών του *D. parallelipedus* (ενδοειδική διαφοροποίηση) αλλά και μεταξύ των υπολοίπων ειδών (διαειδική διαφοροποίηση), για το μιτοχονδριακό γονίδιο (16S rRNA), φαίνεται να είναι ελάχιστα υψηλότερη από αντίστοιχες μελέτες σε άλλα είδη του γένους και σε άλλα κολεόπτερα (Hosoya et al., 2001, 2005, Han et al., 2010, Gkontas et al., 2016).

Συγκεκριμένα, από την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με το μοντέλο p-distance (Πίνακας 3.1), η γενετική απόσταση μέσα στο είδος *D. parallelipedus*, μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών, ήταν 4%, ποσοστό που είναι λίγο υψηλότερο από εκείνο που εκτίμησαν οι Hosoya et al. (2001) (2.26 % ανάμεσα στους πληθυσμούς του *Ceruchus lignarius*, είδος που ανήκει στην οικογένεια των Lucanidae) αλλά κοντά με εκείνα που εκτίμησε ο Trewick (2000), στην εργασία του για κολεόπτερα (Lucanidae) και ορθόπτερα της Νέας Ζηλανδίας (4.4-7.2%).

Συνεχίζοντας, για τη διαφοροποίηση ανάμεσα στα τέσσερα μεσογειακά είδη του γένους, παρατηρείται ότι τα ποσοστά για τα τρία από τα τέσσερα είδη (*D. parallelipedus*, *D. alexisi*, *D. musimon*), κυμαίνονται από 5% έως 10%, σε αντίθεση με εκείνα μεταξύ των μεσογειακών ειδών και εκείνων εκτός Ευρώπης, τα οποία και ήταν πολύ μεγαλύτερα (19%) με εξαίρεση το είδος *D. rectus* (10-11%). Αντίστοιχα ποσοστά αναφέρονται και στις μελέτες των Hosoya et al. (2005) για είδη της οικογένειας των Lucanidae στην Ιαπωνία, με ποσοστά 6.4-16.4% καθώς και σε εκείνη των Gkontas et al. (2016) για τα Tenebrionidae με ποσοστά 9-18%. Η βιβλιογραφία αυτή, αναφέρεται σε ποσοστά μεταξύ διαφορετικών ειδών ενός γένους, καθώς τα αντίστοιχα για υποείδη ενός είδους είναι πολύ χαμηλότερα, 0.6-2.7% (Hosoya et al. 2005) και 1.6% (Han et al., 2010).

Ωστόσο, παρατηρήθηκαν αρκετά αυξημένα τα ποσοστά διαφοροποίησης του είδους *D. peyronis* από τα υπόλοιπα είδη του γένους, με ποσοστά από 18-26%, τα οποία και χρησιμοποιώντας το μοντέλο Tamura-Nei, πλησιάζουν στο διπλάσιο. Τέτοιου μεγέθους ποσοστά ανάμεσα σε είδη του ίδιου γένους, βιβλιογραφικά θεωρούνται αρκετά υψηλά για τα κολεόπτερα (Hebert et al., 2003). Ανάλογα ποσοστά ωστόσο, βρέθηκαν μεταξύ των *Dorcus* και των υπόλοιπων γενών που μελετήθηκαν από την οικογένεια των Lucanidae (23-26%), τα οποία και αναφέρονται σε διαφοροποιήσεις ανάμεσα σε γένη της ίδιας οικογένειας στις

εργασίες των Hosoya et al. (2005) και Gkontas et al. (2016) με ποσοστά 14.1-29.5% για τα Lucanidae και 22% για γένη της οικογένειας Tenebrionidae αντίστοιχα. Τα παραπάνω, θα μπορούσαν να αποτελέσουν σοβαρή ένδειξη για ταξινομική αναθεώρηση του είδους *D. peyronis*, το οποίο έχει εξαιρετικά υψηλή διαφοροποίηση από τα υπόλοιπα είδη του γένους, οπότε και πιθανότατα θα μπορούσε να ανήκε αλλού, κάτι το οποίο δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί με την παρούσα μελέτη.

Αναφορικά με το πυρηνικό γονίδιο μελέτης, οι γενετικές αποστάσεις ήταν αρκετά μικρότερες από τις αντίστοιχες του μιτοχονδριακού (Πίνακας 3.1), αλλά με την ίδια αναλογία σε σχέση με τις διάφορες «συγκρίσεις». Οι μικρότερες γενετικές αποστάσεις, ήταν εκείνες ανάμεσα στο είδος *D. parallelipedus* (0.6%), αλλά και μεταξύ των υπόλοιπων μεσογειακών ειδών μεταξύ τους (0.7-2%- πλην του *D. peyronis*). Αντίστοιχες τιμές, βρέθηκαν και σε αντίστοιχες μελέτες όπως εκείνη των Solano et al. (2016), οι οποίοι και ασχολήθηκαν με είδη του γένους *Lucanus* (διαειδική= 1.1%, ενδοειδική=0.7% και 0.9%) αλλά και εκείνη των Tsai et al. (2014) για άλλα γένη της οικογένειας των Lucanidae (within=0.1-0.3%). Αντίθετα η μεγαλύτερη γενετική διαφοροποίηση στο πυρηνικό γονίδιο μελέτης, εντοπίστηκε για άλλη μια φορά μεταξύ του *D. peyronis* και των υπόλοιπων μεσογειακών ειδών (6-7%), αλλά και μεταξύ των μεσογειακών ειδών του γένους *Dorcus* και των άλλων γενών (4-7%).

Οι παραπάνω διαφορές στα δύο γονίδια, μπορούν να εξηγηθούν από το γεγονός ότι το μιτοχονδριακό γονίδιο εξελίσσεται ταχύτερα, συνεπώς μπορεί να εμφανίζει υψηλότερο βαθμό διαφοροποίησης μεταξύ των διαφόρων taxa. Ωστόσο, ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων και των δύο ειδών γενετικών τόπων, μπορεί να δώσει καλύτερα εξελικτικά συμπεράσματα (Kubota et al., 2011, Zang et al., 2005).

#### 4.4 Φυλογένεση του γένους *Dorcus*

Δύο βασικοί κλάδοι (Κλάδος A και B) προκύπτουν από τις φυλογενετικές αναλύσεις που έγιναν για το σύνολο δεδομένων με τα μιτοχονδριακά και πυρηνικά γονίδια (Εικόνα 3.1). Οι αναλύσεις ML και BI εμφάνισαν ίδια τοπολογία όσον

αφορά τα γονιδιακά δέντρα του συνόλου δεδομένων που περιελάμβανε και τα δύο γονίδια, τουλάχιστον αναφορικά με την ομαδοποίηση των αλληλουχιών στους βασικούς κλάδους. Διαφορές ωστόσο, εντοπίστηκαν στην στατιστική υποστήριξη και στη θέση κάποιων υποκλάδων με χαμηλή υποστήριξη και από τους δύο τύπους αναλύσεων.

