

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΓΕΩΡΓΙΑ ΜΑΝΤΖΙΟΥ

Φυλογεωγραφία και πληθυσμιακή γενετική του είδους  
*Mauremys rivulata* (Chelonia: Geoemydidae)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
2006

**PhD Thesis**  
**GEORGIA MANTZIOU**

**Phylogeography and population genetics of *Mauremys rivulata***  
**(Chelonia: Geoemydidae)**

**UNIVERSITY OF CRETE**  
**DEPARTMENT OF BIOLOGY**  
**2006**

*στην οικογένεια μου...*

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Συστηματικής και Εξέλιξης του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης και υποβλήθηκε στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Η διδακτορική διατριβή εντάσσεται και χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ 01ΕΔ 424 της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας, με τίτλο: «Διαχείριση και Λειτουργία Τεχνητών Υγροτόπων με έμφαση στη Διαχείριση και Παρακολούθηση των Πληθυσμών της Νεροχελώνας *Mauremys caspica*».

#### Συμβουλευτική Επιτροπή

- Μ. Μυλωνάς (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)
- Ε. Ζούρος (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)
- Ε. Βαλάκος (Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών)

#### Εξεταστική Επιτροπή

- Μ. Μυλωνάς (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)
- Ε. Βαλάκος (Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών)
- Μ. Κεντούρη (Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης)
- Χ. Λούης (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)
- Ι. Καρακάσης (Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)
- Μ. Παυλίδης (Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)
- Σ. Σφενδουράκης (Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Πατρών)



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε κατά το μεγαλύτερο μέρος της στο Εργαστήριο Μοριακής Συστηματικής και Εξέλιξης του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης και υποβλήθηκε στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Την επίβλεψη της διατριβής είχε ο Καθηγητής του Πανεπιστημίου Κρήτης Μωυσής Μυλωνάς. Επιβλέποντες και πολύτιμοι καθοδηγητές στην διατριβή αυτή ήταν επίσης ο Καθηγητής του Πανεπιστημίου Κρήτης Ελευθέριος Ζούρος και ο Επίκουρος Καθηγητής του Πανεπιστημίου των Αθηνών Ευστράτιος Βαλάκος. Μικρό μέρος της διατριβής εκπονήθηκε στο Πανεπιστήμιο του Yale στο εργαστήριο "Molecular Systematics and Conservation Genetics Laboratory" υπό την επίβλεψη της Dr. Gisella Caccone και της Dr. Theodora Pinou. Ένα μέρος επίσης της διατριβής εκπονήθηκε στο Μουσείο Φυσικής Ιστορίας (NMNH) του Ινστιτούτου Smithsonian υπό την επίβλεψη του Dr. Kevin de Queiroz.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή μου Μωυσή Μυλωνά, ο οποίος υπήρξε καθοδηγητής και υποστηρικτής μου καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την κατανόησή και συμπάραστάσή του τις δύσκολες ώρες, για τις ωραίες στιγμές στις πολλές εκδρομές πεδίου και για τον ενθουσιασμό που μεταδίδει σε όσους δουλεύουν μαζί του. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον δεύτερο επιβλέποντά μου Καθηγητή Ελευθέριο Ζούρο για τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια της διατριβής και τον χρόνο που μου αφιέρωσε. Τον τρίτο μου επιβλέποντα Ευστράτιο Βαλάκο ευχαριστώ θερμά για την υποστήριξή του, την καθοδήγηση σε θέματα της διατριβής, για την διευκόλυνση στη συλλογή της βιβλιογραφίας μου, αλλά και για τις εποικοδομητικές μας συζητήσεις σε θέματα επιστημονικά και μη.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, την καθηγήτρια Μ. Κεντούρη, τον καθηγητή Χ. Λούη, τον αναπληρωτή καθηγητή Ι. Καρακάση, και τους επίκουρους καθηγητές Σ. Σφενδουράκη και Μ. Παυλίδη. Με τις παρατηρήσεις και τα σχόλιά τους συνέβαλαν αισθητά στην βελτίωση του παρόντος κειμένου. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω θερμά την Χαρά Ζαφειροπούλου-Σφακιανάκη, την Βάνα Μακράκη και την Ελευθερία Λαρεντζάκη για την πολύτιμη βοήθειά τους και την άμεση ανταπόκρισή τους σε οποιοδήποτε ζήτημα προέκυψε κατά τη διάρκεια της διατριβής.

Την Dr. Theodora Pinou, τότε ερευνήτρια στο Πανεπιστήμιο του Yale και τώρα Επίκουρος Καθηγήτρια στο πανεπιστήμιο Western Connecticut State, ευχαριστώ για την καλή συνεργασία μας και τις συμβουλές της τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Χωρίς την βοήθειά της δεν θα ήταν δυνατή η μετάβασή μου στο Πανεπιστήμιο του

Yale. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω και την Ανα Orfanoudaki για την βοήθεια και προσφορά της καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο Yale και την Dr. Gisella Cascone του Πανεπιστημίου του Yale για την φιλοξενία στο εργαστήριο της.

Τον Dr. Kevin de Queiroz, ευχαριστώ θερμά για το ότι έκανε δυνατή την μετακίνηση μου στο Μουσείο Φυσικής Ιστορίας του Ινστιτούτου Smithsonian στην Ουάσιγκτον για έξι μήνες. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την καθοδήγηση σε θεωρητικά και πρακτικά θέματα της διατριβής μου, για τα σεμινάρια, τις συζητήσεις μας και τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε. Χωρίς αυτόν πολλά θα ήταν διαφορετικά και του είμαι υπόχρεη γι' αυτό. Επίσης θα πρέπει να ευχαριστήσω τον Dr. George Zug και τον Dr. Karl Ernst από το NMNH του Ινστιτούτου Smithsonian, που μοιράστηκαν μαζί μου την μοναδική και πολύχρονη εμπειρία τους στο χώρο των ερπετών. Τον Dr. Lee Weight και τον Jeff Hunt από το Εργαστήριο Αναλυτικής Βιολογίας του Ινστιτούτου Smithsonian, για την προθυμία τους, την φιλοξενία τους στο εργαστήριο και για την πολύτιμη βοήθειά τους στην επίλυση τεχνικών θεμάτων.

Χρωστώ την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στον πιστό φίλο και συνεργάτη όλα αυτά τα χρόνια, στον έφορο συλλογών των σπονδυλωτών του Μ.Φ.Ι.Κ. Πέτρο Λυμπεράκη. Τον ευχαριστώ θερμά για τα ατέλειωτες ώρες συζητήσεων, για την υποστήριξή του, για την βοήθειά του στις δειγματοληψίες (πολλές από αυτές θα ήταν αδύνατες χωρίς την συνεισφορά του), για τις ιδέες του, για την συντροφιά του, την υπομονή του και πάνω απ' όλα για το ότι ήταν και είναι πάντα εκεί σε ότι χρειαστώ.

Τους πολύ καλούς φίλους και συνεργάτες Νίκο Πουλακάκη, Σίλια Αντωνίου, Άρη Παρμακέλη, πρέπει επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα. Χωρίς την πολύτιμη βοήθειά τους σε επιστημονικά θέματα όλα θα ήταν πολύ πιο δύσκολα. Τους ευχαριστώ θερμά επίσης για την συμπαράστασή τους σε προσωπικά μου θέματα, την συντροφιά τους, τις συζητήσεις μας, την βοήθειά τους σε δειγματοληψίες και γενικά για την άμεση ανταπόκρισή τους σε οποιαδήποτε έκκληση για βοήθεια (προσωπική ή επιστημονική). Έχοντας τέτοιους φίλους και συνεργάτες δίπλα μου όλα ήταν πολύ πιο ευχάριστα.

Στους καλούς φίλους και συνεργάτες Μανώλη Παπαδημητράκη και Βασίλη Τσαμπουράκη χρωστώ ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη για τις ατέλειωτες ώρες που πέρασαν στο πεδίο μαζί μου, και για την βοήθειά τους στην καταγραφή και στον χειρισμό των ζώων. Τους οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την συντροφιά τους, το χιούμορ τους και την υπομονή τους.

Οι καλοί φίλοι και συνεργάτες Κατερίνα Βαρδινογιάννη, Milica Inonic, Vladimir Inonic, Μανώλης Νικολακάκης, Γιώτα Σαλεμή, Αντώνης Μαγουλάς, Γιώργος Κωτούλας, Κώστας Τσιγκενόπουλος, Γιώργος Γουλιέλμος, Μαρία Δραμουντάνη, Μιχάλης Δρετάκης,

Αλεξάνδρα Καββαδία, Μίνα Τρική και Στέλλα Βούρου, με βοήθησαν πολύ, ο καθένας με τον τρόπο του, για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής και γι' αυτό τους ευχαριστώ πάρα πολύ.

Η δειγματοληψία των χελωνών δεν είναι εύκολη υπόθεση και ακόμη πιο δύσκολο είναι να βρεις ανθρώπους να σε συντροφεύσουν και να σε βοηθήσουν σε μια τέτοια «επιχείρηση». Όμως εγώ στάθηκα τυχερή και είχα πολλούς ανθρώπους που κατά καιρούς ήρθαν μαζί μου στις δειγματοληψίες, μου κράτησαν συντροφιά ή μου έφεραν δείγματα. Ιδιαίτερες λοιπόν ευχαριστίες για την βοήθεια στις δειγματοληψίες και όχι μόνο, θα ήθελα να απευθύνω στους εξής φίλους και συνεργάτες: Δημήτρη Πουρσανίδη, Θεόδωρο Ναζιρίδη, Σίμο Δημητρόπουλο, Παναγιώτη Γεωργιακάκη, Γεωργία Μανδάλου, Stephen Roberts, Κοσμούλα Γαλανάκη, Ιάσμη Στάθη.

Χρωστώ ένα ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης που αποτέλεσαν όλα αυτά τα χρόνια πολύτιμους φίλους και συνεργάτες. Με την έμπρακτη βοήθειά τους σε επιστημονικά θέματα, αλλά και με το γέλιο και την συμπαράστασή τους έκαναν τη πορεία μου ευκολότερη και πιο ευχάριστη.

Ευχαριστώ την Ιωάννα Λιαδάκη για τη βοήθειά της σε γραφιστικά θέματα καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής και για την υποστήριξή της στις δύσκολες ώρες, και την Αλίκη Καρούσου και τη Jelena Radonic για την συντροφιά και συμπαράσταση κατά τη διάρκεια συγγραφής της διατριβής.

Για τις φίλες μου Μαρία Χατζάκη, Γιούλη Κυριαζή, Πασχαλιά Καπλή ένα ευχαριστώ είναι λίγο... Στάθηκαν δίπλα μου σε όλη αυτή τη δύσκολη πορεία και η καθεμία με τον τρόπο της βοήθησε σημαντικά στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Δεν έχω λόγια να ευχαριστήσω τον σύντροφο της ζωής μου Nicholas Hogg, που με εμπυχώνει σε κάθε μου βήμα και μου προσφέρει απλόχερα αγάπη και χαρά. Τον ευχαριστώ ολόψυχα για την υπομονή του και την συμπαράστασή του.

Τέλος θα ήθελα να κλείσω αναφέροντας τους ανθρώπους στους οποίους χρωστώ περισσότερα από ότι σε οποιονδήποτε άλλο. Τους γονείς μου... Χωρίς αυτούς τίποτα απ' όλα αυτά δεν θα ήταν εφικτό. Τους υπερευχαριστώ για την αμέριστη συμπαράσταση σε όλα τα επίπεδα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>I-VIII</b>
<b>Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> - ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1</b>
1.1 Γενικά για τις χελώνες	1
1.2 Κατανομή και φυλογένεση των χελωνών της οικογένειας Geomydidae	3
1.3 Το γένος <i>Mauremys</i> (Gray, 1870)	6
1.4 Το είδος <i>Mauremys rivulata</i> (Valenciennes, 1833)	9
1.4.1 Περιγραφή	9
1.4.2 Ενδιαίτημα	10
1.4.3 Διατροφή	11
1.4.4 Αναπαραγωγή	12
1.5 Παλαιοντολογικά στοιχεία	12
1.6 Παλαιογεωγραφία - παλαιοκλιματολογία της ανατολικής Μεσογείου	13
1.7 Φυλογεωγραφία	20
1.8 Πληθυσμιακή γενετική	24
1.9 Μελέτη οικολογικών στοιχείων	28
1.9.1 Διαχείριση του <i>M. rivulata</i>	29
1.9.2 Βιολογικός καθαρισμός Πόμπιας	30
1.9.3 Ραδιοτηλεμετρία	31
1.10 Στόχος και περίγραμμα της παρούσας διατριβής	32
<b>Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>34</b>
2.1 Συλλογή δειγμάτων	34
2.2 Πληθυσμοί μελέτης	37
2.3 Εργαστηριακές αναλύσεις	37
2.3.1 Εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA	38
2.3.2 Μιτοχονδριακά γονίδια	39
<u>2.3.2.1 Πολλαπλασιασμός των μιτοχονδριακών γονιδίων μέσω</u> <u>της PCR</u>	39

<u>2.3.2.2 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των προϊόντων της PCR</u>	40
<u>2.3.2.3 Στοιχισή αλληλουχιών</u>	40
<u>2.3.2.4 Φυλογενετική ανάλυση</u>	41
<u>2.3.2.4.1 Ανεξάρτητη ή συνδυασμένη ανάλυση</u>	41
<u>2.3.2.4.2 Έλεγχος ποιότητας φυλογενετικού σήματος και ομοπλασίας</u>	41
<u>2.3.2.4.3 Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων</u>	43
<u>2.3.2.4.4 Επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου εξέλιξης</u>	44
<u>2.3.2.4.5 Μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης και στατιστικός έλεγχος των παραγόμενων δέντρων</u>	45
<u>2.3.2.4.6 Έλεγχος της ομοιογένειας του εξελικτικού ρυθμού</u>	47
<u>2.3.2.4.7 Συσχέτιση της γενετικής διαφοροποίησης με τη γεωγραφική απόσταση των πληθυσμών</u>	48
<u>2.3.3 Μικροδορυφορικοί δείκτες</u>	48
<u>2.3.3.1 Ανάπτυξη βιβλιοθήκης μικροδορυφορικών δεικτών για το είδος <i>M. rivulata</i></u>	48
<u>2.3.3.2 Έλεγχος Πολυμορφισμού</u>	51
<u>2.3.3.3 Πολλαπλασιασμός των μικροδορυφορικών αλληλουχιών μέσω της μεθόδου PCR</u>	51
<u>2.3.3.4 Οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων και προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων της PCR</u>	53
<u>2.3.3.5 Στατιστική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων</u>	53
<b>2.4 Μελέτη του τεχνητού υγρότοπου - βιολογικού καθαρισμού της Πόμπιας</b>	56
2.4.1 Ανάλυση μακροπανίδας	57
2.4.2 Εκτίμηση μεγέθους του πληθυσμού	58
<b>2.5 Μελέτη της δραστηριότητας του <i>M. rivulata</i> με χρήση ραδιοτηλεμετρίας</b>	58

<b>Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup> - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>62</b>
<b>3.1 Μοριακοί δείκτες</b>	<b>62</b>
3.1.1 <i>Μιτοχονδριακά γονίδια</i>	62
<u>3.1.1.1 Νουκλεοτιδική σύσταση και έλεγχος ομοπλασίας</u>	62
<u>3.1.1.1.1 Κυτόχρωμα β</u>	62
<u>3.1.1.1.2 Περιοχή ελέγχου</u>	67
<u>3.1.1.2 Ανεξάρτητη ή συνδυασμένη ανάλυση</u>	70
<u>3.1.1.3 Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων</u>	72
<u>3.1.1.4 Συσχέτιση της γενετικής διαφοροποίησης με τη γεωγραφική απόσταση των πληθυσμών</u>	74
<u>3.1.1.5 Φυλογενετική ανάλυση</u>	75
<u>3.1.1.6 Έλεγχος του ρυθμού εξέλιξης των αλληλουχιών</u>	83
<u>3.1.1.7 Εκτίμηση χρόνων απόκλισης</u>	84
3.1.2 <i>Μικροδορυφορικοί δείκτες</i>	84
<u>3.1.2.1 Απομόνωση μικροδορυφορικών τόπων και έλεγχος πολυμορφισμού</u>	84
<u>3.1.2.2 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων</u>	86
<u>3.1.2.2.1 Ομαδοποίηση δεδομένων</u>	86
<u>3.1.2.2.2 Στατιστική και πληθυσμιακή ανάλυση</u>	88
<b>3.2 Μελέτη του τεχνητού υγρότοπου-βιολογικού καθαρισμού της Πόμπιας</b>	<b>108</b>
3.2.1 <i>Ανάλυση μακροπανίδας</i>	108
3.2.2 <i>Εκτίμηση μεγέθους του πληθυσμού</i>	110
<b>3.3 Μελέτη της δραστηριότητας της <i>M. rivulata</i> με χρήση ραδιοτηλεμετρίας</b>	<b>111</b>
<b>Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup> - ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>115</b>
<b>4.1 Φυλογενετικές σχέσεις και παλαιοντολογικά δεδομένα</b>	<b>115</b>
<b>4.2 Ενδοειδικές σχέσεις</b>	<b>121</b>
4.2.1 <i>Μιτοχονδριακό DNA</i>	121
4.2.2 <i>Μικροδορυφορικοί δείκτες</i>	125

---

4.2.3 Οικολογικά στοιχεία	132
<u>4.2.3.1 Επίπεδα ρύπανσης, λειτουργία του βιολογικού καθαρισμού και κατάσταση του πληθυσμού του <i>M. rivulata</i></u>	132
<u>4.2.3.2 Ραδιοτηλεμετρική παρακολούθηση</u>	135
4.2.4 Φυλογεωγραφικό σενάριο για τους πληθυσμούς του είδους <i>M. rivulata</i>	137
4.2.5 Επιπτώσεις στη διαχείριση πληθυσμών	144
<b>Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup> - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>149</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι - Κατάλογος δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη</b>	<b>181</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ - Γενετικές αποστάσεις K2P μεταξύ των απλοτύπων για το <i>cyt b</i> και την D-loop</b>	<b>189</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ - Δημοσιεύσεις που σχετίζονται με την διδακτορική διατριβή</b>	<b>192</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γενετική δομή των σύγχρονων ειδών και πληθυσμών διαμορφώνεται τόσο από ιστορικούς βιογεωγραφικούς παράγοντες όσο και από τη σύγχρονη οικολογία και ηθολογία των υπό μελέτη οργανισμών. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε μια ολιστική προσέγγιση ώστε να μελετηθεί η φυλογεωγραφία και η πληθυσμιακή γενετική του είδους *Mauremys rivulata* και οι σχέσεις του με τα άλλα δυο μεσογειακά είδη του γένους.

Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις με βάση το mtDNA συγκλίνουν σε μία κοινή τοπολογία του γονιδιακού δέντρου για τα τρία μεσογειακά είδη του γένους *Mauremys*. Βάσει των ειδών που χρησιμοποιήθηκαν ως παρασώμαδες και τα τρία είδη αποτελούν ένα μονοφυλετικό κλάδο. Το *M. rivulata* αποτελεί έναν καλά διαχωρισμένο μονοφυλετικό κλάδο με υψηλή στατιστική υποστήριξη. Το ίδιο ισχύει και για τα άλλα δυο μεσογειακά είδη του γένους.

Ο πρώτος κλάδος που αποχωρίστηκε από τον κοινό πρόγονο είναι αυτός που οδήγησε στο σύγχρονο *M. leprosa*, κατά το Μέσο Μειόκαινο (11-15 εκ. χρ. πριν από σήμερα). Στη συνέχεια στο Ανώτερο Μειόκαινο (6-8 εκ. χρ. πριν) έγινε η διάσπαση του *M. caspica* από το *M. rivulata*.

Διάφορα φυσικά ή κλιματικά φράγματα αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που καθορίζουν την κατανομή και τη γενετική δομή των χελωνών. Στην περίπτωση του *M. rivulata* στο Αιγαίο και στα παράλια της ανατολικής Μεσογείου, φαίνεται ότι τα φράγματα είναι κυρίως κλιματικά παρά φυσικά. Επίσης η παρουσία του ανθρώπου φαίνεται ότι επηρέασε σε κάποιες περιπτώσεις την κατανομή των χελωνών. Η ερμηνεία του φυλογεωγραφικού προτύπου σε μια περιοχή που τόσο έντονα έχει δεχτεί γεωλογικές και κλιματικές αλλαγές αλλά και ανθρωπογενείς παρεμβάσεις, είναι αινιγματική και δύσκολη.

Στην περίπτωση του *M. rivulata*, με βάση αλληλουχίες του mtDNA, η ενδοειδική γενετική διαφοροποίηση είναι πολύ μικρή, φαινόμενο πολύ συχνό σε πολλά είδη χελωνών. Το γενικό φυλογεωγραφικό πρότυπο που προκύπτει για το είδος *M. rivulata*, φαίνεται να αντιστοιχεί στην κατηγορία V των προτύπων που αναφέρει ο Avise (2000). Αυτό το πρότυπο χαρακτηρίζεται



από κοινούς απλοτύπους που έχουν ευρεία κατανομή και από κοντινούς σε αυτούς απλοτύπους που είναι ενδημικοί σε μια περιοχή. Το πρότυπο αυτό υποδηλώνει χαμηλή έως μέτρια σύγχρονη γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών, οι οποίοι όμως ιστορικά είναι πολύ στενά συνδεδεμένοι.

Για να προσεγγιστούν περισσότερο οι ενδοειδικές σχέσεις των πληθυσμών του *M. rivulata*, χρησιμοποιήθηκαν οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες, οι οποίες προσφέρουν πολύ μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα. Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες που απομονώθηκαν και αναλύθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής αποδείχτηκαν πολύ σημαντικοί μοριακοί σημαντές.

Όλες οι αναλύσεις συγκλίνουν στην έντονη διαφοροποίηση των πληθυσμών της Κύπρου και της Ιορδανίας από τους υπόλοιπους πληθυσμούς. Επίσης από τις περισσότερες αναλύσεις είναι εμφανής η στενότερη σχέση των δυο προαναφερόμενων πληθυσμών μεταξύ τους. Οι πληθυσμοί της Κρήτης ομαδοποιούνται όλοι μαζί, με εξαίρεση τον πληθυσμό της Γεωργιούπολης-Κουρνά που ομαδοποιείται με την Πελοπόννησο και τα Δωδεκάνησα. Επίσης, ο πληθυσμός της Γαύδου είναι αξιοσημείωτα διακριτός παρόλο που ομαδοποιείται με τους πληθυσμούς της Κρήτης.

Από τη προκαταρκτική μελέτη του πληθυσμού του βιολογικού καθαρισμού της Πόμπιας προέκυψαν σημαντικά στοιχεία τόσο για την ανθεκτικότητα των χελωνών όσο και για την κατάσταση του υγροτόπου αυτού και τη διαχειριστική του αξία. Φάνηκε ότι πρόκειται για έναν υγιή φαινομενικά πληθυσμό ο οποίος όμως χρήζει παρακολούθησης σε διάρκεια χρόνου. Η ζεύξη του βιολογικού καθαρισμού με σύστημα δεξαμενών που λειτουργούν ως βιότοποι υπερέχει σαφώς συστημάτων που απλώς παροχετεύουν το νερό (ασχέτως τελικής καθαρότητας) σε παρακείμενα υδάτινα συστήματα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματά από το mtDNA και τις μικροδορυφορικές αλληλουχίες, τα διαθέσιμα παλαιοντολογικά στοιχεία, την παλαιογεωγραφία και παλαιοκλιματολογία της ανατολικής Μεσογείου και σε

σχέση με στοιχεία της οικολογίας και της ηθολογίας του *M. rivulata* μπορούμε να διατυπώσουμε την παρακάτω πιθανή εξελικτική υπόθεση:

Η σημερινή κατανομή και πληθυσμιακή γενετική του είδους έχει επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό από τις κλιματικές αλλαγές που επικράτησαν κατά το Πλειστόκαινο. Οι ψυχρές περιόδους είχαν ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση των πληθυσμών του προς τα νότια και τα ανατολικά. Η μίξη των πληθυσμών διευκολύνθηκε από τους εύκολα προσπελάσιμους θαλάσσιους διαδρόμους που εμφανίστηκαν επανειλημμένα κατά το Πλειόκαινο και Πλειστόκαινο και από τη μεγάλη ικανότητα διασποράς του.

Η μίξη και ανακατάταξη των πληθυσμών συνεχίστηκε και στο Πλειστόκαινο και το Ολόκαινο λόγω των έντονων κλιματικών αλλαγών και των ανθρωπογενών επιδράσεων. Η στρωματοποίηση των νερών της Μεσογείου που έλαβε χώρα αρκετές φορές κατά το Πλειστόκαινο αλλά και κατά το Ολόκαινο, έπαιξε σημαντικό ρόλο στη διασπορά και τη μίξη των πληθυσμών του *M. rivulata*. Οι αναλύσεις των μικροδορυφορικών τόπων, αναδεικνύουν τα διαφορετικά κέντρα διασποράς και μίξης των χελωνών. Έτσι η Κύπρος ομαδοποιείται με την Ιορδανία, ενώ τα Δωδεκάνησα παραμένουν διαφοροποιημένα και δεν επηρεάζονται από τις μετακινήσεις των ζώων της απώτερης νοτιοανατολικής Μεσογείου. Η Πελοπόννησος, η Αττική, η Κερκίνη και η Λέσβος φαίνεται ότι παρουσιάζουν μέτρια έως μεγάλη διαφοροποίηση, αλλά η Μπείσειανή ανάλυση δεν κατάφερε να διακρίνει διαφορετικές ομάδες πληθυσμών. Είναι πιθανό λοιπόν να είχαμε μίξη πληθυσμών σε όλη την περιοχή αυτή λόγω της στρωματοποίησης των νερών, η οποία προς τα βόρεια ενισχύεται και από την εισροή νερών από τη Μαύρη Θάλασσα.

Υπάρχει ένα πληροφοριακό κενό λόγω έλλειψης στοιχείων από τα παράλια της Τουρκίας. Η ανάλυση δειγμάτων από την Τουρκία ίσως μας δώσει νέα στοιχεία.

Η περίπτωση του πληθυσμού Γεωργιούπολης-Κουρνά που ομαδοποιείται με την Πελοπόννησο και τα Δωδεκάνησα, δεν μπορεί να εξηγηθεί με το σενάριο της στρωματοποίησης και μόνο. Αν ήταν αυτή η

περίπτωση τότε θα αναμέναμε και άλλοι πληθυσμοί της Κρήτης να ομαδοποιούνταν με τις προαναφερόμενες περιοχές. Η παρατηρούμενη διαφοροποίηση του πληθυσμού Γεωργιούπολης-Κουρνά ίσως οφείλεται σε ιστορικούς παράγοντες που έχουν να κάνουν με τις δραστηριότητες του ανθρώπου στη λίμνη Κουρνά, που είναι η μόνη φυσική λίμνη στην Κρήτη. Η σε μεγαλύτερο βάθος διερεύνηση του συγκεκριμένου πληθυσμού ίσως δώσει περισσότερα στοιχεία για το μη αναμενόμενο αυτό αποτέλεσμα. Σε επίπεδο Κρήτης είναι πιθανό μετακινήσεις ζώων να διευκολύνθηκαν από τα κανάλια απορροής λυμάτων κάθε χωριού κατά την αρχαιότητα. Ιδιαίτερα κατά τους καλοκαιρινούς μήνες που τα επιφανειακά νερά στην Κρήτη είναι πολύ πιο περιορισμένα δεν είναι απίθανο οι χελώνες να χρησιμοποιούσαν τα κανάλια απορροής ώστε να μετακινηθούν προς κάποιο πιο μεγάλο εναπομείναντα ποταμό ή υγρότοπο.

Το *M. rivulata* περιλαμβάνεται στον κόκκινο κατάλογο της IUCN (2006) ως «ελάχιστου ενδιαφέροντος», στον οποίο και αναφέρεται ότι το είδος δεν κινδυνεύει άμεσα να εξαφανιστεί. Όμως δίνεται έμφαση στη διατήρηση και προστασία των περιφερειακών και νησιωτικών πληθυσμών του είδους. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των μικροδορυφορικών τόπων υποστηρίζουν την οδηγία αυτή αφού πολλοί πληθυσμοί είναι γενετικά διακριτοί (Ιορδανία, Κύπρος, Δωδεκάνησα, Κρήτη, Ηπειρωτική Ελλάδα). Γενετικά διαφοροποιημένοι φάνηκε να είναι και οι περιφερειακοί πληθυσμοί, όπως αυτός της Γαύδου, οι οποίοι χρήζουν ιδιαίτερης διαχειριστικής προσοχής αφού πρόκειται συνήθως για μικρούς, απομονωμένους πληθυσμούς, που εντοπίζονται σε ευαίσθητους βιοτόπους.

Καταλήγοντας, φαινόμενα διασποράς και όχι βικαριανιστικά γεγονότα είναι οι παράγοντες που επηρέασαν το φυλογεωγραφικό πρότυπο και την πληθυσμιακή δομή του είδους *M. rivulata*.

## ABSTRACT

The genetic structure of extant species is shaped by historical biogeographic factors, as well as from contemporary ecologies and behaviors of the studied taxa. In the present study a holistic approach was used to investigate the phylogeography and population genetics of *Mauremys rivulata* and its relationships with the two other Mediterranean *Mauremys* species.

The phylogenetic analyses based on the mtDNA converge to the same topology for the three Mediterranean *Mauremys* species, supporting its monophyly. *M. rivulata* haplotypes constitute a well defined monophyletic clade with high statistical support. The same is true for the other two Mediterranean species.

The first to separate from the common ancestor is the clade leading to the extant *M. leprosa*. This separation took place in the Middle Miocene (11-15 my ago), whereas the separation between *M. caspica* and *M. rivulata* took place during the Upper Miocene (6-8 my ago).

Several physical and climatic barriers constitute important factors that influence the distribution and genetic structure of turtle populations. In the case of *M. rivulata* populations, it seems that the barriers are mainly climatic. In addition, in some cases human influence is evident.

The interpretation of a phylogeographic pattern is puzzling in the Mediterranean area that has experienced great human influence and important geological and climatic changes.

Based on mtDNA sequences, the intraspecific differentiation for *M. rivulata* is very small, a quite common case in many turtle species. The phylogeographic pattern for the species seems to be reflected in category V of the patterns described by Avise (2000). This pattern is characterized by low or modest contemporary gene flow between populations that are connected tightly in history. It involves common haplotypes that are widespread in addition to closely related haplotypes that are confined to specific localities.

The intraspecific relationships of *M. rivulata* are more closely examined with the use of microsatellite markers. The loci that are isolated in the frame of this thesis prove to be important molecular markers.

All the analyses of the microsatellite loci revealed close affinity between the populations from Cyprus and Jordan and large differentiation from the populations studied in Greece. Cretan populations are grouped together with the exception of the Kournas-Georgioupoli population with groups together with Peloponissos and Dodekanissa. The population from the island of Gavdos is grouped together with the rest of Cretan populations but is notably distinct.

The preliminary study of the population of *M. rivulata* inhabiting the biological treatment plant in Pompia revealed information about the resistance of the turtles, as well as the importance of such wetlands and its value for the conservation biology of the species. The population in Pompia seems to be healthy, but it needs monitoring over time to assure that loss of genetic diversity will not take place.

Taking under consideration the results from the mtDNA and the microsatellite loci, all the available paleontological data, the paleogeography and paleoclimatology of the east Mediterranean and in combination with the ecology and ethology of *M. rivulata*, we can suggest the following evolutionary hypothesis:

The present distribution and population genetics of *M. rivulata* has been influenced greatly from the climatic changes that prevailed during the Pleistocene. The cold periods resulted in a latitudinal shift of the populations towards the south and east. The mixing was facilitated by the easily accessible marine straits, which appeared in the Aegean area repeatedly during Pliocene and Pleistocene, and the great dispersal capacity of *M. rivulata* through coastal corridors. The rearrangements of the populations continued during the Pleistocene and Holocene due to the severe climatic changes and human impact. The stratification of the Mediterranean water which took place several times during Pleistocene and Holocene played an important role in the

dispersal and mixing of *M. rivulata* populations. The microsatellite loci analyses indicate the different distribution cores of the turtles. Thus, Cyprus is grouped together with Jordan, whereas Dodekanissa remain differentiated and do not seem influenced by the shifting of turtles in the further south-east Mediterranean. Peloponissos, Attiki, Kerkini and Lesvos, exhibit modest to great differentiation, but the Bayesian approach was not able to define different population clusters. Thus it is possible that a mixing of the populations in this area took place because of the existence of a fresh water (or low salinity) layer on the surface of the Aegean Sea. This layer, during the interglacial periods, was probably reinforced by the meltwater drained through the rivers into the Black Sea and into the Aegean Sea.

There is a gap in our information due to a lack of data from Turkey. Including samples from Turkey may provide additional information.

The case of the Kournas-Georgioupoli population that is clustered together with Peloponissos and Dodekanissa cannot be explained via the stratification hypothesis alone. If this was the case we would expect other Cretan populations to be clustered together with the previously mentioned populations. The observed pattern could be due to historical factors that are related to the long presence of humans around Kournas Lake, the only natural lake in Crete situated on the north-western part of the island. An in depth examination of the particular population may give some insight on this unexpected result. On the scale of Crete, it is possible that the translocations of turtles were facilitated by the sewage canals of each village during antiquity. Especially during the summer months when the surface waters of Crete are very restricted, it is possible that the turtles made use of the canals in order to move towards existing rivers or wetlands.

*M. rivulata* is listed in the red list of IUCN as a “Least Concern” species. It is mentioned that the species is not facing any danger for immediate extinction. But special emphasis is given in the conservation and protection of island populations. Our microsatellite loci results support this directive as they revealed many genetically distinct population clusters (Jordan, Cyprus,

Dodekanissa, Crete, Mainland Greece). Peripheral island populations as the population of Gavdos are genetically distinct and require special conservation measures, since they are usually small, isolated and restricted in fragile wetlands.

In conclusion, dispersal processes and not vicariant events are responsible for shaping the phylogeography and population structure of *M. rivulata*.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Γενικά για τις χελώνες

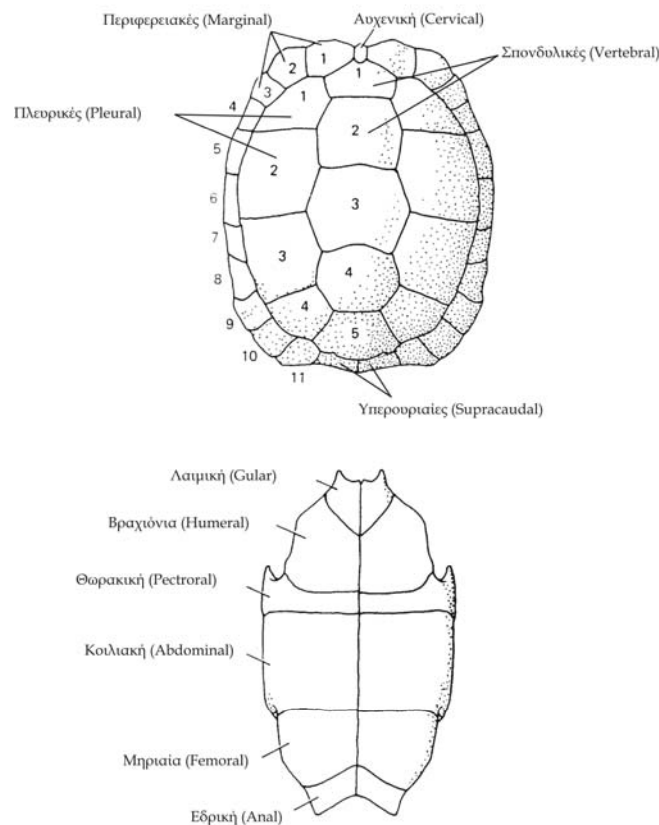
Οι χελώνες (Τάξη: Chelonia) ανήκουν στην ομοταξία των Ερπετών, μια μεγάλη ομάδα που εμφανίστηκε στα μέσα περίπου της Λιθανθρακοφόρου περιόδου (~ 320 εκ. χρόνια πριν). Τα Χελώνια είναι η μοναδική αρτίγονη τάξη των Αναψιδωτών ερπετών. Κάποια από τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά τα τοποθετούν κοντά με τα πρώτα Αμνιωτά στα τέλη του Παλαιοζωικού, αλλά από την άλλη πλευρά, τα Χελώνια είναι τόσο εξειδικευμένα ώστε δεν είναι δυνατόν να βρεθούν ενδιάμεσοι χαρακτήρες που να τα συνδέουν με άλλα Σπονδυλωτά (Rough *et al.*, 1989).

Οι χελώνες κατάφεραν να βρουν έναν επιτυχή τρόπο διαβίωσης στο Τριαδικό (~ 230 εκ. χρόνια πριν) και από τότε εξελίχθηκαν ελάχιστα. Το κλειδί για την επιτυχία τους, για τη μειωμένη ποικιλομορφία τους, αλλά και αυτό που κάνει τα ζώα αυτά μοναδικά και εύκολα αναγνωρίσιμα είναι το χέλυο (καβούκι) (Ernst & Barbour, 1989; Rough *et al.*, 1989). Το χέλυο αποτελείται από δυο κύρια τμήματα, το ραχιαίο (θυρεός ή καβούκι) και το κοιλιακό (επιστήθιο ή πλάστρο) (**εικόνα 1.1**). Τα δύο τμήματα ενώνονται σε κάθε πλευρά με μια συνδετική γέφυρα (Rough *et al.*, 1989). Το καβούκι τους αποτελείται από δερμικά οστά που αναπτύσσονται σε 59 ξεχωριστά κέντρα οστεοποίησης (Rough *et al.*, 1989). Τα οστά του καβουκιού καλύπτονται από κεράτινες πλάκες (φολίδες) επιδερμικής προέλευσης, οι οποίες δεν συμπίπτουν σε αριθμό και θέση με τα δερμικά οστά.