Οι δύο αυτοί βασικοί κλάδοι, δεν εμφανίζουν κάποιο γεωγραφικό πρότυπο, αλλά η ύπαρξή τους έχει να κάνει με την «ομαδοποίηση» συγκεκριμένων ειδών σε αυτούς. Ακόμα, γίνεται εμφανής η παραφυλετικότητα του γένους *Dorcus*, κάτι που δεν ήταν γνωστό μέχρι τώρα για τους πληθυσμούς της Ευρώπης και της Μεσογείου, καθώς δεν έχουν γίνει παρόμοιες μελέτες με την παρούσα. Ωστόσο, οι Hosoya et al. (2005) υποστηρίζουν τη μονοφυλετικότητα του γένους για τα είδη και τους πληθυσμούς της Ιαπωνίας, ενώ πολλοί έχουν παρατηρήσει και τις δύο «καταστάσεις», κυρίως στο γένος *Lucanus* της οικογένειας των Lucanidae και στην Ευρώπη (Cox et al 2013, Solano et al., 2016, Chen et al., 2019).

#### 4.4.1 Ο Κλάδος A

Ο πρώτος και μεγαλύτερος κλάδος (p.p.=0.98/b.s.=83%), περιλαμβάνει τα *D. parallelipedus* από όλες τις χώρες και περιοχές δειγματοληψίας, δείχνοντας έτσι μια μικρή γενετική διαφοροποίηση μεταξύ αυτών, παρόλες τις μορφολογικές διαφορές που μπορεί κανείς να συναντήσει ακόμα και σε άτομα προερχόμενα από κοντινές περιοχές. Ας έχουμε ωστόσο υπόψιν μας ότι η οικογένεια των Lucanidae, χαρακτηρίζεται από είδη με εξαιρετικά υψηλή μορφολογική ποικιλότητα (Hosoya & Araya, 2005, Chen et al., 2019). Ακόμα, σύμφωνα με μελέτες, η φαινοτυπική ποικιλομορφία μπορεί να οφείλεται σε φαινόμενα υβριδισμού (Kawano, 2004), περίπτωση που πιθανότατα να ισχύει, αλλά μόνο εάν την τοποθετούσαμε περίπου στο άνω Μειόκαινο όπου και υπήρχε σαφής επικοινωνία μεταξύ των οργανισμών σε όλη τη Μεσόγειο, καθώς από το Πλειόκαινο και μετά άρχισαν να δημιουργούνται φραγμοί.

Συνεχίζοντας, μαζί με τα *D. parallelipedus*, στον ίδιο κλάδο βρίσκονται τα μορφολογικά προσδιορισμένα ως ξεχωριστά είδη *D. alexisi* και *D. musimon* από την Κύπρο και τη Σαρδηνία αντίστοιχα. Κάτι τέτοιο, έχει παρατηρηθεί και στην



εργασία των Cox et al. (2013), στην οποία παρά την μέτρια έως χαμηλή γενετική απόσταση μεταξύ των *L. (P.) barbarossa* και *L. c. fabiani* της οικογένειας των Lucanidae, μορφολογικά είναι αρκετά διακριτά. Το γεγονός αυτό, οδήγησε σε υποθέσεις όπως ύπαρξη υβριδισμού εντός του γένους, ή ακόμα και ατελούς διαλογής των γενεαλογικών γραμμών (πλήρης απώλεια του αρχικού μιτοχονδριακού γονιδιώματος ενός είδους) λαμβάνοντας βέβαια υπόψιν ότι και τα δύο είδη είναι πολύ συγγενικά μεταξύ τους (Hailer et al., 2012). Η περίπτωση του υβριδισμού για τους οργανισμούς μελέτης, δεν θα μπορούσε να ισχύει, παρά μόνο αναφερόμενοι στην εποχή του Μειόκαινου, δεδομένης της μεταγενέστερης γεωγραφικής απομόνωσης των ειδών μελέτης, σε νησιά της Μεσογείου.

Από τα παραπάνω λοιπόν, παρατηρείται μια σχετικά χαμηλή ενδοειδική διαφοροποίηση στο γένος, με τα *D. alexisi* και *D. musimon* να εμφανίζονται αρκετά κοντά γενετικά με το κοινό *D. parallelipedus*. Έτσι, η χαμηλή αυτή ποικιλομορφία εντός του κλάδου και ανάμεσα στα διάφορα είδη που τον απαρτίζουν, παρά το γεωγραφικό εύρος που καταλαμβάνουν (από Ισπανία μέχρι και Κύπρο), μπορούμε να υποθέσουμε ότι υποδεικνύει την πρόσφατη και γρήγορη εποίκηση αυτών των περιοχών, όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλους οργανισμούς (Tsai et al., 2014), ή αντίθετα μια αρκετά παλιά διασπορά του τάξου στο χώρο της Μεσογείου με περιορισμένη γεωγραφικά απομόνωση των τάξων και σχετικά πρόσφατη επέκταση της κατανομής τους. Σε κάθε περίπτωση, η μοριακή χρονολόγηση μπορεί να επιβεβαιώσει ή όχι τέτοιου είδους υποθέσεις αλλά και κατά πόσο αποτελέσματα σαν τα παραπάνω οφείλονται σε παλαιογεωγραφικά γεγονότα της περιοχής μελέτης ή όχι.

#### **4.4.2 Ο Κλάδος Β**

Αναφορικά με τον δεύτερο κλάδο, (p.p.=1.0/b.s.=99%), περιλαμβάνει τα *D. peyronis* της Κρήτης και της Τουρκίας, μαζί με είδη άλλων γενών της οικογένειας τα οποία δεν έχουν βρεθεί (ακόμα τουλάχιστον) ούτε στη Μεσόγειο, ούτε στην Ευρώπη. Το είδος αυτό, έχει σαφή ανατολική προέλευση καθώς εκτείνεται από την γειτονική Τουρκία από όπου και συλλέχθηκε μέχρι και το μακρινό Ιράν (Bartolozzi

et al., 2014). Ακόμα, η εξαιρετικά υψηλή γενετική απόσταση που εμφανίζει με τα υπόλοιπα είδη του γένους, ακόμα και με εκείνα που συλλέχθηκαν από πολύ κοντινές ή ακόμα και ίδιες τοποθεσίες δειγματοληψίας, σε συνδυασμό με την μικρότερη απόσταση από άλλα γένη της οικογενείας, πιθανότατα υποδεικνύει λάθος στην ταξινόμηση και την ανάγκη για την ταξινομική του αναθεώρηση.

Ωστόσο, δεδομένης της κατανομής του είδους που είναι γνωστή από του πρόσφατους καταλόγους (Löbl, 2016) αλλά και της σπανιότητας με την οποία έχει βρεθεί στα βουνά της ηπειρωτικής Ελλάδας σε σχέση με εκείνα της Κρήτης, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι πρόκειται για ένα πολύ παλιό «ανατολίτικο» είδος, που άφησε υπολειμματικούς πληθυσμούς στην Ελλάδα και την Κρήτη.

#### **4.5 Χρονολόγηση των κλάδων με χρήση ρυθμού υποκατάστασης του 16s**

Κατά τη χρονολόγηση των κλάδων, χρησιμοποιήθηκε ο ρυθμός υποκατάστασης του μιτοχονδριακού γονιδίου μελέτης, ο οποίος και εκτιμήθηκε με βάση το θαλάσσιο φράγμα του Αιγαίου (Papadopoulou et al., 2010).