Οι χελώνες ζουν στη χέρσο, στη θάλασσα και στα γλυκά νερά. Οι χερσαίες χελώνες έχουν σχετικά σφαιρικό καβούκι, ενώ οι χελώνες των γλυκών νερών έχουν νωτοκοιλιακώς πεπλατυσμένο καβούκι, που τους προσφέρει μικρή αντίσταση κατά την κίνησή τους μέσα στο νερό, και τα δάχτυλά τους είναι ενωμένα με μεμβράνη (Storer *et al.*, 1979; Rough *et al.*, 1989). Στις θαλάσσιες χελώνες τα πόδια έχουν μετατραπεί σε πτερύγια (Rough *et al.*, 1989). Σήμερα υπάρχουν 225 είδη ζώντων χελωνών που κατατάσσονται σε 12 οικογένειες και δυο υποτάξεις: τα Πλευρόδαιρα (Pleurodira) και τα



Κρυπτόδαιρα (Cryptodira). Τα Κρυπτόδαιρα εμφανίστηκαν κατά την Ιουρασική περίοδο και μέχρι την αρχή της Κρητιδικής περιόδου αποτελούσαν την κυρίαρχη ομάδα χελωνών (Ernst & Barbour, 1989). Είναι οι μόνες χελώνες που βρίσκουμε στο Βόρειο Ημισφαίριο. Όσον αφορά το Νότιο Ημισφαίριο, υπάρχουν υδρόβια και χερσαία Κρυπτόδαιρα στη Νότια Αμερική και χερσαία μόνο στην Αφρική, ενώ απουσιάζουν παντελώς από την Αυστραλία. Τα Πλευρόδαιρα, που εμφανίστηκαν κατά την Κρητιδική περίοδο, περιορίζονται σήμερα μόνο στο Νότιο Ημισφαίριο, παρόλο που κατά τα τέλη του Μεσοζωικού και τις αρχές του Καινοζωικού είχαν παγκόσμια κατανομή (Ernst & Barbour, 1989; Rough *et al.*, 1989).



**Εικόνα 1.1.** Στοιχεία του χελύου των χελωνών (τροποποιημένο από Rough *et al.*, 1989).

## 1.2 Κατανομή και φυλογένεση των χελωνών της οικογένειας Geoemydidae

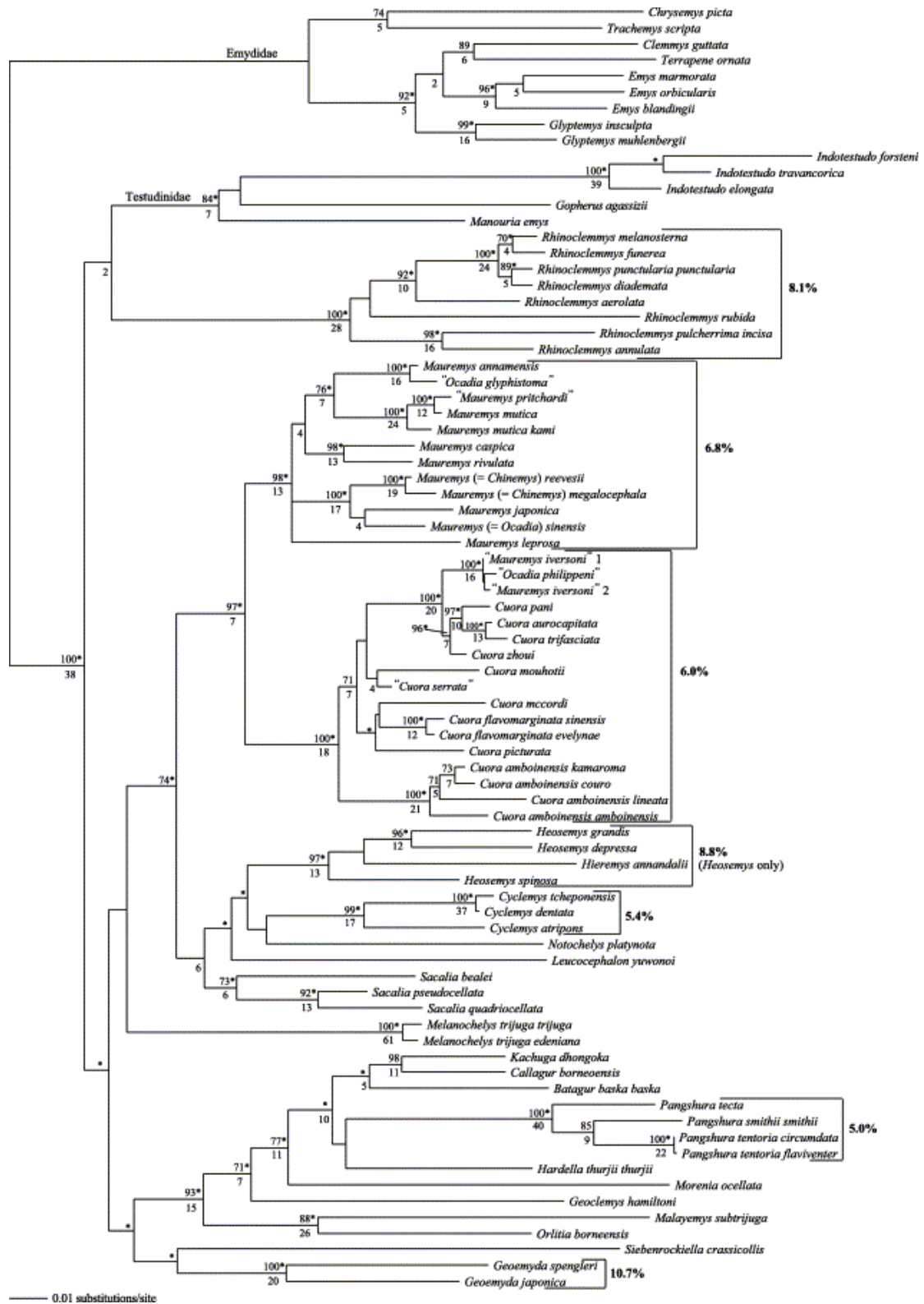
Η οικογένεια Geoemydidae αποτελείται από 23 γένη και περίπου 73 είδη (Sprinks *et al.*, 2004). Είναι η μεγαλύτερη οικογένεια χελωνών στον κόσμο και περιλαμβάνει το 25% της συνολικής ποικιλότητας χελωνών σε επίπεδο είδους (Iverson, 1992).

Οι χελώνες της οικογένειας αυτής είναι κυρίως υδρόβιες (γλυκών νερών) και ημι-υδρόβιες. Κατανέμονται από την Ευρώπη και τη βόρεια Αφρική, την Ινδία και τη Νότια Ρωσία έως την Ινδονησία και τις Φιλιππίνες. Πολύ συχνά αναφέρονται ως «υδρόβιες χελώνες του Παλαιού Κόσμου», όμως υπάρχει ένα γένος, το *Rhinoclemmys*, που κατανέμεται στο Νέο Κόσμο (Μεξικό, Δημοκρατία του Ισημερινού, Βενεζουέλα και Βραζιλία) (Ernst & Barbour, 1989; Iverson, 1992).

Η οικογένεια περιλαμβάνει ένα δυσανάλογα μεγάλο αριθμό κινδυνευόντων και απειλούμενων ειδών. Σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση για τη Διατήρηση της Φύσης και των Φυσικών Πόρων (IUCN, International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources), 12 από τα 16 είδη χελωνών που είναι κρισιμώς κινδυνεύοντα (critically endangered) ανήκουν στην οικογένεια Geoemydidae. Επίσης 14 από τα 30 κινδυνεύοντα είδη και 9 από τα 37 τρωτά ανήκουν στην οικογένεια αυτή.

Πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να μελετήσουν την οικογένεια Geoemydidae με βάση μορφολογικά (McDowell, 1964; Bramble, 1974; Gaffney & Meylan, 1988) και χρωμοσωματικά (Bickham, 1975; Carr & Bickham, 1986) χαρακτηριστικά, αλλοένζυμα (Sites *et al.*, 1984), μοριακά δεδομένα (Honda *et al.*, 2002a; Honda *et al.*, 2002b; Barth *et al.*, 2003; Barth *et al.*, 2004; Feldman & Parham, 2004; Sprinks *et al.*, 2004; Stuart & Parham, 2004) και συνδυασμό των παραπάνω (Hirayama, 1984; Yasukawa *et al.*, 2001), αλλά παρόλα αυτά οι φυλογενετικές και ταξινομικές σχέσεις μέσα στην οικογένεια παραμένουν αβέβαιες. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι μέχρι πρόσφατα οι μελέτες δεν περιλάμβαναν αρκετά ευρύ φάσμα δειγμάτων και κατάλληλων εξωομάδων ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τις

ενδο-οικογενειακές σχέσεις. Επίσης, για πολλά από τα είδη υπάρχει στοιχειώδης έλλειψη γνώσεων όσον αφορά την κατανομή και την οικολογία των φυσικών πληθυσμών (Ernst & Barbour, 1989). Τέλος το γεγονός ότι έχουν παρατηρηθεί υβρίδια μεταξύ ειδών ή ακόμα και διαφορετικών γενών της οικογένειας (Parham *et al.*, 2001; Stuart & Parham, 2004) δημιουργεί μεγάλη σύγχυση στην προσπάθεια να διαλευκανθούν τα όρια και η ταξινομική κατάσταση πολλών μορφών (Feldman & Parham, 2004; Spinks *et al.*, 2004). Μέχρι στιγμής η δουλειά των Spinks *et al.* (2004) είναι η πιο ολοκληρωμένη καθώς εξετάζει τη μοριακή φυλογένεση ολόκληρης σχεδόν της οικογένειας με βάση δυο μιτοχονδριακά γονίδια και το ιντρόνιο ενός πυρηνικού γονιδίου. Στην **εικόνα 1.2** παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο στο οποίο κατέληξε η προαναφερόμενη εργασία.



Εικόνα 1.2. Δέντρο μέγιστης πιθανοφάνειας βάσει των συνδυασμένων αλληλουχιών mtDNA / R35 για είδη της οικογένειας Geoemydidae (από Spinks *et al.*, 2004).

### 1.3 Το γένος *Mauremys* (Gray, 1870)

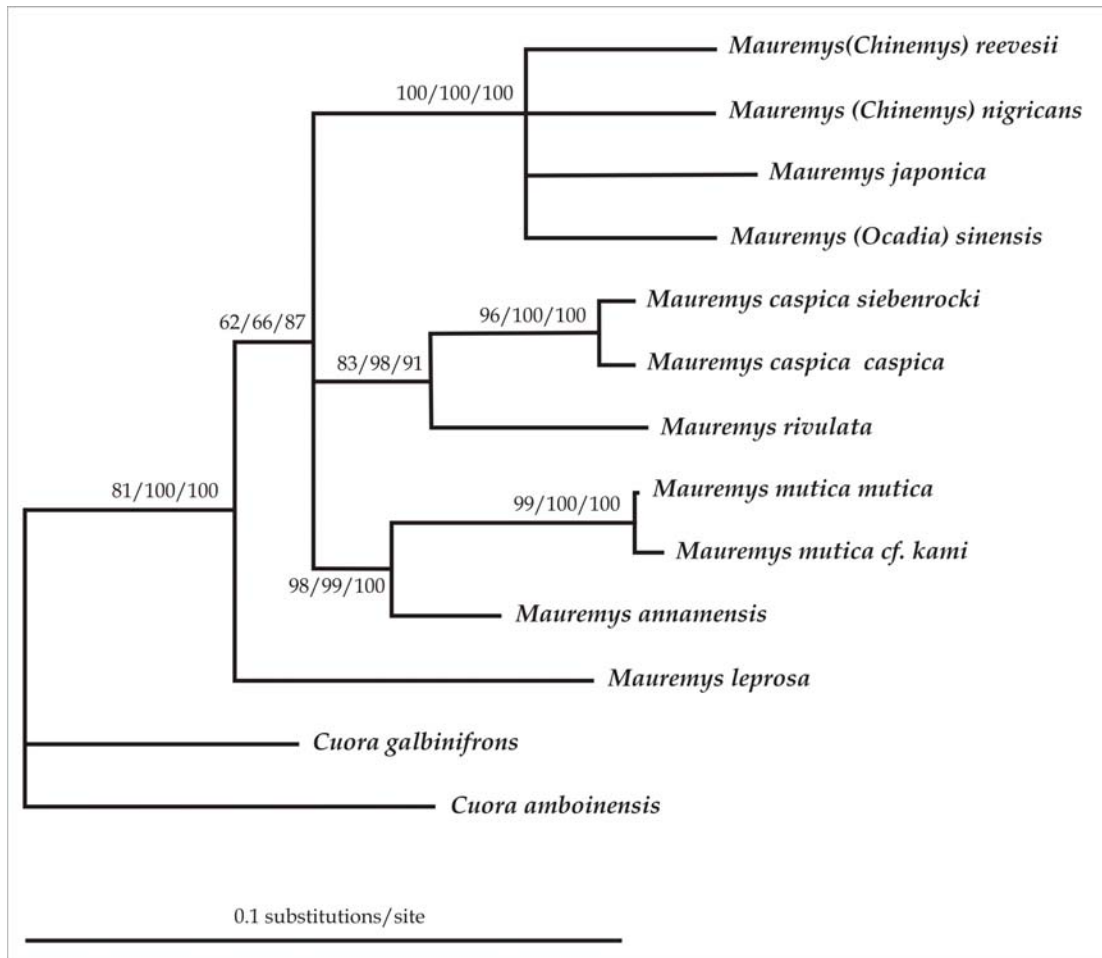
Το γένος *Mauremys* αποτελείται από είδη τα οποία χαρακτηρίζονται από άκαμπο πλάστρο και γραμμώσεις στο κεφάλι και στο λαιμό, και είναι αρκετά συντηρητικά από μορφολογική και οικολογική σκοπιά (Feldman & Parham, 2004). Είναι ημι-υδρόβιες χελώνες που καταλαμβάνουν τρεχούμενα και στάσιμα νερά τόσο σε δασωμένες όσο και σε ξηρές περιοχές στην Ασία και τη Μεσόγειο. Το γένος περιλαμβάνει κάποια από τα εμπορικώς σημαντικότερα είδη στην Ασία. Η υπερβολική συλλογή των ζώων αυτών στην Ασία για τροφή και ιατρικές χρήσεις έχει οδηγήσει πολλά είδη στο χαρακτηρισμό τους ως κρισίμως κινδυνεύοντα. Επίσης το γεγονός ότι στις «φάρμες» χελωνών κρατούνται πολλά διαφορετικά είδη μαζί στην ίδια δεξαμενή, έχει οδηγήσει σε δημιουργία υβριδίων που καταλήγουν στην αγορά και περιγράφονται ως διαφορετικά είδη (Parham *et al.*, 2001; Spinks *et al.*, 2004).

Παρόλο που έχουν γίνει πάρα πολλές μελέτες για το γένος *Mauremys*, η συστηματική του εξακολουθεί να είναι προβληματική. Το γένος αποτελείται από έξι (Barth *et al.*, 2004; Fritz, 2001) έως εννέα (Feldman & Parham, 2004) είδη, από τα οποία τρία είναι μεσογειακά και τα υπόλοιπα κατανέμονται στην ανατολική Ασία. Τα τρία μεσογειακά είδη είναι το *Mauremys leprosa* (Schweigger, 1812), το *M. rivulata* (Valenciennes, 1833) και το *M. caspica* (Gmelin, 1774). Το *M. leprosa* κατανέμεται στην Ιβηρική Χερσόνησο, τη νότια Γαλλία και τη δυτική βόρεια Αφρική, από το Μαρόκο έως τη βόρειο-δυτική Λιβύη (Keller & Busack, 2001). Το *M. rivulata* κατανέμεται στην Κροατία, τη Σερβία και Μαυροβούνιο, την Αλβανία, τη Βουλγαρία, την Ελλάδα, την Κύπρο, το Λίβανο, την Ιορδανία, την Παλαιστίνη, το Ισραήλ και τα μεσογειακά παράλια της Τουρκίας και της Συρίας (Wischuf & Busack, 2001). Η κατανομή του *M. caspica* ξεκινάει από την κεντρική Ανατολία στην Τουρκία και συνεχίζει, μέσω της Γεωργίας και της Αρμενίας, προς τα δυτικά και νότια παράλια της Κασπίας θάλασσας, τη νότια Ρωσία, το Αζερμπαϊτζάν, το Ιράν, το Ιράκ, το Τουρκμενιστάν, τη Συρία και καταλήγει στα νότια του Περσικού κόλπου περιλαμβάνοντας και το Μπαχρέιν και τη Σαουδική

Αραβία (Fritz & Wischuf, 1997; Wischuf & Fritz; 2001). Όσον αφορά τα είδη της ανατολικής Ασίας έχουμε το *M. mutica* που κατανέμεται στο Βιετνάμ, τη νότια Κίνα και τα ιαπωνικά νησιά Ryukyu. Το *M. japonica* εξαπλώνεται στην Ιαπωνία, ενώ η κατανομή του είδους *M. annamensis* περιορίζεται μόνο στο Βιετνάμ. Δυο νέα είδη που περιγράφηκαν στις αρχές του 1990 αποδείχτηκε τελικά ότι ήταν υβριδικές μορφές. Πρόκειται για το «είδος» *M. iversoni* Pritchard & McCord, 1991 που αποδείχτηκε ότι αποτελεί υβρίδιο μεταξύ *M. mutica* και *Cuora trifasciata* (Parham et al., 2001; Wink et al., 2001) και για το «είδος» *M. pritchardi* McCord, 1997 που αποτελεί υβρίδιο μεταξύ *M. mutica* και *Chinemys reevesii* (Wink et al., 2001). Τέλος, σύμφωνα με τους Feldman & Parham (2004) και Spinks et al. (2004) το γένος *Mauremys* πρέπει να διευρυνθεί ώστε να περιλάβει και τα γένη *Ocadia* (μονοτυπικό) και *Chinemys*. Πρόκειται για τα είδη: *Mauremys (Ocadia) sinensis* (Β. Βιετνάμ, Ν. Κίνα, Ταϊβάν), *Mauremys (Chinemys) reevesii* (Ιαπωνία, Κορέα, Ταϊβάν και Κίνα) και *Mauremys (Chinemys) nigricans* (Β. Βιετνάμ, Ν. Κίνα, Ταϊβάν). Σύμφωνα με τους προαναφερόμενους συγγραφείς, τα *M. japonica*, *O. sinensis*, *C. reevesii* και *C. nigricans* σχηματίζουν ένα μονοφυλετικό κλάδο. Στα ίδια συμπεράσματα καταλήγουν και άλλοι συγγραφείς (Barth et al., 2004) χωρίς όμως να παίρνουν ξεκάθαρη στάση για τη διεύρυνση του γένους *Mauremys*.

Ενώ μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι τα μεσογειακά είδη σχετίζονται πιο στενά μεταξύ τους απ' ό,τι με τα είδη της ανατολικής Ασίας (Iverson & McCord, 1994; McCord, 1997; Fritz; 2001), τα αποτελέσματα των τελευταίων μοριακών μελετών διαφωνούν με το σενάριο αυτό, υποστηρίζοντας ότι το *M. leprosa* είναι το βασικό κλαδί στο γένος *Mauremys* (συμπεριλαμβανομένων και των *Ocadia* και *Chinemys*) (Barth et al., 2004) **(εικόνα 1.3)**. Οι Barth et al. (2004) αναγνωρίζουν τέσσερις βασικές φυλογενετικές γραμμές μέσα στο γένος: **1.** *M. japonica*, *M. sinensis*, *M. reevesii* και *M. nigricans*, **2.** *M. annamensis* και *M. mutica*, **3.** *M. rivulata* και *M. caspica*, **4.** *M. leprosa*. Τελικά καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι το *M. leprosa* αποτελεί πιθανώς την πιο παλαιά (αρχαία) φυλογενετική γραμμή και ότι η διάσπασή της έγινε πολύ πριν από τη διάσπαση των άλλων γραμμών. Οι Spinks et al. (2004) δεν μπόρεσαν να

προσδιορίσουν με ακρίβεια τη θέση του *M. leprosa* σε σχέση με τα υπόλοιπα τάξα. Τέλος, στη μελέτη των Feldman & Parham (2004) τα *M. leprosa* και *M. caspica* αποτελούν έναν κλάδο, με το *M. rivulata* να είναι το πιο βασικό κλαδί στο γένος, χωρίς όμως αυτό να έχει επαρκή στατιστική στήριξη.



**Εικόνα 1.3.** Δέντρο Μέγιστης Πιθανοφάνειας (ML) μεταξύ των ειδών του γένους *Mauremys* με βάση αλληλουχίες του *cyt b*. Το ίδιο δέντρο ανακτήθηκε και με τις μεθόδους Μπείσειανής Ανάλυσης (BI) και Σύνδεσης Γειτόνων (NJ). Οι αριθμοί πάνω στους κλάδους αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap της ML, στις εκ των υστέρων πιθανότητες της BI και στις τιμές bootstrap της NJ, αντίστοιχα. Τροποποιημένο από Barth *et al.* (2004).

#### 1.4 Το είδος *Mauremys rivulata* (Valenciennes, 1833)

Το είδος *Mauremys rivulata*, που αποτελεί και τον οργανισμό μελέτης της παρούσας διατριβής, είναι πολύ λίγο έως καθόλου μελετημένο στη χώρα μας. Μια πλήρης επισκόπηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας όσον αφορά την κατανομή του είδους στον ελλαδικό χώρο, καθώς και μια προκαταρκτική οικολογική μελέτη έγιναν κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής (Μάντζιου, 2000).

##### 1.4.1 Περιγραφή

Ο ραχιαίος θυρεός του χελύου του *M. rivulata* αποτελείται από πέντε σπονδυλικές πλάκες (vertebral), 4 πλευρικές σε κάθε πλευρά (pleural), 11 περιφερειακές σε κάθε πλευρά (marginal), 1 αυχενική (cervical) και 2 υπερουριαίες (supracaudal). Στο πλάστρο, ή επιστήθιο, έχει δύο λαιμικές (Gular), δυο βραχιόνιες (Humeral), δυο θωρακικές (Pectoral), δυο κοιλιακές (Abdominal), δυο μηριαίες (Femoral) και δυο εδρικές (Anal) πλάκες. Το *M. rivulata* έχει καφέ-λαδί έως λαδί-πράσινο χρώμα και το μήκος του καβουκιού του φτάνει περίπου τα 240mm (Wischuf & Busack, 2001; Rifai & Arm, 2004), με τα θηλυκά να είναι συνήθως μεγαλύτερα από τα αρσενικά. Τα νεαρά άτομα έχουν συχνά καφετί χρώμα με κόκκινα ή κιτρινωπά σχέδια. Το καβούκι είναι πεπλατυσμένο και το ζώο φέρει έντονες κίτρινες γραμμώσεις στο λαιμό. Η ένωση του πλάστρου με το καβούκι γίνεται με τη γέφυρα στην οποία προσαρτάται μια βουβωνική πλάκα σε κάθε πλευρά (Arnold & Burton, 1985). Τα αρσενικά ζώα έχουν πιο πεπλατυσμένο καβούκι από τα θηλυκά και το μήκος της ουράς τους είναι μεγαλύτερο. Το προ-αμαριαίο μήκος ουράς είναι επίσης πολύ μεγαλύτερο στα αρσενικά άτομα, αφού η αμάρα (κλοάκη) τους είναι τοποθετημένη πιο κοντά στο ακραίο τμήμα της ουράς, και είναι βασικό χαρακτηριστικό για το διαχωρισμό των δυο φύλων (Tok, 1999; Μάντζιου, 2000; Rifai & Arm, 2004). Η ανατομική αυτή διαφορά υφίσταται για τη διευκόλυνση της αναπαραγωγικής διαδικασίας και ισχύει σε πολλά είδη υδρόβιων χελωνών.



Μέχρι πρόσφατα το *M. rivulata* θεωρούνταν υποείδος του *M. caspica*, μέχρι που οι Fritz & Wischuf (1997) το περιέγραψαν ως ξεχωριστό είδος με βάση μορφολογικά στοιχεία και χρωματικά πρότυπα στο χέλυο. Η αναγωγή σε επίπεδο είδους επιβεβαιώθηκε και από μοριακά δεδομένα στη συνέχεια (Barth *et al.*, 2004; Feldman & Parham, 2004; Mantziou *et al.*, 2004; Spinks *et al.*, 2004). Τα χρωματικά πρότυπα που ξεχωρίζουν το *M. rivulata* από το *M. caspica* περιγράφονται παρακάτω (Fritz & Wischuf, 1997). Στα νεαρά άτομα υπάρχουν σε όλο το καβούκι πολύ ανοιχτόχρωμες δικτυωτές γραμμές που δεν περιορίζονται σε μια πλάκα, αλλά διασχίζουν τις ραφές και φτάνουν έως τις περιφερειακές πλάκες. Στα νεαρά άτομα επίσης, το πλάστρο είναι πολύ σκούρο έως μαύρο. Η γέφυρα είναι σκούρα έως μαύρη σε όλα τα άτομα. Στις υποπεριφερειακές πλάκες υπάρχουν σκούρες κηλίδες που βρίσκονται πάνω στις ραφές μεταξύ δυο πλακών. Στο πάνω μέρος του κεφαλιού διακρίνονται ξεκάθαρα στα νεαρά άτομα ανοιχτόχρωμα δικτυωτά σχέδια. Στο ρύγχος μπορεί να υπάρχουν δυο λεπτές ανοιχτόχρωμες γραμμές, ενώ οι κίτρινες γραμμώσεις του λαιμού αρχίζουν να διαλύονται στην κροταφική περιοχή και δεν φτάνουν στο μάτι. Στο πίσω μέρος του πίσω ποδιού πολύ σπάνια υπάρχουν κάθετες γραμμές και αν υπάρχουν είναι διαλυμένες σε κηλίδες.

#### 1.4.2 Ενδιαίτημα

Το *M. rivulata* ζει σε ποικιλία ενδιαιτημάτων από χείμαρρους έως λίμνες, λιμνοθάλασσες, αλυκές, φράγματα, αρδευτικά κανάλια, βάλτους και νερόλακκους. Δείχνει βέβαια ιδιαίτερη προτίμηση στα λιμνάζοντα ύδατα ή στα τρεχούμενα ύδατα με χαμηλό ρυθμό ροής (Gasith & Sidis, 1983; Arnold & Burton, 1985; Sidis & Gasith, 1985). Όταν ζει σε τρεχούμενα νερά κινείται με μεγάλη ευκολία αντίθετα στη φορά του ρεύματος (Μάντζιου, 2000), όπως άλλωστε έχει παρατηρηθεί και για συγγενικά του είδη (Meek, 1987). Οι χελώνες του γένους *Mauremys* είναι πολύ ανθεκτικές σε διάφορες συνθήκες ποιότητας των υδάτων. Έχουν παρατηρηθεί σε όξινα, αλκαλικά και υφάλμυρα ύδατα, ακόμη και σε πολύ ρυπασμένα ύδατα (Gasith & Sidis, 1983; Sidis & Gasith, 1985; Clark, 1996).

Οι χελώνες που ζουν σε ενδιαιτήματα που είναι εποχικά και αποξηραίνονται το καλοκαίρι πέφτουν σε θερινή νάρκη ώστε να αποφύγουν τις υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσονται την περίοδο αυτή. Επίσης σε κάποιες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί μετανάστευση σε άλλες μάζες νερού κατά τη διάρκεια μιας ξηρής περιόδου (Rifai & Arm, 2004). Στα βορειότερα όρια εξάπλωσής τους οι χελώνες του γένους *Mauremys* πέφτουν σε χειμερία νάρκη (Arnold & Burton, 1985; Engelmann, 1993).

Οι χελώνες *M. rivulata* είναι ζώα ημερόβια και περνούν μεγάλο μέρος της ζωής τους πάνω σε βράχια ή καλάμια στην όχθη όπου εκτίθενται στον ήλιο (Gasith & Sidis, 1985; Engelmann, 1993; Rifai & Mantziou, 2005). Είναι ένα είδος δύσκολα παρατηρήσιμο, αφού μόλις ενοχληθεί ή αντιληφθεί ανθρώπινη παρουσία, βουτάει στο νερό και θάβεται στη λάσπη του υποστρώματος ή ανάμεσα σε υδρόβια φυτά. Οι Busack & Ernst (1980) υποστηρίζουν ότι το *M. rivulata* ζει σε Μεσο- και Θερμομεσογειακές περιοχές, που χαρακτηρίζονται από 0 έως 175 φυσιολογικώς ξηρές μέρες το χρόνο. Σε θερμοκρασίες άνω των 36°C τα ζώα παρατηρούνται να κολυμπάνε κάτω από την επιφάνεια του νερού, βγάζοντας μόνο το κεφάλι τους έξω κατά διαστήματα, ώστε να αποφύγουν την υπερθέρμανση (Rifai & Arm, 2004).

#### 1.4.3 Διατροφή

Η *M. rivulata* τρέφεται όλο το χρόνο, αλλά η ένταση τροφοληψίας διαφέρει από χειμώνα σε καλοκαίρι, με πτώση της το χειμώνα. Η χαμηλότερη θερμοκρασία στην οποία έχει παρατηρηθεί στο Ισραήλ να λαμβάνει τροφή είναι 13° C. Η υψηλότερη θερμοκρασία στην οποία παρατηρήθηκαν χελώνες να τρώνε είναι 30,5° C (Sidis & Gasith, 1985). Σε θερμοκρασίες άνω των 36°C τα ζώα κολυμπάνε κάτω από την επιφάνεια του νερού, βγάζοντας μόνο το κεφάλι τους έξω κατά διαστήματα, ώστε να αποφύγουν την υπερθέρμανση (Rifai & Arm, 2004).

Η τροφή της *M. rivulata* αποτελείται από φύκια, προνόμφες εντόμων, γαιοσκώληκες, μικρά αμφίβια, γυρίνους, ψάρια, φυτική τροφή, ψοφίμια και τρίμματα οργανικής ύλης. Είναι, γενικά, ευκαιριακά παμφάγος οργανισμός,

αλλά όσο μεγαλώνουν τα μικρά σε ηλικία άτομα γίνονται όλο και πιο χορτοφάγα. Βέβαια και τα ενήλικα και τα νεαρά άτομα προτιμούν τη ζωική τροφή όταν αυτή είναι διαθέσιμη (Sidis & Gasith, 1985; Μάντζιου, 2000; Rifai & Arm, 2006).

#### 1.4.4 Αναπαραγωγή

Για το είδος *M. rivulata* η αναλογία αρσενικών - θηλυκών ατόμων παρατηρήθηκε ότι είναι πολύ κοντά στο 1:1 (Wischuf & Busack, 2001; Rifai & Arm, 2004). Σε εύκρατα κλίματα αναπαραγωγική δραστηριότητα έχει καταγραφεί συνεχώς από το φθινόπωρο έως την άνοιξη, με τη μέγιστη δραστηριότητα να καταγράφεται τους μήνες Ιανουάριο και Φεβρουάριο (Gasith & Sidis, 1985; Sidis & Gasith, 1988). Γεννάνε 4 - 10 αυγά από το Μάιο έως τον Ιούλιο και η διάρκεια επώασης είναι από 7 - 11 εβδομάδες (Gasperetti *et al.*, 1993; Rifai & Mantziou, 2005). Τα αυγά θάβονται στο έδαφος σχετικά κοντά στο νερό και καλύπτονται με λάσπη που το ίδιο ζώο φτιάχνει χρησιμοποιώντας τα ούρα του και χώμα. Πιθανώς γεννάνε 2 - 3 φορές το χρόνο, γεγονός που εξαρτάται κυρίως από τις κλιματικές συνθήκες (Μάντζιου, 2000; Rifai & Mantziou, 2005).

#### 1.5 Παλαιοντολογικά στοιχεία

Η οικογένεια Geomydidae εμφανίζεται κατά το Ηώκαινο ή και νωρίτερα. Είναι πιθανό η παλαιοκαινική "Emydidae" που περιγράφεται από την Κίνα να ανήκει ουσιαστικά στα Geomydidae (Fritz, 2001). Το γένος *Mauremys* είναι γνωστό στη Δυτική Παλαιαρκτική από το Ολιγόκαινο (Fritz, 2001) ή ακόμα και από το κατώτερο Ηώκαινο κατά άλλους ερευνητές (Bergounioux, 1955; Melentis, 1966). Πριν από το Πλειστόκαινο ήταν ευρέως εξαπλωμένο στην Ευρώπη, τη Βόρεια Αφρική και την Αραβική Χερσόνησο. Σύμφωνα με τον Bergounioux (1955) υπάρχουν τρεις παράλληλες εξελικτικές γραμμές στη Δυτική Παλαιαρκτική: (1) η γραμμή του *M. italica* που ξεκινάει το Ηώκαινο με τα είδη *M. italica* και *M. vidali* και τερματίζει μέσα στο Ολιγόκαινο με το *M. chainei*, (2) η γραμμή του *M. sophiae* που αποτελείται από

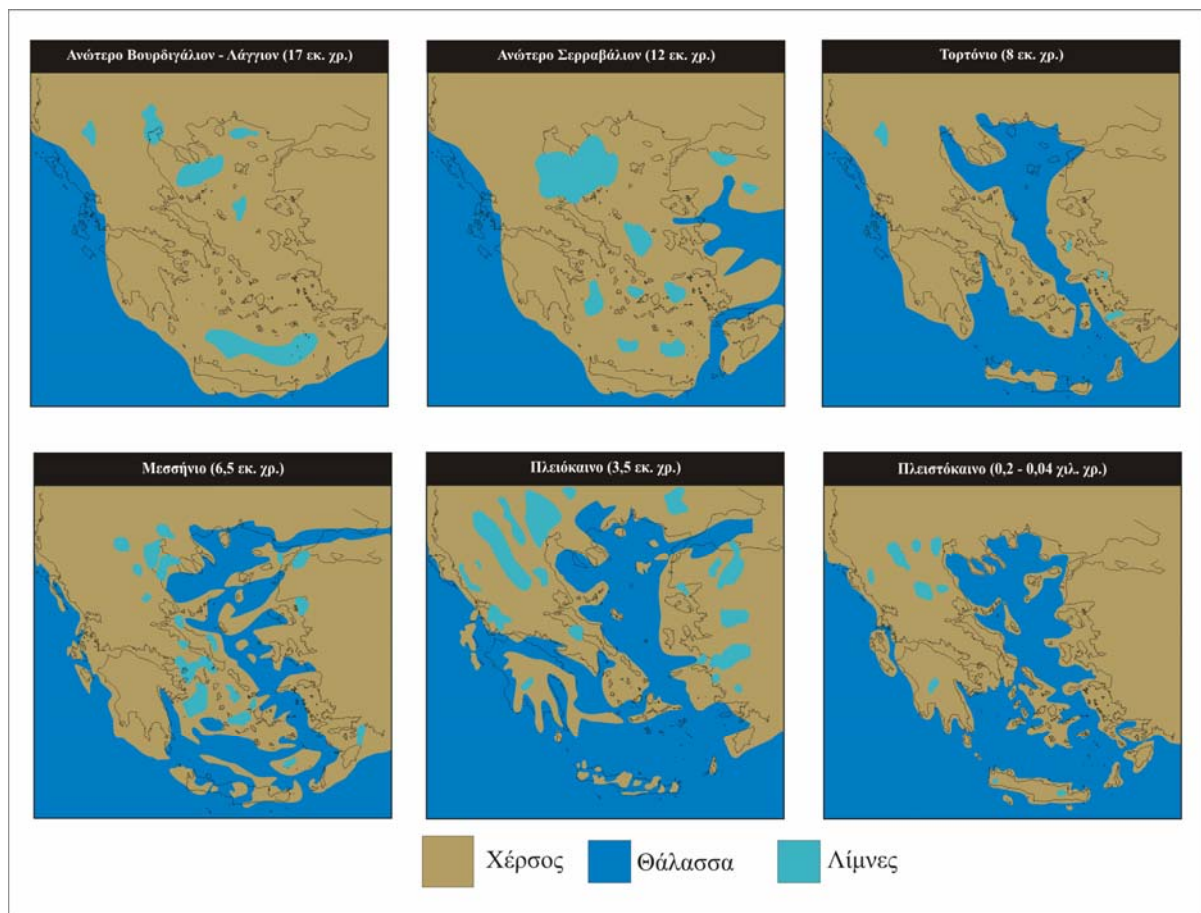
το ολιγοκαινικό *M. batalleri*, συνεχίζεται στο Μειόκαινο με τα *M. batalleri* και *M. sophiae* και τελικά τερματίζει στο Πλειόκαινο με το τελευταίο, (3) η γραμμή του *M. pygolopha*, η οποία ξεκινάει με το *M. subpyrenaica* στο Ολιγόκαινο, συνεχίζει με τα *M. rotundiformis* και *M. pygolopha* στο Μειόκαινο και τα *M. romani* και *M. gaudi* στο Πλειόκαινο. Ο Broin (1977) θεωρεί ότι τα *M. romani* και *M. gaudi* είναι συνώνυμα. Στην τρίτη αυτή εξελικτική γραμμή ανήκουν επίσης τα μειοκαινικά *M. steinheimensis* (Melentis, 1966) και *M. sarmatica*, που θεωρείται άμεσος πρόγονος του πλειοκαινικού *M. gaudi* (Kotsakis, 1980). Τα απολιθώματα που είναι πιο συγγενικά με τα σύγχρονα είδη του γένους *Mauremys* ανήκουν στην τρίτη εξελικτική γραμμή (Melentis, 1966; Kotsakis, 1980).

## 1.6 Παλαιογεωγραφία - παλαιοκλιματολογία της ανατολικής Μεσογείου

Η γεωδυναμική εξέλιξη της Μεσογείου καθορίστηκε κατά μεγάλο βαθμό από τη σύγκλιση της Ευρασιατικής και Αφρικανικής πλάκας. Η συνολική σύγκλιση μπορεί να εκτιμηθεί σε 400-500 km στα δυτικά, ενώ στα ανατολικά φτάνει μέχρι και τα 1500 km. Η σύγκλιση αυτή έδωσε γένεση στις Άλπεις αλλά και στο κλείσιμο της Τηθύος θάλασσας (Krijgsman, 2002).