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ο διαχωρισμός του βασικού κλάδου (Κλάδος Α), σε δύο υποκλάδους, τον υποκλάδο Ι και υποκλάδο ΙΙ, οι οποίοι εμφανίζουν ξεκάθαρο γεωγραφικό πρότυπο. Ο πρώτος περιλαμβάνει τους αντιπροσώπους των ειδών του γένους *Dorcus* από την Κρήτη, την Κύπρο και την Τουρκία ενώ ο δεύτερος, τα άτομα από την ηπειρωτική χώρα της Ελλάδας, την Ιταλία, τη Σαρδηνία και την Ισπανία. Παράλληλα ο άλλο κλάδος Β της φυλογενετικής ανάλυσης, διατηρήθηκε, περιλαμβάνοντας μαζί τα άτομα του *D. peyronis* από Κρήτη και Τουρκία.

Παλαιογεωγραφικά, κατά το κατώτερο Μειόκαινο ο ελληνικός χώρος ήταν όλος ενωμένος σε μια στεριά με σαφή επικοινωνία με τις γειτονικές χώρες. Δεδομένου του διαχωρισμού των δύο βασικών υποκλάδων του Κλάδου Α, ο οποίος χρονολογείται στα 10.7 εκατομμύρια χρόνια (Μέσο Μειόκαινο), θα μπορούσαμε να

υποθέσουμε ότι οι πληθυσμοί των *D. parallelipipedus* της Τουρκίας, διαχωρίστηκαν από τους αντίστοιχους της Ελλάδας λόγω της δημιουργίας του θαλάσσιου φράγματος του Αιγαίου.

Συνεχίζοντας μέσα στους δύο υποκλάδους αναφορικά με τα διαφορετικά είδη που περικλείουν, συναντάμε το *D. alexisi* της Κύπρου στον κλάδο με τα κρητικά και τουρκικά άτομα του *D. parallelipipedus* με το διαχωρισμό του να χρονολογείται πολύ πρόσφατα, στο Κατώτερο Πλειστόκαινο (2.18 εκατομμύρια χρόνια) αλλά με αρκετά χαμηλή υποστήριξη. Δεδομένης της ιδιαίτερης παλαιογεωγραφικής ιστορίας του νησιού της Κύπρου (Hadjisterkotis et al., 2000) και με τις υποθέσεις περί ένωσής του με την Ανατολία να μην έχουν επιβεβαιωθεί, πιθανολογείται η διασπορά του τάξου από την Τουρκία, εφόσον ο διαχωρισμός του ελληνικού χώρου από την Ανατολία είχε αρχίσει ήδη να υφίσταται στα 12 εκατομμύρια χρόνια με τη δημιουργία του θαλάσσιου φράγματος του Αιγαίου.

Όσον αφορά το είδος *D. musimon* το οποίο και συμπεριλήφθηκε στον υποκλάδο με τα *D. parallelipipedus* της ηπειρωτικής Ελλάδας, της Ιταλίας και της Ισπανίας, φαίνεται να διαχωρίζεται στα 8.5 εκατομμύρια χρόνια (Ανώτερο Μειόκαινου), όπου η απομόνωση του νησιού της Σαρδηνίας αρχίζει να υφίσταται και τελικά να εδραιώνεται μετά το τέλος του Μεσσηνίου (Palombo, 2018). Τέλος, οι σχέσεις των ιταλικών πληθυσμών του *D. parallelipipedus* με τα ελληνικά, δεν εμφάνισαν κάποιο χαρακτηριστικό πρότυπο κατά τη χρονολόγηση ώστε να δώσουν παραπάνω στοιχεία για την επίλυση αυτών.

Τέλος, αναφορικά με τα *D. peyronis*, ο διαχωρισμός τους από τα υπόλοιπα είδη του γένους χρονολογείται πολύ παλιά, στα 50.5 εκατομμύρια χρόνια. Η πολύ παλιά αυτή απομόνωση δείχνει μια ιστορία για την αποσαφήνιση της οποίας απαιτείται να συμπεριληφθούν, τα πολυάριθμα γένη από την ανατολική Ασία, όπου και συγκεντρώνεται ο μεγαλύτερος πλούτος ειδών της οικογένειας Lucanidae (Ulyshen, 2018). Ωστόσο, ο διαχωρισμός του «κρητικού» από τον «τουρκικό», χρονολογείται στα 1.85 εκατομμύρια χρόνια (Πλειστόκαινο), κάτι που δεν συνάδει με την παλαιογεωγραφική ιστορία της Κρήτης και της Τουρκίας, υποδεικνύοντας μια Πλειστοκαινική διασπορά από την Τουρκία. Ωστόσο απάντηση στην κατεύθυνση της διασποράς θα δοθεί με ανάλυση περισσότερων δειγμάτων και γονιδίων από τις εμπλεκόμενες περιοχές.

Αντί αυτού, επιβεβαιώνεται η υπόθεση που διατυπώθηκε παραπάνω, περί αποίκησης του είδους στην ηπειρωτική Ελλάδα από Βόρεια και ύπαρξης υπολειμματικών πληθυσμών στα βουνά της Κρήτης, η οποία και θα μπορούσε να ενισχυθεί ακόμα παραπάνω με τη μελέτη αντιπροσώπων του είδους από τα βουνά της βόρειας Ελλάδας.

#### 4.6 Συμπεράσματα

Το γένος *Dorcus*, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας εμφανίζει εξαιρετικά χαμηλή γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών των ειδών του, δείχνοντας τα τρία από τα τέσσερα αυτά μεσογειακά είδη μελέτης (*D. parallelipipedus*, *D. alexisi* και *D. musimon*), να είναι γενετικά αρκετά κοντά μεταξύ τους. Παρόλο που οι χρόνοι απόκλισης που εκτιμήθηκαν είναι πολύ μεγάλοι, η ενδοειδική διαφοροποίηση των παραπάνω είναι σχετικά μικρή, δείχνοντας είτε κάποιου είδους ροή (ενεργητική ή παθητική διασπορά), είτε παλιά και περιορισμένη γεωγραφικά απομόνωση με σχετικά πρόσφατη επέκταση της κατανομής τους. Συμπερασματικά λοιπόν, θα μπορούσαμε να αναθεωρήσουμε ταξινομικά και αναφορικά με το κατά πόσο αναφερόμαστε σε τρία διαφορετικά είδη ή υποείδη και όχι απλά σε ένα είδος με αυξημένη μορφολογική ποικιλομορφία.

Επιπλέον, το γένος εμφανίζεται παραφυλετικό όσον αφορά τον χώρο της Μεσογείου. Η παραφυλετικότητα αυτή, οφείλεται στον «διαχωρισμό» του είδους *D. peyronis* από τα υπόλοιπα είδη του γένους όπως προκύπτει από το δέντρο αλλά και δεδομένων των εξαιρετικά μεγάλων γενετικών αποστάσεων και για τα δύο γονίδια μελέτης. Το είδος αυτό είναι γενετικά πιο κοντινό στα είδη *Hexarthrius mandibularis*, *Rhaetulus didieri* και *Rhaetulus recticornis*, παρά στα υπόλοιπα είδη του γένους στο οποίο ανήκει μορφολογικά.