Μέχρι σήμερα, έχουν δημοσιευτεί αρκετοί παλαιογεωγραφικοί χάρτες για τον ελληνικό χώρο, οι οποίοι, βασισμένοι στα διάφορα παλαιογεγονότα, προσπαθούν να αναπαραστήσουν όσο το δυνατόν ακριβέστερα τη γεωγραφία του ελληνικού χώρου κατά το παρελθόν (Creutzburg, 1963; Dermitzakis & Papanikolaou, 1981; Van Andel & Shackleton, 1982; Steininger & Rögl, 1984; Dermitzakis & Sondaar, 1985; Sondaar *et al.*, 1986; Dermitzakis & de Vos, 1987; Dermitzakis, 1989, 1990; Anastasakis & Dermitzakis, 1990, Perissoratis & Conispoliatis, 2003). Συνοπτικά, η παλαιογεωγραφική εξέλιξη του Αιγαίου κατά τη διάρκεια του ανώτερου Τριτογενούς και του Τεταρτογενούς (από 17 εκατ. χρόνια έως πριν από 40.000 χρόνια) μπορεί να περιγραφεί από μια σειρά παλαιογεωγραφικών χαρτών, όπως αυτοί έχουν κατά καιρούς δημοσιευτεί από τους γεωλόγους (**εικόνα 1.4**).

Κατά την περίοδο του μέσου Μειόκαινου (17-12 εκατ. χρόνια πριν), ο χώρος του σημερινού Αιγαίου, των Βαλκανίων και η Μικρά Ασία αποτελούσαν ενιαία ηπειρωτική περιοχή, το νοτιότερο τμήμα της οποίας, ονομάστηκε Αιγαίδα. Στις αρχές του μέσου Μειόκαινου, η χέρσος αυτή περιβαλλόταν από θάλασσα, αλλά στη συνέχεια απέκτησε χερσαίες συνδέσεις με την Ασία και την Κεντρική Ευρώπη, οι οποίες αποτέλεσαν ίσως και τις γέφυρες ξηράς, απαραίτητες για πανιδικές ανταλλαγές μεταξύ αυτών των περιοχών (Steininger & Rögl, 1984).



**Εικόνα 1.4.** Η παλαιογεωγραφική εξέλιξη του Αιγαίου από το ανώτερο Βουρδιγάλιο - Λάγγιο (17 εκ. χρόνια πριν) έως το ανώτερο Πλειστόκαινο (40.000 χρόνια πριν από σήμερα), τροποποιημένος από Roulakakis *et al.*, 2005, βάσει των Creutzburg, 1963; Dermitzakis & Papanikolaou, 1981; Dermitzakis, 1989, 1990; Perissoratis & Conispoliatis, 2003.

Γύρω στα 12 με 11 εκατομμύρια χρόνια πριν από σήμερα είχαμε έντονη διάρρηξη της Αιγαίδος με την εισχώρηση της θάλασσας στο χώρο

μεταξύ της σημερινής Κρήτης και της Κάσου-Καρπάθου προς το βορρά έως την περιοχή του βόρειου Αιγαίου, σχηματίζοντας το φράγμα του Αιγαίου, ενώ σχεδόν παράλληλα άρχισε ισχυρή βύθιση στο χώρο της Κρητικής λεκάνης (Creutzburg, 1963; Dermitzakis & Papanikolaou, 1981). Σε όλη τη διάρκεια του ανώτερου Τορτόνιου, και πιθανώς του Μεσσηνίου, υπήρχε επικοινωνία μεταξύ της νεοσχηματιζόμενης Κρητικής λεκάνης και του βόρειου Αιγαίου, χωρίς ωστόσο να αποκλείονται κάποιες γέφυρες ξηράς, τουλάχιστον στο χώρο του βόρειου Αιγαίου, μεταξύ Μικράς Ασίας και Ελλάδας (Dermitzakis & Papanikolaou, 1981). Στις αρχές του Μεσσηνίου, γύρω στα 6,5 εκατ. χρόνια πριν από σήμερα, το κλείσιμο των στενών του Γιβραλτάρ προκάλεσε τη διακοπή της επικοινωνίας μεταξύ της Μεσογείου και του Ατλαντικού ωκεανού. Έτσι, η Μεσόγειος μετατράπηκε σε κλειστή θάλασσα που άρχισε σταδιακά να αποξηραίνεται και να μετατρέπεται σε μια σειρά από αλμυρές λίμνες και ερήμους, αυξάνοντας την έκταση των χερσαίων περιοχών και αλλάζοντας εκ νέου τη μορφή των χερσαίων συνδέσεων. Το γεωλογικό αυτό γεγονός έγινε γνωστό ως κρίση αλατότητας του Μεσσηνίου, η οποία δεν πρέπει να διήρκεσε μεγάλο χρονικό διάστημα (Hsü, 1972; Hsü *et al.*, 1977). Στο διάστημα αυτό η Κρήτη παρέμεινε απομονωμένη από τις Κυκλάδες, χάρις στα βαθιά φαράγγια που υπάρχουν στο χώρο της Κρητικής λεκάνης (Schütle, 1993), ενώ φαίνεται να συνέχιζε τις χερσαίες της επαφές με την Πελοπόννησο στα δυτικά.

Το κλίμα της «κενής» πλέον μεσογειακής λεκάνης ήταν ξηρό και ζεστό και το περιβάλλον αυτό φαντάζει αφιλόξενο για την εποίκιση από τους διάφορους ζωικούς οργανισμούς. Όμως, ένα δίκτυο «οάσεων» με γλυκά νερά δημιουργήθηκε είτε από ποτάμια που εισέρρεαν στη λεκάνη, είτε από περιστασιακές βροχοπτώσεις (Hsü *et al.*, 1977; Schütle, 2000; Tsigenopoulos *et al.*, 2003) και το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη διασπορά υδρόβιων οργανισμών (Schütle, 2000; Tsigenopoulos *et al.*, 2003). Περίπου 5,2 εκατομμύρια χρόνια πριν από σήμερα, το Γιβραλτάρ ξανάνοιξε και η Μεσογειακή λεκάνη ξαναγέμισε μέσα σε 1000 χρόνια (Beerli *et al.*, 1996; Krijgsman *et al.*, 1999).

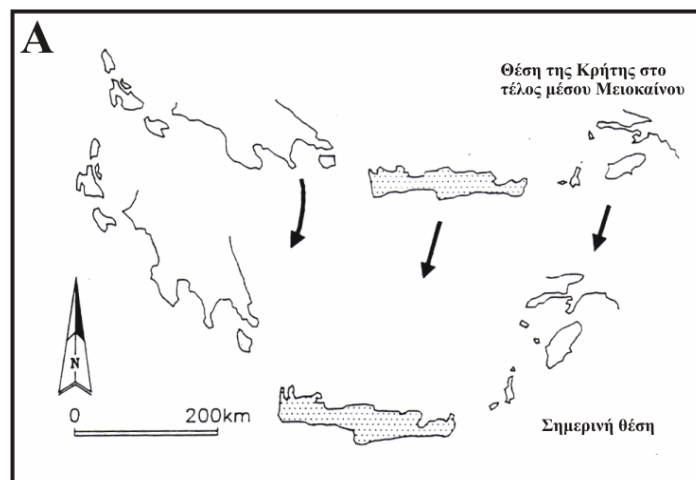
Κατά τη διάρκεια του Πλειόκαινου και εξαιτίας των έντονων τεκτονικών φαινομένων, η περιοχή του Αιγαίου κατακερματίζεται και αλλάζει σημαντικά ως προς τη γεωγραφία της. Η Κρήτη απομονώνεται οριστικά από την Πελοπόννησο και τις άλλες ηπειρωτικές περιοχές. Ο διαυλος της Κορίνθου χώρισε την Πελοπόννησο από την ηπειρωτική Ελλάδα (Dermitzakis, 1989). Η Κάρπαθος, αν και ήταν απομονωμένη κατά τη διάρκεια του Μειόκαινου, φαίνεται να ενώνεται με τη Ρόδο και την Ανατολία κατά τη διάρκεια του κατώτερου Πλειόκαινου. Η σύνδεση αυτή διατηρήθηκε μέχρι το μέσο με ανώτερο Πλειόκαινο (Kuss, 1975; Daams & Van der Weerd, 1980), οπότε και χωρίστηκε πλέον από τη Ρόδο.

Στο Πλειστόκαινο, η Κρήτη, η Κάρπαθος και η Ρόδος ήταν πλήρως απομονωμένα νησιά. Κατά τη διάρκεια του μέγιστου των παγετώδων περιόδων η στάθμη της θάλασσας ήταν 200 μέτρα χαμηλότερα από σήμερα (Beerli *et al.*, 1996). Ωστόσο, η θαλάσσια περιοχή μεταξύ Κρήτης και Κυκλάδων - Πελοποννήσου ήταν τόσο βαθιά που ήταν αδύνατο να χερσεύει, ώστε να είναι εφικτή η σύνδεση των εκατέρωθεν περιοχών (Schütle, 1993). Αντίθετα, υπήρξαν σημαντικές συνδέσεις μεταξύ των νησιών των Κυκλάδων, των Κυθήρων με τα Αντικύθηρα, ενώ και η Πελοπόννησος συνδεόταν με τη Στερεά Ελλάδα. Επίσης όλα σχεδόν τα νησιά του βορειο- ανατολικού Αιγαίου και ορισμένα νησιά των Δωδεκανήσων συνδέονταν με τη Μικρά Ασία (Perissoratis & Conispoliatis, 2003).

Τέλος, στο Ολόκαινο, με το πέρας της τελευταίας παγετώδους περιόδου, η στάθμη της θάλασσας ανεβαίνει και η περιοχή του Αιγαίου αποκτά σταδιακά τη σημερινή της γεωγραφία. Τα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου αποκόπτονται από τη Μικρά Ασία, τα νησιά των Κυκλάδων απομονώνονται το ένα από το άλλο και, αντίστοιχα, τα νησιά του Αργοσαρωνικού από την Πελοπόννησο και την Αττική.

Αξίζει να σημειωθεί στο σημείο αυτό ότι όλοι οι παλαιογεωγραφικοί χάρτες στηρίζονται στη σημερινή γεωγραφία του ελληνικού χώρου, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι η θέση των περιοχών αυτών ήταν ίδια τότε και σήμερα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι περιοχές του Αιγαϊκού χώρου, εξαιτίας

των διαφόρων γεωλογικών φαινομένων κινούνται και μάλιστα με διαφορετικές ταχύτητες. Για παράδειγμα, η Κρήτη κινείται προς το νότο με ταχύτητα της τάξης των 30mm ανά έτος. Δεδομένου αυτού και της γωνίας μετακίνησης της Κρήτης και της Πελοποννήσου, μπορούμε να εκτιμήσουμε ότι η Κρήτη πριν από 5-6 εκατομμύρια χρόνια, δηλαδή στο ανώτερο Μειόκαινο, ήταν πολύ βορειότερα απ' ό,τι είναι σήμερα, δηλαδή ήταν πολύ κοντά στην Πελοπόννησο (**εικόνα 1.5**) (Meulenkamp *et al.*, 1994, Kreemer & Chamot-Rooke, 2004).



**Εικόνα 1.5.** Η προς τα έξω κίνηση του ελληνικού τόξου από το τέλος του μέσου Μειόκαινου (Meulenkamp *et al.* 1994).

Το γεγονός ότι η Μεσόγειος είναι μια σχεδόν κλειστή θάλασσα, σε συνδυασμό με τη γεωγραφική θέση που κατέχει (γεωγραφικό πλάτος), την καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητη στην καταγραφή γεωλογικών γεγονότων και κλιματικών διακυμάνσεων (Krijgsman, 2002).

Υπάρχει γενική συμφωνία μεταξύ των επιστημόνων ότι κατά τη διάρκεια του ανώτερου Μειόκαινου (12-5 εκατ. χρόνια πριν), το κλίμα στη μεσογειακή λεκάνη ήταν υγρό και ζεστό, τροπικό ή υποτροπικό. Η βλάστηση ήταν πυκνή, μικτού μεσοφυτικού χαρακτήρα, όπως το κλίμα και η βλάστηση που επικρατούν σήμερα στη νοτιοανατολική Ασία. Κατά το Πλειόκαινο, καθώς το κλίμα άλλαζε σταδιακά από υγρό προς ξηρό, η βλάστηση εμπλουτίστηκε και με Αρкто-Τριτογενή στοιχεία (Velitzelos & Gregor, 1990).



Ουσιαστικά, το τυπικό μεσογειακό κλίμα με τους ήπιους και υγρούς χειμώνες και τα ξηρά καλοκαίρια αναπτύχθηκε τα 3 τελευταία εκατομμύρια χρόνια (Dallman, 1998).

Τα τελευταία 3 εκατομμύρια χρόνια έχουν καταγραφεί περίπου 30 παγετώδεις περιοδοί, κατά τη διάρκεια των οποίων οι πάγοι κάλυπταν το μεγαλύτερο μέρος της βόρειας Αμερικής και της Ευρασίας (Van Andel, 1994). Οι παγετώδεις περιοδοί είχαν περιοδικότητα της τάξης των 100.000 χρόνων με τις μεσοπαγετώδεις φάσεις να διαρκούν περίπου 10.000 χρόνια. Αν και οι σημερινές περιοχές που έχουν μεσογειακό κλίμα δεν καλύφθηκαν από πάγους, η μέση θερμοκρασία τους, όπως ήταν αναμενόμενο, μειώθηκε από 2 έως 7° C (Dallman, 1998). Οι κλιματικές διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του Πλειστόκαινου άλλαζαν την επικρατούσα βλάστηση από φυλλοβόλα δάση βελανιδιάς, κατά τη διάρκεια των παγετωδών περιόδων, σε κωνοφόρα, μακί και φρύγανα κατά τη διάρκεια των μεσοπαγετωδών περιόδων (Mylonas, 1999).

Έκτος όμως από τις έντονες διακυμάνσεις λόγω των παγετωδών και μεσοπαγετωδών περιόδων, ένα άλλο γεγονός επηρέασε σημαντικά πολλούς ζωικούς οργανισμούς. Αυτό ήταν η στρωματοποίηση των νερών της Μεσογείου που έλαβε χώρα αρκετές φορές κατά το Πλειστόκαινο αλλά και το Ολόκαινο. Υπήρξαν περιοδοί κατά τις οποίες στην Ανατολική Μεσόγειο υπήρχε επιφανειακά ένα στρώμα γλυκού νερού, ή έστω ένα επιφανειακό στρώμα πολύ χαμηλής αλατότητας (Por, 1989; Rossignol-Strick, 1985; Smith *et al.*, 1986; Cramp & O'Sullivan, 1999; Geraga *et al.*, 2005). Αυτό προκλήθηκε λόγω μεγάλης τάξης μεγέθους εισροής γλυκού νερού στη Μεσόγειο είτε από το λιώσιμο των πάγων κατά τις μεσοπαγετώδεις περιόδους (Por, 1989; Cramp & O'Sullivan, 1999; Nijenhuis, 1999; Kallel *et al.*, 2000; Geraga *et al.*, 2005), είτε λόγω υπερβολικής ροής του Νείλου την εποχή των Μουσώνων (Por, 1989; Rossignol-Strick, 1983; Rossignol-Strick, 1985; Cramp & O'Sullivan, 1999; Nijenhuis, 1999; Kallel *et al.*, 2000; Krom *et al.*, 2002; Geraga *et al.*, 2005). Οι ισχυροί μουσώνες στην Αφρική, θεωρείται ότι αποτελούν άμεση απόκριση στους αστρονομικούς παράγοντες που καθορίζουν την τροχιά της Γης και την

έκθεσή της στο ήλιο (Rossignol-Strick, 1983; Rossignol-Strick, 1985; Krijgsman, 2002). Η μελέτη γύρω από αυτό το θέμα ξεκίνησε με τη μελέτη βενθικών ιζημάτων του χώρου της ανατολικής Μεσογείου, τα οποία ονομάζονται σαπροπηλοί (sapropels) και χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλη περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα. Ο σχηματισμός τέτοιου τύπου ιζημάτων γίνεται κάτω από ανοξικές συνθήκες. Δυο είναι οι βασικές θεωρίες για τον σχηματισμό τους (οι οποίες δεν αλληλοαποκλείονται) και σχετίζονται και οι δύο με την μεγάλης κλίμακας εισροή γλυκών νερών στη Μεσόγειο: α) επικράτηση ανοξικών συνθηκών στα βαθύτερα στρώματα της υδάτινης στήλης λόγω της στωματοποίησης των νερών της μεσογείου και β) αύξηση στην πρωτογενή παραγωγικότητα στην εύφωτη ζώνη που οδηγεί σε αυξημένη ροή οργανικής ύλης προς τα βαθύτερα στρώματα (Cramp & O'Sullivan, 1999; Nijenhuis, 1999; Krom *et al.*, 2002; Weldeab, 2003; Χατζιγιάννη, 2003). Ο σχηματισμός σαπροπηλών είναι το αποτέλεσμα μιας πολύπλοκης αλληλεπίδρασης πολλών διαδικασιών, η ένταση των οποίων ποικίλει τόσο χρονικά όσο και τοπικά (Nijenhuis, 1999). Με τη στρωματοποίηση έχουμε απομόνωση των χαμηλότερων στρωμάτων νερού με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ανοξικές συνθήκες. Οι πλημμύρες του Νείλου είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας στην απόθεση σαπροπηλών, και αυτό αντανακλάται στην μεγαλύτερη διάρκεια των σαπροπηλών στο ανατολικότερο τμήμα της Ανατολικής Μεσογείου σε σχέση με το δυτικότερο τμήμα (Nijenhuis, 1999). Η πιο πρόσφατη απόθεση σαπροπηλού (sapropel S1) έλαβε χώρα από 6000 έως 9000 πριν από σήμερα (Smith *et al.*, 1986; Cramp & O'Sullivan, 1999; Krom *et al.*, 2002). Κατά την απόθεση του S1 οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι το κλίμα ήταν θερμό και ότι υπήρχε επιφανειακά ένα θερμό στρώμα γλυκού νερού, ή έστω ένα επιφανειακό στρώμα πολύ χαμηλής αλατότητας (Rossignol-Strick, 1985; Smith *et al.*, 1986; Cramp & O'Sullivan, 1999; Nijenhuis, 1999; Geraga *et al.*, 2005). Καταλαβαίνουμε λοιπόν ότι ακόμη και μέχρι πολύ πρόσφατα (6000 χρόνια πριν) μπορεί η Μεσόγειος να μην αποτελούσε το θαλάσσιο φράγμα που αποτελεί σήμερα,

τουλάχιστον όσον αφορά τους οργανισμούς που μπορούν να διασπαρθούν παθητικά ή ενεργητικά μέσω του γλυκού ή του υφάλμυρου νερού.

### 1.7 Φυλογεωγραφία

Η φυλογεωγραφία είναι το πεδίο έρευνας που ασχολείται με τις αρχές και τις διαδικασίες που καθορίζουν τα γεωγραφικά πρότυπα των γενεαλογικών γραμμών εντός του είδους, και μεταξύ στενά συγγενικών ειδών. Η φυλογεωγραφία λαμβάνει υπόψη το σύνολο των ιστορικών και φυλογενετικών παραγόντων της χωρικής κατανομής των γονιδιακών γενεαλογικών γραμμών. (Avisé, 2000).