Έτσι, θα μπορούσε να προταθεί μια ταξινομική αναθεώρηση η οποία θα περιελάμβανε την κατάταξή του σε άλλο γένος, χωρίς όμως αυτό να είναι δυνατόν να προσδιοριστεί, λόγω της απουσίας δεδομένων και αντιπροσώπων άλλων μεσογειακών γενών της ίδιας οικογένειας στην Ευρώπη και ειδικότερα στη

Μεσόγειο. Ωστόσο, δεδομένης της ανατολικής προέλευσής του, πιθανότατα η μελλοντική μελέτη του είδους αυτού μαζί με γένη της οικογένειας που συναντώνται στην Ανατολία, πχ. Ιρανικά, θα μπορούσε να δώσει λύση στο ταξινομικό πρόβλημα, με την πιο πιθανή υπόθεση το είδος αυτό να ομοιάζει πολύ περισσότερο με βαθιά ανατολικά είδη εφόσον προήλθε από εκεί.

Εν κατακλείδι, προκειμένου να πλησιάσουμε ακόμα περισσότερο τη λύση ταξινομικών θεμάτων που συνεχίζουν να υφίστανται, σε μια μελλοντική μελέτη θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν τόσο περισσότεροι γενετικοί τόποι (κυρίως πυρηνικοί), όσο και να γίνουν αναλύσεις μικροδοριφορικών ή SNPs για την περαιτέρω διερεύνηση της χαμηλής ενδοειδικής διαφοροποίησης. Ακόμα, αναγκαία θα ήταν και η χρήση περισσότερων αντιπροσώπων, οι οποίοι θα πρέπει να αφορούν τα είδη που ήταν προς μελέτη, με αντιπροσώπους από περισσότερες περιοχές τόσο της Ελλάδας όσο και των άλλων χωρών της Μεσογείου αλλά και της Κεντρικής Ευρώπης, καθώς και άλλα γένη της οικογένειας που κατανέμονται στη Μεσόγειο και την Ανατολία.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- **Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- **Anastasakis, G.C., Dermitzakis, D.M., 1990.** Post-Middle-Miocene paleogeographic evolution of the region. Its possible influence on the distribution of the Quaternary mammals of the Kyklades Islands. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie-Abhandlungen* 1, 1-16.
- **Ballare, K. M., Pope, N. S., Castilla, A. R., Cusser, S., Metz, R. P., & Jha, S. (2019).** Utilizing field collected insects for next generation sequencing: Effects of sampling, storage, and DNA extraction methods. *Ecology and Evolution*.
- **Baraud J. (1993).** Les Coléoptères Lucanoidea de l'Europe et du Nord de l'Afrique. *Bulletin mensuel de la Société linnéenne de Lyon*, 62(2): 42–64.
- **Bartolozzi, L., & Sprecher-Uebersax, E. (2006).** Lucanidae, Pg. 63–76. *Catalogue of palaeartic Coleoptera*, 3.
- **Bartolozzi L., Ghahari H., Sprecher-Uebersax E., Zilioli M. (2014).** A checklist of stag beetles (Coleoptera: Scarabaeoidea: Lucanidae) from Iran. *Zootaxa*, 3887(3): 422–436.
- **Bartolozzi, L., Norbiato, M., & Cianferoni, F. (2016).** A review of geographical distribution of the stag beetles in Mediterranean countries (Coleoptera: Lucanidae). *Fragmenta entomologica*, 153-168.
- **Blondel J, Aronson J, Bodiou J-Y, Boeuf G. (2010).** The Mediterranean Region. *Biological Diversity in Space and Time*. Oxford University Press Inc., New York, NY.
- **Bouckaert R., Vaughan T.G., Barido-Sottani J., Duchêne S., Fourment M., Gavryushkina A., et al. (2019).** BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 15(4), e1006650.
- **Bunalski, M., Samin, N., Ghahari, H., & Hawkeswood, T. J. (2014).** Contributions to the knowledge the scarab beetles of Golestan province,

Northern Iran with checklist of Iranian Scarabaeoidea (Coleoptera). Polish Journal of Entomology, 83(2), 141-170.

- **Buse, J. Ö. R. N., Levanony, T., Timm, A. N. I. K. A., Dayan, T. A. M. A. R., & Assmann, T. H. O. R. S. T. E. N. (2010).** Saproxylic beetle assemblages in the Mediterranean region: Impact of forest management on richness and structure. *Forest ecology and Management*, 259(8), 1376-1384.
- **Cálix, M., Alexander, K. N. A., Nieto, A., Dodelin, B., Soldati, F., Telnov, D., ... & Jansson, N. (2018).** European red list of saproxylic beetles. *IUCN, Brussels*
- **Chen, Y., Liu, J., Cao, Y., Zhou, S., & Wan, X. (2018).** Two new complete mitochondrial genomes of Dorcus stag beetles (Coleoptera, Lucanidae). *Genes & genomics*, 40(8), 873-880.
- **Creutzburg, N. (1963).** Paleogeographic evolution of Crete from Miocene till our days. *Cretan Annals*, 15(16), 336-342.
- **Daams, R., Van Der Weerd, A.V. (1980).** Early Pliocene small mammals from the Aegean island of Karpathos (Greece) and their paleogeographic significance. *Geol. Mijnbouw* 59, 327-331.
- **de Jong, Y. et al. (2014)** Fauna Europaea - all European animal species on the web. *Biodiversity Data Journal* 2: e4034. doi: 10.3897/BDJ.2.e4034.
- **Dermitzakis, M. D., & Papanikolaou, D. J. (1981).** Paleogeography and geodynamics of the Aegean region during the Neogene. In *Annales géologiques des pays helléniques* (Vol. 30, pp. 245-289).
- **Dermitzakis, D.M., 1990.** Paleogeography, Geodynamic Processes and event Stratigraphy during the Late Cenozoic of the Aegean area. *Atti Convegno Lincei* 85, 263–288.
- **Dowell, Karen. (2008).** "Molecular Phylogenetics: An Introduction to Computational Methods and Tools for Analyzing Evolutionary Relationships." *Math 500*: 18.
- **E. v. Oertzen. 1886.** Verzeichniss der Coleopteren Griechenlands und Cretas
- **Felsenstein, J. (1973).** Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Systematic Biology*, 22(3), 240-249.