Οι φυλογεωγραφικές μελέτες έρχονται αντιμέτωπες με δυο βασικές δυσκολίες: την τυχαιότητα των γενετικών διαδικασιών και την ενδεχομένως πολύπλοκη ιστορία των μελετώμενων τάξων (Knowles & Maddison, 2002; Knowles, 2004). Η ανάλυση και η επεξήγηση της κατανομής των γενεαλογιών απαιτούν συνήθως εκτενή δεδομένα από τη μοριακή και την πληθυσμιακή γενετική, την ηθολογία, τη φυλογένεση, τη δημογραφία, την παλαιοντολογία, τη γεωλογία και την ιστορική γεωγραφία. Οι φυλογεωγραφικές μελέτες προσπαθούν να ερμηνεύσουν τον τρόπο και το βαθμό στον οποίο οι διάφορες ιστορικές διαδικασίες που σχετίζονται με τη δημογραφία των πληθυσμών, έχουν αφήσει τα εξελικτικά τους αποτυπώματα στη σύγχρονη γεωγραφική κατανομή των γονιδιακών γραμμών των οργανισμών (Avisé, 2000).

Η φυλογεωγραφία καλύπτει διάφορα εναλλακτικά σενάρια για την ερμηνεία των χωρικών διευθετήσεων των οργανισμών και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους. Για παράδειγμα, ο βικαριανισμός και η διασπορά είναι δύο ανταγωνιστικοί συχνά παράγοντες που καθορίζουν, ο καθένας με το δικό του τρόπο την προέλευση του χωρικού διαχωρισμού των ταξινομικών μονάδων. Υπό βικαριανιστικές συνθήκες, οι πληθυσμοί ή άλλες ανώτερες ταξινομικές μονάδες διαχωρίζονται όταν λίγο έως πολύ η συνεχής κατανομή της προγονικής μορφής κατακερματίζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως φαινόμενα ορογένεσης, σπασίματα ηπειρωτικών μαζών, ευστατικά φαινόμενα κλπ. (Croizat *et al.*, 1974; Nelson & Platnick, 1981; Myers

& Giller, 1988). Κατά τη διασπορά, μια ταξινομική μονάδα αποκτά τη σημερινή της κατανομή μέσω ενεργητικής ή παθητικής διασποράς από ένα ή περισσότερα προγονικά κέντρα προέλευσης (Briggs, 1974). Ο βικαριανισμός και η διασπορά είναι ιστορικά φαινόμενα, ο σχετικός ρόλος των οποίων στις διάφορες περιπτώσεις μπορεί να σταθμιστεί στο πλαίσιο της φυλογενετικής ανάλυσης.

Ένα από τα πιο χρήσιμα εργαλεία στη διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων που διέπουν τα τάξα, έχει αποδειχθεί ότι είναι η σύγκριση τμήματος ή ολόκληρης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας συγκεκριμένων γενετικών τόπων, η οποία εξετάζει τις σχέσεις των τάξων μέσα από συναπωμορφίες και όχι με βάση τη συνολική ομοιότητα όπως ισχύει στις φαινετικές προσεγγίσεις που στηρίζονται σε ποσοτικούς χαρακτήρες. Σε γενικές γραμμές, η χρήση των μοριακών δεδομένων στη φυλογένεση έχει τύχει πολύ μεγάλης αποδοχής ακόμα και από πολύ φανατικούς οπαδούς της μορφολογίας, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις όπου οι μορφολογικοί χαρακτήρες αποτυγχάνουν να δώσουν ξεκάθαρη εικόνα για την εξελικτική ιστορία των μελετώμενων τάξων (Lenk *et al.*, 1998; Michel-Salzat & Bouchon, 2000). Από πολλούς θεωρείται ότι τα μοριακά δεδομένα είναι καταλληλότερα για εξελικτικές μελέτες σε σχέση με δεδομένα προερχόμενα από τη μορφολογία ή τη φυσιολογία των μελετώμενων τάξων (Graur & Li, 2000), αν και υπήρξε κάποια διαμάχη μεταξύ των επιστημόνων (Kluge, 1983; Patterson *et al.*, 1993). Σύμφωνα με τους Hillis & Wiens (2000), τόσο τα μορφομετρικά όσο και τα μοριακά δεδομένα έχουν διακριτά πλεονεκτήματα όταν χρησιμοποιούνται σε φυλογενετικές μελέτες, αλλά ο συνδυασμός των δυο γενικά καταλήγει να μας δώσει την καλύτερη εκτίμηση.

Ο μοριακός δείκτης που χρησιμοποιείται κατεξοχήν στις φυλογεωγραφικές μελέτες είναι το μιτοχονδριακό DNA (Avisé, 2000). Την τελευταία εικοσαετία έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε μελέτες που αφορούν τη δομή πληθυσμών και τη γονιδιακή ροή, τον υβριδισμό, τη βιογεωγραφία και τις φυλογενετικές σχέσεις (Moritz *et al.*, 1987; Avisé, 1994), αφού διαθέτει μια

σειρά από χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο σύστημα για την ανίχνευση γενετικών διαφορών σε διαειδικό και ενδοειδικό επίπεδο.

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα τόσο από εξελικτική όσο και από τεχνική άποψη (Hurst & Jiggins, 2005), τα οποία μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

α) Υπάρχει πολύ υψηλός αριθμός αντιγράφων του mtDNA στα κύτταρα (Futuyma, 1991).

β) Το mtDNA είναι πολύ καλά χαρακτηρισμένο σε σχέση με το πυρηνικό (Hagelberg, 1994).

γ) Ο μητρικός τρόπος κληρονομικότητας του mtDNA το απαλλάσσει από τυχόν ανασυνδυασμούς που συμβαίνουν στο πυρηνικό DNA (με κάποιες εξαιρέσεις: Zouros *et al.*, 1994; Ladoukakis & Zouros, 2001a, 2001b) και έτσι οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται είναι καθαρά αποτέλεσμα μεταλλαγών (Hagelberg, 1994).

δ) Είναι απλοειδές, οπότε δεν απαιτείται κλωνοποίηση πριν από τον προσδιορισμό της αλληλουχίας (Hurst & Jiggins, 2005).

ε) Τα ψευδογονίδια και τα ιντρόνια απουσιάζουν από το mtDNA (Avisé *et al.*, 1987).

στ) Ο γρήγορος ρυθμός εξέλιξης του mtDNA το καθιστά πολύτιμο εργαλείο για εξελικτικές και φυλογενετικές μελέτες, κυρίως σε διαειδικό ή ενδοειδικό επίπεδο (Avisé *et al.*, 1987).

Βέβαια, ο ρυθμός εξέλιξης δεν είναι σταθερός για όλες τις ομάδες οργανισμών. Μέχρι σήμερα έχουν διατυπωθεί διάφορες υποθέσεις για την ερμηνεία των διαφορών που παρατηρούνται στο ρυθμό υποκατάστασης μεταξύ των διαφόρων εξελικτικών γραμμών. Οι παράγοντες που συχνά επιστρατεύονται για το σκοπό αυτό διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: α) τους εξαρτώμενους από τη γενεά, όπως ο χρόνος γενεάς (Laird *et al.* 1969, Kohne 1970), η ικανότητα μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA και β) οι ανεξάρτητοι από τη γενεά παράγοντες, όπως ο μεταβολικός ρυθμός (τα εξώθερμα έχουν χαμηλότερο ρυθμό από τα ενδόθερμα, Martin & Palumbi 1993) και το μέγεθος του σώματος (Graur & Li 2000). Ο εξελικτικός ρυθμός του mtDNA στα

Χελώνια είναι σαφώς χαμηλότερος σε σχέση με άλλες ομάδες Σπονδυλωτών (Avisé *et al.*, 1992; Lamb *et al.*, 1994; Lenk *et al.*, 1999). Παρόλα αυτά, όμως, είναι ένας ισχυρός μοριακός δείκτης, αφού συνδυάζει τη μητρική κληρονομικότητα, το γρήγορο εξελικτικό ρυθμό και τον εκτεταμένο ενδοειδικό πολυμορφισμό (Avisé *et al.*, 1987), και μπορεί να φανεί πολύ χρήσιμο και πληροφοριακό σε περιπτώσεις όπου τα μορφολογικά δεδομένα αποδεικνύονται αναποτελεσματικά (Lenk *et al.*, 1998), όπως άλλωστε συμβαίνει στην περίπτωση των ειδών του γένους *Mauremys* (Fritz & Wischuf, 1997). Για το είδος *M. rivulata* δεν έχουν γίνει καθόλου μοριακές μελέτες, και θέλαμε να ελέγξουμε τη φυλογεωγραφία του είδους σε ένα περιβάλλον όπως το Αιγαίο, στο οποίο οι μέχρι τώρα μελετούμενες ομάδες έχουν δείξει πολύ έντονη διαφοροποίηση (Κασαπίδης, 2001; Roulakakis *et al.*, 2005a & b; Parmakelis *et al.*, 2005; Parmakelis *et al.*, 2006a & b).

Στα Χελώνια έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε φυλογεωγραφικές και φυλογενετικές μελέτες το κυτόχρωμα  $\beta$  (cyt *b*) (Lamp *et al.*, 1994; Lamb & Lydeard, 1994; Lenk *et al.*, 1998; Lenk *et al.*, 1999; Fritz *et al.*, 2005; Fritz *et al.*, 2006) και η περιοχή ελέγχου αντιγραφής του μιτοχονδρίου (control region/D-loop) (Lamp *et al.*, 1994; Norman *et al.*, 1994; Bowen *et al.*, 1995; Encalada *et al.*, 1996; Schroth *et al.*, 1996; Laurent *et al.*, 1998; Roman *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2003; Van der Kuyl *et al.*, 2005).

Η εξαγωγή των φυλογεωγραφικών συμπερασμάτων βασίζεται στη μελέτη της αναδομημένης γενεαλογικής ιστορίας των γονιδίων (γονιδιακών δέντρων) από διαφορετικούς πληθυσμούς. Επειδή, όμως, πολλά γεγονότα έχουν λάβει χώρα στο παρελθόν (όπως για παράδειγμα επέκταση πληθυσμών, στενωποί, μετανάστευση) και πολλές γενεαλογικές γραμμές μπορεί έχουν χαθεί τυχαία, η ιστορία των ειδών μπορεί να μην ταυτίζεται με την ιστορία του γονιδιακού δέντρου (Knowles & Maddison, 2002; Rosenberg & Nordborg, 2002). Για το λόγο αυτόν, και για να αποφευχθούν λανθασμένα συμπεράσματα, απαιτείται ο προσδιορισμός των φυλογενετικών σχέσεων των υπό εξέταση ταξινομικών μονάδων να βασίζεται όχι μόνο σε ένα αλλά σε περισσότερα γονίδια (Graur & Li, 2000; Nei & Kumar, 2000).

### 1.8 Πληθυσμιακή γενετική

Η πληθυσμιακή γενετική μελετάει και προσπαθεί να κατανοήσει τις αιτίες των γενετικών διαφορών εντός και μεταξύ των ειδών, ενώ η μοριακή βιολογία παρέχει πολυάριθμες τεχνικές για την αναγνώριση αυτών των διαφορών (Hartl, 2000). Οι γενετικές διαφορές μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους αποκαλούνται γενετικός πολυμορφισμός, ενώ οι γενετικές διαφορές μεταξύ των ειδών απαρτίζουν τη γενετική απόκλιση. Άρα μπορούμε να πούμε ότι η πληθυσμιακή γενετική είναι η μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού και της γενετικής απόκλισης (Hartl, 2000). Περιλαμβάνει τη μελέτη των διαφόρων δυνάμεων που επιδρούν και καταλήγουν στις εξελικτικές αλλαγές των ειδών μέσα στο χρόνο (Hartl & Clark, 1997). Τέσσερις είναι οι βασικές δυνάμεις που δρουν στην εξέλιξη: οι μεταλλαγές, η φυσική επιλογή, η μετανάστευση και η τυχαία γενετική παρέκκλιση (Hartl & Jones, 1998; Griffiths *et al.*, 1999). Η πληθυσμιακή γενετική είναι μια επιστήμη εφαρμοσμένη αλλά και θεωρητική. Η εφαρμοσμένη της πλευρά συνίσταται στην περιγραφή των προτύπων γενετικής διαφοροποίησης των πληθυσμών και παρέχει εκτιμήσεις των παραμέτρων που περιγράφουν τις μεταλλαγές, τη φυσική επιλογή, τη μετανάστευση και την τυχαία γενετική παρέκκλιση. Η θεωρητική πλευρά της πληθυσμιακής γενετικής συνίσταται στην πρόβλεψη της αναμενόμενης πληθυσμιακής δομής και στο πώς αυτή αλλάζει όταν επιδράσουν διαφορετικές δυνάμεις πάνω στους πληθυσμούς (Griffiths *et al.*, 1999).

Η θεμελιώδης μέτρηση στην πληθυσμιακή γενετική είναι οι αλληλικές συχνότητες που παρατηρούνται για κάθε μελετώμενο γενετικό τόπο σε κάθε πληθυσμό (Hartl & Clark, 1997; Griffiths *et al.*, 1999). Κάθε πληθυσμός έχει πεπερασμένο μέγεθος. Έτσι όλοι οι πληθυσμοί (ή υποπληθυσμοί) θα έπρεπε τελικά να καταλήξουν να είναι ομόζυγοι και εντελώς διαφοροποιημένοι μεταξύ τους λόγω ομομιξίας (inbreeding). Στους φυσικούς πληθυσμούς, όμως, εισάγονται νέοι πολυμορφισμοί σε κάθε πληθυσμό ως αποτέλεσμα μεταλλαγών ή μετανάστευσης μεταξύ των πληθυσμών με αποτέλεσμα να επέρχονται αλλαγές στις αλληλικές συχνότητες των γενετικών τόπων (Griffiths *et al.*, 1999). Η γενετική δομή ενός πληθυσμού καθορίζεται από το

σύνολο των αλληλομόρφων (γονιδιακή δεξαμενή) και από την κατανομή τους σε γονότυπους. Εκτός από τις περιπτώσεις σπάνιων γενετικών μεταλλαγών, κάθε άτομο γεννιέται και πεθαίνει με το ίδιο σύνολο αλληλομόρφων. Αυτό που αλλάζει γενετικά στο βάθος του χρόνου είναι η σύνθεση μιας ομάδας ατόμων που συνιστούν έναν πληθυσμό (Russell, 1998).

Το μοντέλο που περιγράφει τις αναμενόμενες σχέσεις μεταξύ των συχνοτήτων των αλληλομόρφων στους πληθυσμούς και των ατόμων με διαφορετικούς γονότυπους σε αυτούς τους πληθυσμούς, είναι η ισορροπία Hardy-Weinberg (Wallace, 1981). Όταν ένας πληθυσμός αποκλίνει από την ισορροπία, δηλαδή οι παρατηρούμενες τιμές ετεροζυγωτίας είναι διαφορετικές από τις αναμενόμενες, τότε πρέπει να ελέγξουμε τις αιτίες της απόκλισης αυτής. Η απόκλιση μπορεί να οφείλεται σε χαρακτηριστικά που δεν λήφθηκαν υπόψη, όπως η πληθυσμιακή υποδιαίρεση, η ύπαρξη πληθυσμιακών στενωπών, η ομομιξία (inbreeding) ή η σύζευξη ατόμων ενός πληθυσμού με άτομα άλλων πληθυσμών (outbreeding) (Wallace, 1981; Roughgarden, 1996).

Τα είδη σχεδόν πάντα παρουσιάζουν κάποιας μορφής γεωγραφική δομή. Οι οργανισμοί δεν κατανέμονται ομοιογενώς στο χώρο αλλά συνήθως συναθροίζονται, δημιουργούν κοπάδια, αγέλες ή αποικίες. Η πληθυσμιακή υποδιαίρεση συχνά προκαλείται από την περιβαλλοντική ετερογένεια (Hartl, 2000). Κατάλληλα ή ευνοϊκά ενδιαιτήματα εναλλάσσονται με περιοχές που χαρακτηρίζονται από ακατάλληλα ενδιαιτήματα. Υποδιαίρεση μπορεί επίσης να προκληθεί λόγω της ηθολογίας κάποιου είδους (Hartl, 2000). Από τη δεκαετία του 1920 οι γενετιστές χρησιμοποιούσαν μετρήσεις που περιέγραφαν πώς κατανέμεται χωρικά η γενετική ποικιλομορφία στα όρια της εξάπλωσης ενός είδους (Templeton, 1998). Με πρωτοστάτη τον Wahlund (1928) προσπαθούσαν, μελετώντας γενετικά δεδομένα, να αποκαλύψουν πληροφορίες για την πληθυσμιακή υποδιαίρεση.

Η πληθυσμιακή γενετική χρησιμοποιεί μοντέλα για την περιγραφή, με μαθηματικούς όρους, ενός βιολογικού ζητήματος. Κατά την περιγραφή αυτή πολλά χαρακτηριστικά του προβλήματος αψηφούνται, είτε γιατί θεωρούνται



επουσιώδη σε σχέση με το επίκεντρο του προβλήματος, είτε γιατί είναι πολύ πολύπλοκα ώστε να συμπεριληφθούν. Στην τελευταία αυτή περίπτωση απλώς υποθέτουμε ή ελπίζουμε ότι δεν είναι τόσο απαραίτητα ή ουσιώδη για την περιγραφή (Jayakar *et al.*, 1984). Για παράδειγμα, δύο είναι τα βασικά μοντέλα που ελέγχονται όταν εξετάζεται η πληθυσμιακή υποδιαίρεση: 1) οι πληθυσμοί ανταλλάσσουν μετανάστες με σταθερό ρυθμό για απείρως μεγάλο χρονικό διάστημα, ή 2) οι πληθυσμοί προέρχονται από έναν κοινό προγονικό πληθυσμό ο οποίος διαχωρίστηκε κάποια στιγμή στο παρελθόν και έκτοτε δεν έχουμε γονιδιακή ροή μεταξύ τους (Nielsen & Wakeley, 2001). Όμως, τις περισσότερες φορές η ιστορία των πληθυσμών δεν είναι τόσο απλή και συχνά η αλήθεια βρίσκεται κάπου ανάμεσα στις δυο αυτές ακραίες καταστάσεις (Nielsen & Wakeley, 2001).

Τα πορίσματα της πληθυσμιακής γενετικής είναι πολύτιμα σε πολλές εφαρμοσμένες μελέτες όπως η διαχείριση κινδυνευόντων ειδών, ο έλεγχος των επιβλαβών εντόμων, η εξέλιξη των παρασίτων, η ιατρική, η βιοτεχνολογία, η ανθρωπολογία και η ιατροδικαστική, καθώς και η διασταύρωση ζωικών και φυτικών ειδών (Powell, 1983; Roughgarden, 1996; Hartl & Clark, 1997).