- **Felsenstein, J. (1981).** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution*, 17(6), 368-376.
- **Ferro, M. L., & Park, J. S. (2013).** Effect of propylene glycol concentration on mid-term DNA *preservation of Coleoptera*. *The Coleopterists Bulletin*, 67(4), 581-586.
- **Fremlin, M., & Hendriks, P. (2011).** Sugaring for stag beetles—different feeding strategies of *Lucanus cervus* and *Dorcus parallelipipedus*. *Bull Amat Entomol Soc*, 70, 57-67.
- **Fujita, H. (2010).** The lucanid beetles of the world. *Mushi-Sha's Iconographic Series of Insects*, 6, 1–472
- **Garcia, N., Numa, C., Bartolozzi, L., Brustel, H., Buse, J., Norbiato, M., Recalde, J.I., Zapata, J.L., Dodelin, B., Alcazar, E., Barrios, V., Verdugo, A., Audisio, P., Mico, E., Otero, J. C., Bahillo, P., Vinolas, A., Valladares, L., Mendez, M., El Antry, S., Galante, E. (2018).** *The conservation status and distribution of Mediterranean saproxylic beetles*. Malaga, Spain: IUCN. xii + 58 pp.
- **Gkontas, I., Papadaki, S., Trichas, A., Poulakakis, N., 2016.** First assessment on the molecular phylogeny and phylogeography of the species *Gnaptor boryi* distributed in Greece (Coleoptera: Tenebrionidae). *Mitoch. DNA Part A*, 1-8.
- **Hadjisterkotis, E., Masala, B., & Reese, D. S. (2000).** The origin and extinction of the large endemic Pleistocene mammals of Cyprus. *Biogeographia—The Journal of Integrative Biogeography*, 21(1).
- **Hudson, G. V. (1934).** *New Zealand Beetles and Their Larvae: An Elementary Introduction to the Study of Our Native Coleoptera. With Seventeen Coloured Plates.* Ferguson & Osborn, Limited.
- **Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F. (2001).** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754-755.
- **Han, T. M., Jeong, J. C., Kang, T. H., Lee, Y. B., & Park, H. C. (2010).** Phylogenetic relationships of *Dorcus koreanus* Jang and Kawai, 2008



(Coleoptera, Lucanidae): species or subspecies?. *Zoological science*, 27(4), 362-368.

- **Harvey, D. J., Gange, A. C., Hawes, C. J., Rink, M., Abdehalden, M., Al-Fulaij, N., ... & Cammaerts, R. (2011).** Bionomics and distribution of the stag beetle, *Lucanus cervus* (L) across Europe. *Insect Conservation and Diversity* 4: 23–38.
- **Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & Dewaard, J. R. (2003).** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- **Hendriks, P. (2013).** Length variation and distribution of the lesser stag beetle *Dorcus parallelipedus* (Coleoptera: Lucanidae). *entomologische berichten*, 73(2), 58-67.
- **Herrera, C. M. (2010).** The Mediterranean Region: Biological Diversity in Space and Time
- **Hosoya, T., Honda, M., & Araya, K. (2001).** Genetic variation of 16S rRNA gene observed in *Ceruchus lignarius* and *Dorcus rectus rectus* (Coleoptera: Lucanidae). *Entomological science*, 4(3), 335-344.
- **Hosoya, T., & Araya, K. (2005).** Phylogeny of Japanese stag beetles (Coleoptera: Lucanidae) inferred from 16S mtrRNA gene sequences, with reference to the evolution of sexual dimorphism of mandibles. *Zoological science*, 22(12), 1305-1318.
- **Jonsson, B. G., & Kruys, N. (2001).** Ecology of coarse woody debris in boreal forests: future research directions. *Ecological Bulletins*, (49), 279-281.
- **Kawano, K. (2004).** Developmental Stability and Adaptive Variability of Male Genitalia in Sexually Dimorphic Beetles. *The American Naturalist*, 163(1), 1–15.

- **Kim SI, Farrell BD. (2015).** Phylogeny of world stag beetles (Coleoptera: Lucanidae) reveals a Gondwanan origin of Darwin's stag beetle. *Mol Phylogenet Evol* 86:35-48.
- **Klausnitzer, B. (1995).** Die Hirschkäfer: Lucanidae (Vol. 551). Spektrum Akademischer Verlag.
- **Kornilios, P., Kyriazi, P., Poulakakis, N., Kumlutaş, Y., Ilgaz, Ç., Mylonas, M., & Lymberakis, P. (2010).** Phylogeography of the ocellated skink *Chalcides ocellatus* (Squamata, Scincidae), with the use of mtDNA sequences: A hitch-hiker's guide to the Mediterranean. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(2), 445-456.
- **Krijgsman, W., Hilgen, F. J., Raffi, I., Sierro, F. J., & Wilson, D. S. (1999).** Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature*, 400(6745), 652-655.
- **Kubota K., Nagahata Y., Ikeda H., Kubota N., Otobe H., Umetsu K. (2011)** Diversification process of stag beetles belonging to the genus *Platycerus* Geoffroy (Coleoptera: Lucanidae) in Japan based on nuclear and mitochondrial genes. *Entomological Science*, 14: 411-427.
- **Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018).** MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- **Lachat, T., Wermelinger, B., Gossner, M. M., Bussler, H., Isacson, G., & Müller, J. (2012).** Saproxyllic beetles as indicator species for dead-wood amount and temperature in European beech forests. *Ecological Indicators*, 23, 323-331.
- **Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2017).** PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 34(3), 772-773.

- **Langor, D. W., & Spence, J. R. (2006).** Arthropods as ecological indicators of sustainability in Canadian forests. *The Forestry Chronicle*, 82(3), 344-350.
- **Lin, Z. Q., Song, F., Li, T., Wu, Y. Y., & Wan, X. (2017).** New mitogenomes of two Chinese stag beetles (Coleoptera, Lucanidae) and their implications for systematics. *Journal of Insect Science*, 17(2), 63.
- **Löbl, I., & Löbl, D. (Eds.). (2016).** Scarabaeoidea–Scirtoidea–Dascilloidea–Buprestoidea–Byrrhoidea: Revised and Updated Edition. Brill.
- **Loget, N., Driessche, J. V. D., & Davy, P. (2005).** How did the Messinian salinity crisis end?. *Terra Nova*, 17(5), 414-419.
- **Lymberakis, P., & Poulakakis, N. (2010).** Three continents claiming an archipelago: the evolution of Aegean’s herpetofaunal diversity. *Diversity*, 2(2), 233-255.
- **Meulenkamp, J.E., 1985.** Aspects of the Late Cenozoic Evolution of the Aegean Region. In: Stanley, D.J., Wezel, F.C. (Eds.), *Geological evolution of the Mediterranean Basin*. Springer, New York, pp. 307-321.
- **Muona, J., Bartolozzi, L., Brustel, H., Buse, J. & Méndez, M. (2017).** *Dorcus musimon*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T157924A44185269. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-1.RLTS.T157924A44185269.en>
- **Muret, P., & Drumont, A. (1999).** Description d’une nouvelle espèce de *Dorcus Macleay*, endémique de Chypre (Coleoptera, Scarabaeoidea, Lucanidae)’. *Lambillionea*, 49, 484-488.
- **Olmstead, R. G. (1996).** *Molecular systematics* (Vol. 23). D. M. Hillis, C. Moritz, & B. K. Mable (Eds.). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- **Palombo, M. R. (2018).** Insular mammalian fauna dynamics and paleogeography: A lesson from the Western Mediterranean islands. *Integrative zoology*, 13(1), 2-20.

- **Papadopoulou, A., Anastasiou, I., & Vogler, A. P. (2010).** Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-Aegean trench calibration. *Molecular biology and evolution*, 27(7), 1659-1672.
- **Parmakelis A., Stathi I., Chatzaki M., Simaiakis S., Spanos L., Louis C., Mylonas M., (2006).** Evolution of *Mesobuthus gibbosus* (Brulle, 1832) (Scorpiones: Buthidae) in the northeastern Mediterranean region. *Mol Ecol* 15:2883–2894.
- **Paulsen, M. J. (2010).** Stag beetles of the genus *Dorcus* MacLeay in North America (Coleoptera, Lucanidae). *ZooKeys*, 34, 199.
- **Peter, B. D. (2004).** African climate change and faunal evolution during the Pliocene–Pleistocene. *Earth and Planetary Science Letters*, 220(1-2), 3-24.
- **Poulakakis, N., Kapli, P., Lymberakis, P., Trichas, A., Vardinoyiannis, K., Sfenthourakis, S., & Mylonas, M. (2015).** A review of phylogeographic analyses of animal taxa from the Aegean and surrounding regions. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 53(1), 18-32.
- **Quinto, J., Marcos-García, M. Á., Diaz-Castelazo, C., Rico-Gray, V., Brustel, H., Galante, E., & Mico, E. (2012).** Breaking down complex saproxylic communities: understanding sub-networks structure and implications to network robustness. *PLoS One*, 7(9).
- **Rambaut, A. (2006-2009).** FigTree. Tree Figure Drawing Tool. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- **Rannala, B., & Yang, Z. (1996).** Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of molecular evolution*, 43(3), 304-311.

- **Rögl, F. (1999).** Mediterranean and Paratethys palaeogeography during the Oligocene and Miocene. *Hominoid Evolution and Climatic Change in Europe*, Vol. 1: The Evolution of Neogene Terrestrial Ecosystem in Europe, 8-22.
- **Seibold, S., Bässler, C., Brandl, R., Büche, B., Szallies, A., Thorn, S., ... & Müller, J. (2016).** Microclimate and habitat heterogeneity as the major drivers of beetle diversity in dead wood. *Journal of Applied Ecology*, 53(3), 934-943.
- **Sherley, G. H., Green, C., & Owen, K. L. (1994).** Distribution, conservation status and some features of the natural history of *Dorcus* stag beetles (Coleoptera: Lucanidae). Department of Conservation.
- **Solano, E., Thomaes, A., Cox, K., Carpaneto, G. M., Cortellessa, S., Baviera, C., ... & Antonini, G. (2016).** When morphological identification meets genetic data: the case of *Lucanus cervus* and *L. tetraodon* (Coleoptera, Lucanidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 54(3), 197-205.
- **Speight, M. C. (1989).** *Saproxyllic invertebrates and their conservation*. Council of Europe.
- **Stamatakis, A. (2015).** Using RAxML to infer phylogenies. *Curr. Protoc. Bioinform.* 51: 6.14.1- 6.14.14. doi: 10.1002/0471250953.bi0614s51
- **Stokland, J., Siitonen, J., & Jonsson, B. (2012).** *Biodiversity in Dead Wood (Ecology, Biodiversity and Conservation)*. Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9781139025843
- **Stöver, B. C., & Müller, K. F. (2010).** TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC bioinformatics*, 11(1), 7.
- **Sullivan J, Joyce P. (2005).** Model Selection in Phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36:445-466.
- **Tamura, K., & Nei, M. (1993).** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10(3), 512-526.

- **Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S., (2013).** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- **Tatsuta, H., Mizota, K., & Akimoto, S. I. (2001).** Allometric patterns of heads and genitalia in the stag beetle *Lucanus maculifemoratus* (Coleoptera: Lucanidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 94(3), 462-466.
- **Trewick, S. A. (2000).** Molecular evidence for dispersal rather than vicariance as the origin of flightless insect species on the Chatham Islands, New Zealand. *Journal of Biogeography*, 27(5), 1189-1200.
- **Tsai, C. L., Wan, X., & Yeh, W. B. (2014).** Differentiation in stag beetles, *Neolucanus swinhoei* complex (Coleoptera: Lucanidae): Four major lineages caused by periodical Pleistocene glaciations and separation by a mountain range. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 78, 245-259.
- **Ulyshen, M. D., & Wagner, T. L. (2013).** Quantifying arthropod contributions to wood decay. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(4), 345-352.
- **Ulyshen, M. D., Ulyshen, M. D., & Koerner. (2018).** Saproxylic insects. Springer.
- **Yang, Z. (2006).** Computational molecular evolution. Oxford University Press,.
- **Zhang, A. B., Kubota, K., Takami, Y., Kim, J. L., Kim, J. K., & Sota, T. (2005).** Species status and phylogeography of two closely related *Coptolabrus* species (Coleoptera: Carabidae) in South Korea inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Ecology*, 14(12), 3823-3841.

## Παράρτημα Ι

Πίνακας με στοιχεία όλων των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις από τη γενετική βιβλιοθήκη Genbank. Κατά σειρά δίνονται: accession numbers για κάθε γονίδιο, το όνομα του είδους στο οποίο αντιστοιχούν οι αλληλουχίες, οι περιοχές προέλευσης των δειγμάτων από τα οποία πάρθηκαν οι αλληλουχίες, ο συγγραφέας που τις δημοσίευσε και η κωδικοποίηση που χρησιμοποιήθηκε για την αντιπροσώπευσή τους πάνω στα φυλογενετικά δέντρα.

Accession numbers					
16S	Wingless	Όνομα είδους	Περιοχή	Author	Κωδικοποίηση
KP250206.1 SK160	KP250300.1 SK160	<i>Aegus laevicollis</i>	-	Kim,S.I. and Farrell,B.D., 2015	Aeg laevicollis/Kim- Farell(2015)
KT876887.1 BMNH:1425263	-	<i>Dorcus parallepipedus</i>	United Kingdom: Adam's Pond, Richmond Park, London.	Linard,B. Et al., 2016	D.paral/Linardetal2 016/London
KP250237.1 SK157	KP250331.1 SK157	<i>Dorcus rectus</i>	-	Kim,S.I. and Farrell,B.D., 2015	D.rectus/Kim- Farell(2015)
KP250236.1 SK158	KP250330.1 SK158	<i>Dorcus parallelus</i>	-	Kim,S.I. and Farrell,B.D., 2015	D.paralellus/Kim- Farell(2015)
KP250238.1 SK146	KP250332.1 SK146	<i>Dorcus rubrofemoratus</i>	-	Kim,S.I. and Farrell,B.D., 2015	D.rubrofemoratus/ Kim-Farell(2015)
KP250240.1 SK174	KP250334.1 SK174	<i>Dorcus tityus</i>	-	Kim,S.I. and Farrell,B.D., 2015	D.tityus/Kim- Farell(2015)
KP250239.1 SK201	KP250333.1 SK201	<i>Dorcus titanus</i>	-	Kim,S.I. and Farrell,B.D., 2015	D.titanus/Kim- Farell(2015)
KP250248.1 SK229	KP250342.1 SK229	<i>Hexarthrius mandibularis</i>	-	Kim,S.I. and Farrell,B.D., 2015	Hex.mandibularis/ Kim-Farell(2015)
KP250275.1 SK238	KP250364.1 SK238	<i>Rhaetulus didieri</i>	-	Kim,S.I. and Farrell,B.D., 2015	Rha.didieri/Kim- Farell(2015)
AB178296.1	-	<i>Rhaetulus recticornis</i>	Japan:Kagoshima, Amami I.	Hosoya,T. and Araya,K., 2005	Rha.recticornis/Hos oya- Araya(2005)/Japan
-	FJ606565.1	<i>Dorcus schenklingi</i>	-	Lin,C.-P., Huang,J.- P., Lee,Y.-H. and Chen,M.-Y. (unpublished)	D.schenklingi/Lin et al

## Παράρτημα II

Κατάλογος όλων των δειγμάτων από τα οποία και εξάχθηκε γενετικό υλικό. Κατά σειρά δίνονται: ο αριθμός του δείγματος, ο κωδικός της δειγματοληψίας και ο προσωπικός κωδικός για καθένα από αυτά που έχει δοθεί από το Μουσείο Φυσικής Ιστορίας Κρήτης (NHMC), η περιοχή δειγματοληψίας, χώρα προέλευσης του δείγματος, η ανά γονίδιο συμμετοχή του κάθε δείγματος (✓) στις δύο ομάδες δεδομένων (Dataset 1, Dataset 2), που χρησιμοποιήθηκαν για τις φυλογενετικές αναλύσεις που αναφέρονται. Το όνομα του κάθε δείγματος είναι συνδυασμός της χώρας προέλευσης και των 2 τελευταίων ψηφίων του NHMC.