Ο πιο ισχυρός μοριακός δείκτης σήμερα στην πληθυσμιακή γενετική είναι οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες (Jane & Lagoda, 1996; Goldstein & Pollock, 1997; Schlotterer & Pemberton, 1998). Οι μικροδορυφορικοί δείκτες είναι αλληλουχίες που χαρακτηρίζονται από επαναλήψεις μονο- έως πεντανουκλεοτιδίων. Βρίσκονται σε πολύ μεγάλη αφθονία στο γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών και φτάνουν σε μήκος περίπου έως και τα 150 ζεύγη βάσεων (bp). Οι μικροδορυφορικοί τόποι μπορεί να αποτελούνται από τέλειες ή από ατελείς επαναλήψεις στις οποίες η κύρια επαναληπτική μονάδα διακόπτεται από άλλες βάσεις. Τέλος, θεωρούνται σύνθετοι, όταν αποτελούνται από διαφορετικούς τύπους επαναλήψεων γειτονικές μεταξύ τους (Jane & Lagoda, 1996; Rosenbaum & Deinard, 1998) (εικόνα 1.6).



διέπουν την εξέλιξη των μικροδορυφορικών αλληλουχιών (Rosenbaum & Deinaud, 1998). Δυο είναι τα βασικά εξελικτικά μοντέλα που έχουν προταθεί: το μοντέλο των Απειρών Αλληλομόρφων (IAM, Infinite Allele Model) και το μοντέλο των Μεταλλάξεων κατά Βήματα (SMM, Stepwise Mutation Model). Το IAM (Kimura & Crow, 1964) υποθέτει ότι κάθε νέο αλληλόμορφο που δημιουργείται από μια μεταλλαγή είναι πρωτότυπο, και επομένως διαφορετικό από κάθε άλλο που υπάρχει μέχρι εκείνη τη στιγμή. Το SMM (Ohta & Kimura, 1973) υποθέτει ότι κάθε μεταλλαγή επηρεάζει την αλληλική κατάσταση ενός τόπου με αύξηση ή μείωση του αριθμού των επαναλήψεων κατά μια μονάδα. Το SMM είναι το πλέον αποδεκτό αφού το IAM έχει κριθεί ακατάλληλο γιατί πολύ συχνά παραβιάζεται η βασική του προϋπόθεση (πρωτότυπα αλληλόμορφα) λόγω του πολύ υψηλού ρυθμού μετάλλαξης των μικροδορυφορικών αλληλουχιών (Rosenbaum & Deinaud, 1998).

Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες μπορούν να πολλαπλασιαστούν με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο ελάχιστη ποσότητα DNA (Schlotterer & Pemberton, 1998). Η απλότητα, η ταχύτητα ανάλυσης και τα υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού του μικροδορυφορικού DNA, συντέλεσαν στο να γίνει ιδιαίτερα δημοφιλές στις πληθυσμιακές μελέτες (Goldstein *et al.*, 1995). Τέλος, οι μικροδορυφορικοί δείκτες έχουν αποδειχθεί ότι είναι πολύ πληροφοριακοί σε πολλά είδη που δεν παρουσίασαν σχεδόν κανέναν πολυμορφισμό ή πολύ μικρή διαφοροποίηση σε άλλους γενετικούς δείκτες (Taylor *et al.*, 1994; Menotti-Reymond & O'Brien, 1995).

### 1.9 Μελέτη οικολογικών στοιχείων

Για την ερμηνεία του φυλογεωγραφικού προτύπου και της εξελικτικής ιστορίας κάθε οργανισμού πρέπει να ληφθούν υπόψη πάρα πολλοί παράγοντες, όπως η γεωλογική ιστορία της περιοχής μελέτης, οι κλιματικοί παράγοντες που επικρατούσαν πριν από χιλιάδες ή και εκατομμύρια χρόνια, αλλά και η δυνατότητα διασποράς του οργανισμού και οι ελάχιστες οικολογικές του απαιτήσεις (Avise, 2000). Για το λόγο αυτόν, προχωρήσαμε

στην περαιτέρω, συμπληρωματική, μελέτη ενός πληθυσμού που εποίκισε έναν «ακραιο» βιότοπο, έναν υγρότοπο με δυσμενείς συνθήκες. Επίσης διεξήχθησαν κάποια προκαταρκτικά πειράματα με χρήση ραδιοτηλεμετρίας για τη μελέτη της ημερήσιας και της εποχικής δραστηριότητας ενός πληθυσμού του είδους *M. rivulata* σε ένα φυσικό υγρότοπο.

Η κατάσταση του πληθυσμού του *M. rivulata* σε ένα ακραιο οικοσύστημα, όπως η δεξαμενή μιας μονάδας βιολογικού καθαρισμού, σε συνδυασμό με τις ραδιοτηλεμετρικές παρατηρήσεις μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για την ικανότητα διασποράς του είδους και στοιχεία για την ερμηνεία του φυλογεωγραφικού προτύπου των συγκεκριμένων οργανισμών, καθώς και για τις διαχειριστικές πρακτικές που αποσκοπούν στο να αποφευχθεί η εξαφάνιση πληθυσμών που κινδυνεύουν. Παρακάτω δίνονται κάποια εισαγωγικά στοιχεία για τη διαχείριση του είδους *M. rivulata*, το βιολογικό καθαρισμό και για τη ραδιοτηλεμετρική παρακολούθηση.

#### 1.9.1 Διαχείριση του *M. rivulata*

Το είδος περιλαμβάνεται στο Παράρτημα II της οδηγίας 92/43/ΕΟΚ και στην ανανεωμένη οδηγία 97/62/ΕΚ. Αυτό σημαίνει ότι είναι είδος κοινοτικού ενδιαφέροντος του οποίου η παρουσία σε μια περιοχή επιβάλλει τον καθορισμό ειδικών ζωνών διατήρησης. Επίσης, συμπεριλαμβάνεται στον κόκκινο κατάλογο της IUCN (2006) ως «ελάχιστου ενδιαφέροντος» (least concern) (Cox *et al.*, 2006) με την υποσημείωση, όμως, ότι πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στη διατήρηση των νησιωτικών πληθυσμών, οι οποίοι είναι πολύ πιο ευάλωτοι. Η IUCN θεωρεί ότι είναι επιθυμητή η παρουσία του είδους σε αυστηρά προστατευόμενες περιοχές. Επίσης θεωρούνται ελλείψεις οι μέχρι σήμερα μελέτες για τα πληθυσμιακά μεγέθη, τη βιολογία και την οικολογία του είδους, τις πληθυσμιακές τάσεις και τη διαχείριση των πληθυσμών, την παρουσία σε προστατευόμενες περιοχές και την κατάσταση των ενδιατημάτων του είδους (Global Reptile Assessment Workshop, 2006).

Παρόλο που το είδος έχει πυκνούς πληθυσμούς σε ορισμένες περιοχές, πολλοί πληθυσμοί έχουν υποστεί σημαντική μείωση τις τελευταίες δεκαετίες

λόγω των ανθρώπινων δραστηριοτήτων (Μάντζιου, 2000; Rifai & Mantziou, 2005). Η όλο και πιο μεγάλη ζήτηση νερού λόγω της τουριστικής ανάπτυξης ή των εντατικών γεωργικών καλλιεργειών έχει οδηγήσει στην υποβάθμιση ή και καταστροφή πολλών φυσικών υγροτόπων στην περιοχή της Μεσογείου και στη Μέση Ανατολή (Μάντζιου, 2000; Rifai & Mantziou, 2005). Οι κύριες απειλές που αντιμετωπίζει το είδος είναι η αποξήρανση των ενδιαιτημάτων, η «καναλοποίηση» υπαρχόντων χειμάρρων με αποτέλεσμα πολλές φορές να μην είναι δυνατή η αναπαραγωγή των ζώων, η υπερβολική άντληση από γεωτρήσεις, η ρύπανση από αγροχημικά και απόβλητα ελαιουργείων, και τέλος, ο ανταγωνισμός από εισαγόμενα είδη, όπως το *Trachemys scripta* (Gasith & Sidis, 1983; Μάντζιου, 2000; Rifai & Mantziou, 2005).

#### 1.9.2 Ανθεκτικότητα του *M. rivulata* σε επιβαρυνόμενα περιβάλλοντα - Η περίπτωση της Πόμπιας

Οι τεχνητοί υγρότοποι που δημιουργούνται για την επεξεργασία και διάθεση των υγρών αποβλήτων είναι πλέον μια τεχνική που χρησιμοποιείται πάρα πολύ. Μελέτη τεχνητών υγροτόπων που δημιουργούνται με τη ρίψη αστικών αποβλήτων έχει ξαναγίνει στο εξωτερικό, κυρίως όσον αφορά την ποιότητα των υδάτων, τα φυτικά είδη που αναπτύσσονται στον αντίστοιχο υγρότοπο και πώς αυτά βοηθούν στην αποικοδόμηση του οργανικού φορτίου και στην απορρόφηση των θρεπτικών (Urbanc-Bercic, 1996; Denny, 1997; Salmon *et al.*, 1998; Ozesmi & Ozesmi, 1999; Shutes, 2001). Δεν έχουν γίνει, όμως, πανδικές μελέτες για την κατάσταση των οικοσυστημάτων αυτών και για την εξασφάλιση της βιωσιμότητάς τους. Η δημιουργία αυτών των υγροτόπων είναι μια καλή εναλλακτική λύση στη διάθεση των αποβλήτων στο θαλάσσιο περιβάλλον στο οποίο δημιουργούν πολλά προβλήματα λόγω οργανικού εμπλουτισμού. Εξάλλου, μπορούν να μειώσουν σημαντικά το κόστος διαχείρισης που απαιτεί η χρήση ειδικών εγκαταστάσεων, ιδίως για λύματα με μικρό οργανικό ή άλλο ρυπαντικό φορτίο. Για τους λόγους αυτούς η βιωσιμότητα των τεχνητών αυτών υγροτόπων είναι πολύ σημαντική. Το σύστημα που μελετήσαμε αποτελεί έναν

τεχνητό υγρότοπο-καλαμιώνα για επεξεργασία και διάθεση των υγρών αποβλήτων του δημοτικού διαμερίσματος Πόμπιας του δήμου Μοιρών στην Κρήτη.

Μελετήθηκε η μακροβενθική πανίδα του υγρότοπου, αλλά κυρίως η χελώνα *Mauremys rivulata*. Η χρήση των υδρόβιων οργανισμών για την εκτίμηση της ποιότητας του νερού ενός υδάτινου αποδέκτη είναι μια πολύ αξιόπιστη μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρύτατα (Hynes, 1964; Verdonshot, 1989, Winner *et al.*, 1980; Βορεάδου, 1993). Το *M. rivulata* έχει ήδη εποικίσει τον τεχνητό υγρότοπο και παίζει ρόλο ρυθμιστή στο οικοσύστημα. Οι υδρόβιες χελώνες βρίσκονται στην κορυφή της τροφικής αλυσίδας στον υγρότοπο και είναι απαραίτητες για την καλή του λειτουργία. Σκοπός μας ήταν η εκτίμηση του πληθυσμιακού μεγέθους και η λήψη παρατηρήσεων για την πληθυσμιακή κατάσταση και τις ελάχιστες οικολογικές απαιτήσεις του είδους, ώστε να είναι δυνατή μια περαιτέρω εκτίμηση για τις ελάχιστες προϋποθέσεις που πρέπει να τηρεί ένας υγρότοπος, ώστε να είναι εποικίσιμος από τις χελώνες. Τα στοιχεία αυτά είναι πολύ σημαντικά για τη διαχείριση των πληθυσμών του είδους.

### 1.9.3 Ραδιοτηλεμετρία

Μια σχετικά καινούργια μέθοδος παρακολούθησης των ζώων είναι η ραδιοτηλεμετρική παρακολούθηση, ή αλλιώς ραδιοτηλεμετρία. Ο πρώτος που χρησιμοποίησε αυτή την τεχνική ήταν ο Murie (1941) σε εθνικά πάρκα της Αμερικής, με αντικείμενο μελέτης το λύκο (*Canis lupus*). Έκτοτε η μέθοδος της ραδιοτηλεμετρίας χρησιμοποιείται πολύ συχνά για τη μελέτη της δραστηριότητας σε διάφορες ζωικές ομάδες. Για τις χελώνες των γλυκών νερών έχει χρησιμοποιηθεί πολύ στην Αμερική (Barzilay, 1980; Ross & Anderson, 1990; Brown & Brooks, 1991; Quinn & Tate, 1991; Rowe & Moll, 1991; Kaufmann, 1992; Litzgus & Brooks, 1998; Bodie & Semlitsch, 2000) δίνοντας πολλές πληροφορίες όσον αφορά τη συμπεριφορά και την ημερήσια αλλά και την εποχική δραστηριότητα των ζώων.

Με τη ραδιοτηλεμετρία αποκτούμε πληροφορίες για ένα ζώο μέσω της χρήσης ραδιοκυμάτων από μία συσκευή ή προς μία συσκευή, η οποία φέρεται

από το ίδιο το ζώο. Ένα σύστημα ραδιοτηλεμετρικής παρακολούθησης αποτελείται από ένα υποσύστημα διαβίβασης σήματος αποτελούμενο από έναν πομπό, μία πηγή ενέργειας (μπαταρία) και μία κεραία σήματος διασποράς και ένα υποσύστημα παραλαβής σήματος (δέκτης), το οποίο συνίσταται από μία κεραία, ένα δέκτη σήματος με ένδειξη υποδοχής (ηχείο ή/και οθόνη) και μία πηγή ενέργειας (μπαταρία) (Mech & Barber, 2002). Η συμβατική μέθοδος ραδιοτηλεμετρίας περιλαμβάνει τη χρήση πομπών πολύ υψηλής συχνότητας (VHF), η οποία έχει χαμηλό κόστος, σχετική ακρίβεια και μεγάλη διάρκεια ζωής (ανάλογα βέβαια με το επιθυμητό μέγεθος του πομπού). Το μειονέκτημα της συμβατικής μεθόδου, σε αντιδιαστολή με την μέθοδο της παρακολούθησης μέσω δορυφόρου, είναι ότι απαιτεί ανθρώπινο δυναμικό που ανά τακτά χρονικά διαστήματα θα αναλώνει πολλές ώρες στο πεδίο όπου γίνεται η μελέτη (Mech & Barber, 2002).

### 1.10 Στόχος και περίγραμμα της παρούσας διατριβής

Στόχος της παρούσας διατριβής είναι η εύρεση και ερμηνεία του φυλογεωγραφικού προτύπου της υδρόβιας χελώνας *Mauremys rivulata*, η μελέτη των σχέσεων της με τα άλλα δυο μεσογειακά είδη του γένους, και η μελέτη της δομής των πληθυσμών της στο χώρο της ανατολικής Μεσογείου και της εξελικτικής τους ιστορίας. Επίσης, η χρησιμοποίηση όσο το δυνατόν περισσότερων δεδομένων στις διαχειριστικές πρακτικές σύγχρονων υγροτόπων, φυσικών και μη, με στόχο τη διατήρηση ή και αύξηση των νησιωτικών πληθυσμών του είδους.

Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων επιστρατεύτηκαν διαφορετικές μέθοδοι. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε μια μοριακή προσέγγιση με βάση το μιτοχονδριακό DNA, προχωρώντας σε περαιτέρω μελέτες και προσεγγίσεις ανάλογα με τα ερωτήματα που προέκυπταν ή έμεναν αναπάντητα έπειτα από κάθε νέα προσέγγιση.

Με τη χρήση δύο μιτοχονδριακών γονιδίων, μελετήθηκαν οι διαειδικές σχέσεις των τριών μεσογειακών ειδών του γένους. Το μιτοχονδριακό DNA προέκυψε ότι δεν είναι αρκετά πληροφοριακό για τη διαλεύκανση των

ενδοειδικών σχέσεων στο *M. rivulata*. Δεν ήταν δυνατή η διάκριση μεταξύ των διαφορετικών απλοτύπων με βάση τα δυο μιτοχονδριακά γονίδια. Οι λόγοι που θα μπορούσαν να έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση του συγκεκριμένου φυλογεωγραφικού προτύπου έπρεπε να ελεγχθούν περαιτέρω. Μήπως οι πληθυσμοί δεν παρουσιάζουν μεγάλη διαφοροποίηση λόγω πολύ αργού ρυθμού εξέλιξης; Ή μήπως είναι πιθανή μια πολύ πρόσφατη μίξη των πληθυσμών λόγω των έντονων κλιματικών αλλαγών και γεωλογικών φαινομένων που έλαβαν χώρα στην ανατολική Μεσόγειο κατά το Πλειόκαινο, το Πλειστόκαινο ακόμα και το Ολόκαινο; Μήπως, τέλος, έδρασαν ανθρωπογενείς παράγοντες στην ανάμιξη των πληθυσμών (π.χ. ανθρωπόχωρη διασπορά);

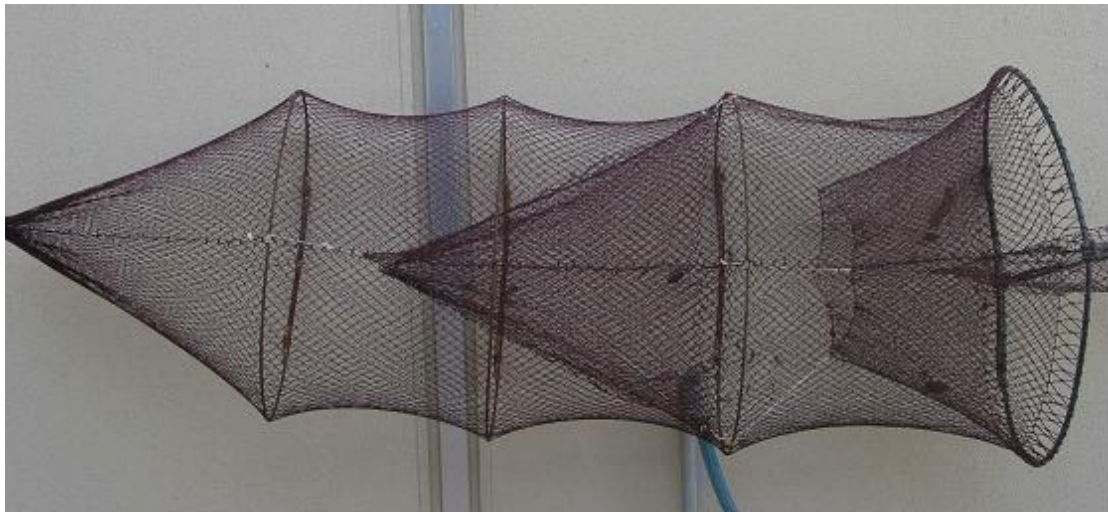
Για να ελέγξουμε τις εναλλακτικές υποθέσεις και τα ερωτήματα που προέκυψαν προχωρήσαμε στη μελέτη έξι μικροδορυφορικών δεικτών, καθώς και σε μια προκαταρκτική οικολογική μελέτη. Με τη μελέτη των μικροδορυφορικών δεικτών έγινε προσπάθεια κατανόησης της πληθυσμιακής δομής και της εξελικτικής ιστορίας των πληθυσμών στην περιοχή της ανατολικής Μεσογείου (με έμφαση στο Αιγαίο). Αν όντως έλαβε χώρα πρόσφατη μίξη των πληθυσμών, είχαμε πολλά κέντρα μίξης - εξάπλωσης, ή όχι; Ποιοι πληθυσμοί ήρθαν σε επαφή; Παρατηρούνται διαφορές στην κατάσταση των πληθυσμών μεταξύ φυσικών και τεχνητών ή υποβαθμισμένων υγροτόπων; Οικολογικά πειράματα έγιναν ώστε να ελεγχθεί η δραστηριότητα των χελωνών του είδους *M. rivulata* και η ικανότητα διασποράς τους. Μελετήθηκε επίσης η κατάσταση ενός πληθυσμού σε έναν τεχνητό υγρότοπο βιολογικού καθαρισμού που φτιάχτηκε πρόσφατα και εποικίστηκε άμεσα από το είδος. Σκοπός της εν λόγω προσέγγισης ήταν η διερεύνηση της ανθεκτικότητας των ζώων αυτών σε ακραία περιβάλλοντα. Η κατανόηση της διαχειριστικής αξίας των υγροτόπων αυτών είναι πολύ σημαντική, ιδιαίτερα σε νησιωτικά περιβάλλοντα, όπου τα επιφανειακά ύδατα είναι περιορισμένα και οι πληθυσμοί του *M. rivulata* διατρέχουν κίνδυνο εξαφάνισης



## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Συλλογή δειγμάτων

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε με πολυάριθμες δειγματοληψίες κατά την περίοδο 2001-2005. Η δειγματοληψία γινόταν με τη χρήση ειδικών δίχτων (νταούλια ή hoop nets, **εικόνα 2.1**), σπανιότερα με τη χρήση απλής απόχης και με το χέρι.