Sample Number	NHMC/FC CODE	Locality	Country	Species	BI/ML		BEAST
					16s	Wingless	
1	23261	Καστοριά alt:1041m,Ελλάδα Πανίδα 2018	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	✓	✓	✓
2	12824(1)	Ιωάννινα alt:800m, Ελλάδα Πανίδα 2010	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	✓	✓	✓
3	12824(2)	Ιωάννινα alt:800m, Ελλάδα Πανίδα 2010	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	✓	✓	✓
4	21351	Καρδίτσα, Ελλάδα Πανίδα 2016	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	✓	✓	✓
5	Σκουριές	Σκουριές	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	✓	✓	✓
6	Ολυμπιάδα	Ολυμπιάδα	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	✓	✓	✓
7	11599 1A	Θεσσαλία, Τρίκαλα Ελλάδα 2011	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	✓	✓	✓
8	11599 2A	Θεσσαλία, Τρίκαλα Ελλάδα 2011	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	✓	✓	✓
9	11599 3A	Θεσσαλία, Τρίκαλα Ελλάδα 2011	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	✓	✓	✓
10	11599 4A	Θεσσαλία, Τρίκαλα Ελλάδα 2011	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	✓	✓	✓
11	11599 5A	Θεσσαλία, Τρίκαλα Ελλάδα 2011	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>		✓	
12	11577 A	Ήπειρος, Ιωάννινα Γράμμος, Ελλάδα 2011	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	✓	✓	✓
13	11575 A	Ήπειρος, Ιωάννινα Γράμμος, Ελλάδα 2011	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	✓	✓	✓
14	11567 A	Μακεδονία,	Ελλάδα	<i>Dorcus</i>		✓	



		Γρεβενά, Ελλάδα 2011		<i>parallelipedus</i>			
15	11589 A	Ήπειρος, Ιωάννινα Γοργοπόταμος Γράμμος, Ελλάδα 2011	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
16	11586 A	Θεσσαλία, Ματονέρι Τρίκαλα Ελλάδα 2011	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
17	14551 A	Πελοπόννησος, Αρκαδία 2017	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
18	975 A	Μακεδονία, Δράμα 1999 (alt: 700m)	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√		
19	983 1A	Θράκη, Ξάνθη 1999 (alt:450m)	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>		√	
20	983 2A	Θράκη, Ξάνθη 1999 (alt:450m)	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
21	983 3A	Θράκη, Ξάνθη 1999 (alt:450m)	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
22	983 4A	Θράκη, Ξάνθη 1999 (alt:450m)	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
23	1a	Italy, Apulia Gargano(FG), 1050m 2019 Leg R.Papi	Ιταλία	<i>Dorcus parallileipedus</i>	√	√	√
24	1b	Italy, Apulia Gargano(FG), 1050m 2019 Leg R.Papi	Ιταλία	<i>Dorcus parallileipedus</i>	√	√	√
25	2	Turkey, 2019	Τουρκία	<i>Dorcus peyronis</i>	√	√	√
26	3a	Turkey, 2019	Τουρκία	<i>Dorcus parallileipedus</i>	√	√	√
27	3b	Turkey, 2019	Τουρκία	<i>Dorcus parallileipedus</i>	√		
28	Υάκινθος	Υάκινθος, Ρέθυμνο, Κρήτη 2018	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
29	17727	Μποριανό, Χανιά, Κρήτη 2018	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
30	21289	Λευκά Όρη, Χανιά, Κρήτη 2015	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
31	989 (1)	Ψηλορείτης, Κρήτη 1999 (alt 1350m)	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
32	989 (2)	Ψηλορείτης, Κρήτη 1999 (alt 1350m)	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>		√	
33	17740	Πετρές, Ρέθυμνο, Κρήτη 2018	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√		
34	17550 (1)	Αγιά λίμνη, Χανιά, Κρήτη 2017	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
35	17550 (2)	Αγιά λίμνη, Χανιά, Κρήτη 2017	Ελλάδα	<i>Dorcus</i>	√	√	√

		Κρήτη 2017		<i>parallelipedus</i>			
36	17241	Ομαλός Βιάννου, Ηράκλειο, Κρήτη 2015	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
37	17535	Αγιά λίμνη, Χανιά, Κρήτη 2017	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
38	21288	Λευκά Όρη, Χανιά, Κρήτη 2015 (alt 1062m)	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
39	17693	Πετρέες, Ρέθυμνο, Κρήτη 2018	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
40	4	Central Italy, 2019	Ιταλία	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
41	5	Madrid, Spain, 2019	Ισπανία	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
42	6a	North Italy, 2019	Ιταλία	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
43	6b	North Italy, 2019	Ιταλία	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
44	7a	Sardena, 2019	Ιταλία	<i>Dorcus musimon</i>	√	√	√
45	7b	Sardena, 2019	Ιταλία	<i>Dorcus musimon</i>	√	√	√
46	Μποριανά	Κυδώνι, Μποριανά, Χανιά Κρήτη 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
47	Κάστελλος (1)	Κάστελλος, Ηράκλειο Κρήτη 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
48	Κάστελλος (2)	Κάστελλος, Ηράκλειο Κρήτη 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
49	Νιάτο	Οροπέδιο Νιάτου, Ασκύφου, Χανιά Κρήτη 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
50	Λοχριά	Λοχριά, Ρέθυμνο Κρήτη 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
51	Ρούβας (1)	Ρούβας, Ηράκλειο Κρήτη 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
52	Ρούβας (2)	Ρούβας, Ηράκλειο Κρήτη 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>		√	
53	Ρούβας (3)	Ρούβας, Ηράκλειο Κρήτη 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
54	Ρούβας (4)	Ρούβας, Ηράκλειο Κρήτη 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
55	Ρούβας (5)	Ρούβας, Ηράκλειο Κρήτη 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>		√	
56	25061	Παγγαίο Όρος, Καβάλα, Μακεδονία Πανίδα 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>		√	
57	25076	Βαθύτοπος, Δράμα, Μακεδονία Πανίδα 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>		√	
58	25063	Παγγαίο Όρος, Δράμα, Μακεδονία	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>		√	

		Πανίδα 2019					
59	Υάκινθος No2	Υάκινθος, Ρέθυμνο Κρήτη, 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus peyronis</i>	√	√	√
60	Ρούβας	Ρούβας, Ηράκλειο Κρήτη 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
61	Κυδώνι	Κυδώνι, Μποριανά, Χανιά Κρήτη 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
62	Υάκινθος (1)	Υάκινθος, Ρέθυμνο Κρήτη, 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
63	Υάκινθος (2)	Υάκινθος, Ρέθυμνο Κρήτη, 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
64	Ρούβας 1 No2	Ρούβας, Ηράκλειο Κρήτη, 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
65	Ρούβας 2 No2	Ρούβας, Ηράκλειο Κρήτη, 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
66	Ρούβας 3 No2	Ρούβας, Ηράκλειο Κρήτη, 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√		
67	Υάκινθος (3)	Υάκινθος, Ρέθυμνο Κρήτη, 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
68	Υάκινθος (4)	Υάκινθος, Ρέθυμνο Κρήτη, 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
69	Υάκινθος (5)	Υάκινθος, Ρέθυμνο Κρήτη, 2019	Ελλάδα	<i>Dorcus parallelipedus</i>	√	√	√
70	8	Κέλεφος, Κύπρος, 2019	Κύπρος	<i>Dorcus alexisi</i>	√		
71	9	Κέλεφος, Κύπρος, 2019	Κύπρος	<i>Dorcus alexisi</i>	√	√	√
72	10	Κέλεφος, Κύπρος, 2019	Κύπρος	<i>Dorcus alexisi</i>	√		

### Παράρτημα III

Κατάλογος όλων των δειγμάτων από τα οποία εξάχθηκε DNA, συνοδευόμενα από την κωδικοποίηση που χρησιμοποιήθηκε για την αντιπροσώπευσή τους πάνω στα φυλογενετικά δέντρα (3<sup>η</sup> στήλη).

Sample Number	NHMC/FC CODE	Coding
1	23261	<i>D.paral/Kastoria</i>
2	12824(1)	<i>D.paral/Ioannina1</i>
3	12824(2)	<i>D.paral/Ioannina2</i>
4	21351	<i>D.paral/Karditsa</i>
5	Σκουριές	<i>D.paral/Chalkidiki1</i>
6	Ολυμπιάδα	<i>D.paral/Chalkidiki2</i>
7	11599 1A	<i>D.paral/Trikala1</i>
8	11599 2A	<i>D.paral/Trikala2</i>
9	11599 3A	<i>D.paral/Trikala3</i>
10	11599 4A	<i>D.paral/Trikala4</i>
11	11599 5A	<i>D.paral/Trikala5</i>
12	11577 A	<i>D.paral/Ioannina3</i>
13	11575 A	<i>D.paral/Ioannina4</i>
14	11567 A	<i>D.paral/Grevena</i>
15	11589 A	<i>D.paral/Ioannina5</i>
16	11586 A	<i>D.paral/Trikala6</i>
17	14551 A	<i>D.paral/Peloponnisos</i>
18	975 A	<i>D.paral/Drama1</i>
19	983 1A	<i>D.paral/Xanthi1</i>
20	983 2A	<i>D.paral/Xanthi2</i>
21	983 3A	<i>D.paral/Xanthi3</i>
22	983 4A	<i>D.paral/Xanthi4</i>
23	1a	<i>D.paral/Apulia-Italy1</i>
24	1b	<i>D.paral/Apulia-Italy2</i>

25	2	<i>D.peyronis/Turkey</i>
26	3a	<i>D.paral/Turkey1</i>
27	3b	<i>D.paral/Turkey2</i>
28	Υάκινθος	<i>D.paral/Crete-Rethymno-Yakinthos1</i>
29	17727	<i>D.paral/Crete-Chania-Kydoni1</i>
30	21289	<i>D.paral/Crete-Chania-LeukaOri1</i>
31	989 (1)	<i>D.paral/Crete-Psiloritis1</i>
32	989 (2)	<i>D.paral/Crete-Psiloritis2</i>
33	17740	<i>D.paral/Crete-Rethymno-Petres1</i>
34	17550 (1)	<i>D.paral/Crete-Chania-AgiaLake1</i>
35	17550 (2)	<i>D.paral/Crete-Chania-AgiaLake2</i>
36	17241	<i>D.paral/Crete-Heraklion-Omalos</i>
37	17535	<i>D.paral/Crete-Chania-AgiaLake3</i>
38	21288	<i>D.paral/Crete-Chania-LeukaOri2</i>
39	17693	<i>D.paral/Crete-Rethymno-Petres2</i>
40	4	<i>D.paral/Central-Italy</i>
41	5	<i>D.paral/Spain</i>
42	6a	<i>D.paral/NorthItaly1</i>
43	6b	<i>D.paral/NorthItaly2</i>
44	7a	<i>D.musimon/Sardinia1</i>
45	7b	<i>D.musimon/Sardinia2</i>
46	Μποριανά	<i>D.paral/Crete-Chania-Kydoni2</i>
47	Κάστελλος (1)	<i>D.paral/Crete-Heraklion-Kastelos1</i>
48	Κάστελλος (2)	<i>D.paral/Crete-Heraklion-Kastelos2</i>
49	Νιάτο	<i>D.paral/Crete-Chania-Niato</i>
50	Λοχριά	<i>D.paral/Crete-Rethymno-Lochria</i>
51	Ρούβας (1)	<i>D.paral/Crete-Heraklion-Rouvas1</i>

52	Ρούβας (2)	<i>D.paral/Crete-Heraklion-Rouvas2</i>
53	Ρούβας (3)	<i>D.paral/Crete-Heraklion-Rouvas3</i>
54	Ρούβας (4)	<i>D.paral/Crete-Heraklion-Rouvas4</i>
55	Ρούβας (5)	<i>D.paral/Crete-Heraklion-Rouvas5</i>
56	25061	<i>D.paral/Paggaio-Oros1</i>
57	25076	<i>D.paral/Drama2</i>
58	25063	<i>D.paral/Paggaio-Oros2</i>
59	Υάκινθος Νο2	<i>D.peyronis/Crete-Rethymno-Yakinthos</i>
60	Ρούβας	<i>D.paral/Crete-Heraklion-Rouvas6</i>
61	Κυδώνι	<i>D.paral/Crete-Chania-Kydoni3</i>
62	Υάκινθος (1)	<i>D.paral/Crete-Rethymno-Yakinthos2</i>
63	Υάκινθος (2)	<i>D.paral/Crete-Rethymno-Yakinthos3</i>
64	Ρούβας 1 Νο2	<i>D.paral/Crete-Heraklion-Rouvas7</i>
65	Ρούβας 2 Νο2	<i>D.paral/Crete-Heraklion-Rouvas8</i>
66	Ρούβας 3 Νο2	<i>D.paral/Crete-Heraklion-Rouvas9</i>
67	Υάκινθος (3)	<i>D.paral/Crete-Rethymno-Yakinthos4</i>
68	Υάκινθος (4)	<i>D.paral/Crete-Rethymno-Yakinthos5</i>
69	Υάκινθος (5)	<i>D.paral/Crete-Rethymno-Yakinthos6</i>
70	8	<i>D.alexisi/Cyprus1</i>
71	9	<i>D.alexisi/Cyprus2</i>
72	10	<i>D.alexisi/Cyprus3</i>