**Εικόνα 2.1.** Τα ειδικά δίχτρα (νταούλια) που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύλληψη των χελωνών.

Μέχρι το 2001, όπου και ξεκίνησαν οι δειγματοληψίες με σκοπό την εκπόνηση της παρούσας διατριβής, δεν υπήρχαν δείγματα υδρόβιων χελωνών στις συλλογές του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης (ΜΦΙΚ) που να μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν. Συνεπώς, όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στις περαιτέρω αναλύσεις συλλέχθηκαν είτε από εμένα με τη συνεργασία ερευνητών του ΜΦΙΚ (19 υγρότοποι στην Κρήτη, 4 στην Πελοπόννησο, στη Νάξο, τη Ρόδο, τη Λάρισα, την Ιορδανία, τη Συρία και το Μαρόκο) είτε από άλλους ερευνητές χωρίς της δική μου παρουσία (Σκύρο, Κω, Χίο, Λέσβο, Αττική, Κερκίνη, Κύπρο, Ισπανία) (Παράρτημα Ι). Στον **πίνακα 2.1** φαίνονται συνολικά οι περιοχές δειγματοληψίας (43), ο αριθμός ατόμων (301) που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη από κάθε περιοχή και ο κωδικός κάθε περιοχής έτσι όπως χρησιμοποιείται στις αναλύσεις.

**Πίνακας 2.1.** Περιοχές δειγματοληψίας, αριθμός ατόμων και κωδικοποίηση του ονόματος κάθε περιοχής για τις αναλύσεις. Όλα τα δείγματα από τις περιοχές είναι *Mauremys rivulata* εκτός από όπου αναφέρεται διαφορετικά.

Περιοχή	Αριθμός ατόμων	Κωδικός
Κρήτη, Αλμυρός ποταμός	33	ALM
Κρήτη, Πόμπια	23	POM
Κρήτη, Θραψανό	23	THR
Κρήτη, Ακρωτήρι	1	AKR
Κρήτη, Γαύδος	27	GAV
Κρήτη, Γεωργιούπολη	7	GEO
Κρήτη, Αμουργέλλες	14	AMU
Κρήτη, Μπραμιανά	8	BRA
Κρήτη, Φραγκοκάστελλο	2	FRA
Κρήτη, Γέργερη	19	GER
Κρήτη, Ίνι	4	INI
Κρήτη, Σκινιάς	8	SKI
Κρήτη, Πάρτιρα	20	PAR
Κρήτη, Κουρνάς	4	KUR
Κρήτη, Πλακιώτισσα	15	PLA
Κρήτη, Πλακιάς	1	PLK
Κρήτη, Πρέβελη	5	PRE
Κρήτη, Κρύα Βρύση	2	VRY
Κρήτη, Ζάκρος	2	ZAK
Αιγαίο, Σκύρος	2	SKY
Αιγαίο, Σάμος	2	SAM
Αιγαίο, Νάξος	2	NAX
Αιγαίο, Ικαρία	1	IKA
Αιγαίο, Ρόδος	5	ROD
Αιγαίο, Κως	5	KOS
Αιγαίο, Λέσβος	7	LES
Αιγαίο, Χίος	2	CHI
Αττική, Μαραθώνας	8	MAR
Αττική, Νέα Μάκρη	5	MAK
Πελ/νησος, Παλαιοχώρι	3	PPA
Πελ/νησος, Κυπαρισσία	1	PKY
Πελ/νησος, Άργος	5	PAG
Πελ/νησος, Άραξος	2	PAX
Κερκίνη	14	KER
Λάρισα	2	LAR
Κύπρος	4	CYP

Περιοχή	Αριθμός ατόμων	Κωδικός
Ιορδανία (3 περιοχές)	6	JOR
Συρία ( <i>M. caspica</i> ) (2 περιοχές)	2	SYR
Ισπανία ( <i>M. leprosa</i> )	2	SPA
Μαρόκο ( <i>M. leprosa</i> )	3	MOR

Εκτός από πολύ λίγα ζώα τα οποία μεταφέρθηκαν στο Μουσείο Φυσικής Ιστορίας Κρήτης (ΜΦΙΚ) και κατατέθηκαν στις συλλογές του, τα ζώα απελευθερώθηκαν αφού πρωτίστως πραγματοποιήθηκε λήψη ψηφιακών φωτογραφιών και συλλογή ιστού για τις γενετικές αναλύσεις. Τμήμα των ιστών που δεν χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των γενετικών αναλύσεων κατατέθηκε στις συλλογές του ΜΦΙΚ σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης (-80°C) για μελλοντικές εργασίες.

Για τη σήμανση των ζώων ακολουθήθηκε το σύστημα αρίθμησης των Ernst *et al.* (1974), που βασίζεται στη δημιουργία μικρών τρυπών στις περιφερειακές πλάκες του καβουκιού. Οι τρύπες γίνονταν με ένα μικρό τρυπάνι διαμέτρου 1mm.

Αρχικά γινόταν συλλογή αίματος, όμως η διαδικασία αυτή εγκαταλείφθηκε εξαιτίας του ότι ήταν πολύ χρονοβόρα και σε κάποιες περιπτώσεις οδυνηρή για το ίδιο το ζώο. Στη συνέχεια αντί για αίμα, γινόταν λήψη ενός ή δύο νύχια του ζώου. Τα νύχια είναι ένας ιστός που αποδείχθηκε πολύ κατάλληλος για εξαγωγή καλής ποιότητας DNA (Mantziou *et al.*, 2005). Παράλληλα είναι εντελώς ανώδυνο για το ζώο και δεν του δημιουργεί προβλήματα καθώς τα νύχια τους ξαναμεγαλώνουν σύντομα. Τα νύχια φυλάσσονταν σε σωληνάκια τύπου erpendorff με 96% αιθανόλη.

Η αναγνώριση των ζώων στο επίπεδο του είδους έγινε με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως αυτά περιγράφονται στους Fritz & Wischuf (1997) και αναφέρονται συνοπτικά στο κεφάλαιο της εισαγωγής.

## 2.2 Πληθυσμοί μελέτης

Όσον αφορά τις αναλύσεις των μιτοχονδριακών γονιδίων συμπεριλήφθηκαν όλες οι περιοχές/πληθυσμοί, με δυο άτομα από κάθε πληθυσμό εκτός από τις περιπτώσεις που αναφέρονται στον **πίνακα 2.2**. Συνολικά προσδιορίστηκαν οι αλληλουχίες σε 73 άτομα του είδους *M. rivulata*, 2 *M. caspica* και 5 *M. leprosa*.

**Πίνακας 2.2.** Πληθυσμοί από τους οποίους συμπεριλήφθηκαν περισσότερα ή λιγότερα από δυο άτομα στις αναλύσεις των μιτοχονδριακών γονιδίων

Περιοχή	Αριθμός ατόμων
Κρήτη, Ακρωτήρι	1
Κρήτη, Μπραμιανά	1
Κρήτη, Κουρνάς	1
Κρήτη, Πλακιάς	1
Κρήτη, Πρέβελη	1
Αιγαίο, Ικαρία	1
Αττική, Νέα Μάκρη	3
Πελ/νησος, Παλαιοχώρι	1
Πελ/νησος, Κυπαρισσία	1
Πελ/νησος, Άργος	3
Κερκίνη	1
Κύπρος	4
Ιορδανία (3 πληθυσμοί)	6
Μαρόκο ( <i>M. leprosa</i> )	3

Στις αναλύσεις των μικροδορυφορικών αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκαν όλοι οι διαθέσιμοι πληθυσμοί του *M. rivulata* όπως παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.1**.

## 2.3 Εργαστηριακές αναλύσεις

Οι εργαστηριακές αναλύσεις έλαβαν χώρα κυρίως στο Εργαστήριο Μοριακής Συστηματικής του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης (ΜΦΙΚ). Ένα μικρό μέρος των εργαστηριακών αναλύσεων που αφορούν την ανάλυση των μικροδορυφορικών τόπων έγιναν στο εργαστήριο “Molecular Systematics and Conservation Genetics Laboratory” υπό την επίβλεψη της

υπεύθυνης εργαστηρίου Dr. Gisella Caccone. Η ανάλυση των μιτοχονδριακών αλληλουχιών έλαβε χώρα στο “Laboratory of Analytical Biology (LAB)” του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας του Ινστιτούτου Smithsonian υπό την επίβλεψη των Dr. Kevin de Queiroz και Dr. Lee Weight, εκτός από ένα μικρό μέρος που έγινε στο ΜΦΙΚ σε συνεργασία με το Γονιδιωματικό Εργαστήριο του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Κρήτης (I.M.B.B. FO.R.T.H.).

### 2.3.1 Εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA

Για την εξαγωγή του ολικού γενωμικού DNA χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικά πρωτόκολλα, ανάλογα με τη φύση του βιολογικού δείγματος. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν είτε αίμα είτε νύχια συντηρημένα σε 96% αιθανόλη.

Για την εξαγωγή DNA από το αίμα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 4 λεπτά. Μετά την αφαίρεση της αιθανόλης, τοποθετήθηκαν για ξήρανση στους 37° C για μία ώρα. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το κλασικό πρωτόκολλο των Hillis *et al.* (1996), βάσει του οποίου αρχικά γίνεται πέψη του ιστού σε διάλυμα εξαγωγής με πρωτεΐνάση K, και στη συνέχεια το DNA εξάγεται με καθαρισμό μέσω φαινόλης και χλωροφόρμιου, ενώ τελικά κατακρημνίζεται είτε με ισοπροπανόλη είτε με απόλυτη αιθανόλη. Για τα δείγματα νυχιών, αρχικά τα νύχια θρυμματίστηκαν με χρήση υγρού αζώτου και στη συνέχεια η εξαγωγή έγινε με το πρωτόκολλο των Holmes & Bonner (1973), τροποποιημένο από τους Roulakakis *et al.* (2005). Ανεξάρτητα του τρόπου εξαγωγής του DNA, 2μl από το προϊόν της εξαγωγής ηλεκτροφορούνταν για 30min σε πήκτωμα αγαρόζης 1% που περιείχε 5-7% βρωμιούχο αιθίδιο. Από τη φωτογραφία που λαμβανόταν με έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδες φως, γινόταν εκτίμηση της ποσότητας και της ποιότητας του εξαγόμενου DNA.

### 2.3.2 Μιτοχονδριακά γονίδια

#### 2.3.2.1 Πολλαπλασιασμός των μιτοχονδριακών γονιδίων μέσω της PCR

Για τη διερεύνηση του φυλογεωγραφικού προτύπου του *M. rivulata* χρησιμοποιήθηκαν δύο μιτοχονδριακά γονίδια: τμήμα του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του κυτοχρώματος β (cyt *b*) και τμήμα της περιοχής ελέγχου αντιγραφής του μιτοχονδρίου (control region/ D-loop). Το cyt *b*, που αποτελεί ένα ταχέως εξελισσόμενο γονίδιο του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, είναι ένας πολύ καλός μοριακός δείκτης, και έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα σε μελέτες της γενετικής διαφοροποίησης και της εύρεσης φυλογεωγραφικών προτύπων τόσο σε ενδοειδικό επίπεδο όσο και μεταξύ συγγενικών ειδών (Avise *et al.*, 1987, Avise, 2000). Η επιλογή του δεύτερου γονιδίου έγινε αφού διαπιστώθηκε ότι το cyt *b* δεν ήταν ικανό να διαλευκάνει τις ενδοειδικές σχέσεις στο *M. rivulata*. Η D-loop στα περισσότερα σπονδυλωτά είναι πιο «γρήγορη» εξελικτικά σε σχέση με τις κωδικές μιτοχονδριακές και πυρηνικές περιοχές και, όπως το cyt *b*, έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα σε μελέτες εξελικτικών σχέσεων πολύ συγγενικών ατόμων (Lamb *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995; McMillan & Palumbi, 1997).

Για τον πολλαπλασιασμό κάθε γενετικού τόπου χρησιμοποιήθηκε ένα ζευγάρι καθολικών (γενικών) εκκινητών (universal primers), που πολλαπλασιάζουν το συγκεκριμένο γονίδιο σε μεγάλο εύρος ζωικών ομάδων. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και το μέγεθος του προϊόντος που παράγουν δίνονται στον **πίνακα 2.3**, ενώ οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων, δίνονται στον **πίνακα 2.4**.

**Πίνακας 2.3.** Τα γονίδια που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, το μέγεθος των προϊόντων τους και η πηγή προέλευσής τους.

Γονίδιο	Όνομα	Εκκινητές	Μέγεθος	Αναφορά
Cyt <i>b</i>	Glud-G	5'-TGA CTT GAA RAA CAA YCG TTG-3'	426bp	Palumbi, 1996
	CB-2	5'-CCC TCA GAA TGA TAT TTG TCC TCA-3'		
D-loop	LGL-283	5'-TAC ACT GGT CTT GTA AAC C-3'	490bp	Lamb <i>et al.</i> , 1991
	LGL-1115	5'-ATG ACC CTG AAG AAA GAA CCA G-3'		

**Πίνακας 2.4.** Οι συνθήκες των αντιδράσεων των PCR στα 2 ζεύγη εκκινήτων για τα δυο γονίδια που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Γονίδιο	Όνομα	Συνθήκες			Συγκέντρωση MgCl <sub>2</sub>
		Στάδιο	Θ °C	Χρόνος	
Cyt <i>b</i>	Glud-G	Denaturation	94	60 sec	1,5mM
	CB-2	Annealing	57	60 sec	
		Extension	72	60 sec	
D-loop	LGL-283	Denaturation	94	60 sec	1,5mM
	LGL-1115	Annealing	53	60 sec	
		Extension	72	60 sec	

### 2.3.2.2 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των προϊόντων της PCR

Όλες οι αλληλουχίες λήφθηκαν με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και των δυο κλώνων του προϊόντος της PCR. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του προϊόντος της PCR για τα γονίδια *cyt b* και D-loop, γινόταν από το διάλυμα της PCR, αφού προηγουμένως καθαριζόταν με τη βοήθεια του EXOSAP-IT (Usb corporation), χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR.

Για τις αντιδράσεις προσδιορισμού της αλληλουχίας που έγιναν στο Γονιδιωματικό Εργαστήριο του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Κρήτης χρησιμοποιήθηκε αυτοματοποιημένη συσκευή προσδιορισμού της αλληλουχίας τύπου PE-ABI 377. Το μεγαλύτερο μέρος των αντιδράσεων έγιναν από το τεχνικό προσωπικό του εργαστηρίου LAB του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας του Ινστιτούτου Smithsonian. Ο προσδιορισμός των αλληλουχιών γινόταν σε αυτοματοποιημένη συσκευή προσδιορισμού αλληλουχιών (3130x1 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

### 2.3.2.3 Στοιχισμός αλληλουχιών

Αφού έγινε προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος της PCR (sequencing), ακολούθησε η στοιχισμός (alignment) των αλληλουχιών με χρήση του προγράμματος CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997). Η στοιχισμός αποσκοπεί στον προσδιορισμό των ομόλογων θέσεων των αλληλουχιών, αφού με βάση τις διαφορές σε αυτές τις θέσεις υπολογίζονται οι εξελικτικές σχέσεις των υπό μελέτη αλληλουχιών. Συνεπώς, η στοιχισμός των αλληλουχιών είναι μια διαδικασία ζωτικής σημασίας για την εύρεση των

πραγματικών φυλογενετικών σχέσεων των υπό εξέταση ταξινομικών μονάδων (Collins *et al.* 1994, Gatesy *et al.* 1994).

#### 2.3.2.4 Φυλογενετική ανάλυση

##### 2.3.2.4.1 Ανεξάρτητη ή συνδυασμένη ανάλυση

Όταν έχουμε διαφορετικά σύνολα δεδομένων (όπως για παράδειγμα στην προκειμένη περίπτωση αλληλουχίες *cyt b* και D-loop) τίθεται το ερώτημα αν αυτά τα δεδομένα μπορούν να συνδυαστούν ή αν πρέπει να εφαρμόσουμε τις φυλογενετικές αναλύσεις ανεξάρτητα για κάθε σύνολο δεδομένων. Υπάρχουν ερευνητές που υποστηρίζουν το συνδυασμό των δεδομένων ανεξάρτητα από τη φύση τους (Kluge, 1989), πράγμα που όμως μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένες τοπολογίες (Bull *et al.*, 1993). Άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν την ανεξάρτητη ανάλυση (Miyamoto & Fitch, 1995), σύμφωνα με την οποία τα σύνολα των δεδομένων πρέπει να αναλύονται χωριστά και τα παραγόμενα δέντρα να συνδυάζονται σε συναινετικά δέντρα (consensus trees). Τέλος, μια τρίτη προσέγγιση είναι αυτή του συνδυασμού των δεδομένων υπό προϋποθέσεις (conditional combination), σύμφωνα με την οποία τα δεδομένα πρέπει να συνδυάζονται, εκτός και αν το καθένα υποστηρίζει διαφορετικό εξελικτικό σενάριο σε ό,τι αφορά τα μελετώμενα τάξα (Page & Holmes 1998). Για το σκοπό αυτόν, έχουν αναπτυχθεί διάφορες στατιστικές μέθοδοι που ελέγχουν εάν μπορούν να συνδυαστούν οι ανεξάρτητες ομάδες των δεδομένων μιας μελέτης, όπως ο Έλεγχος Ασυμφωνίας Μήκους (Incongruence Length Test, Farris *et al.*, 1995). Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε η στατιστική δοκιμασία των Farris *et al.* (1995) και αφού δεν υπέδειξε αντίθεση στο φυλογενετικό σήμα για τα δυο σύνολα δεδομένων, ακολουθήθηκε η τρίτη αυτή προσέγγιση (conditional combination).

##### 2.3.2.4.2 Έλεγχος ποιότητας φυλογενετικού σήματος και ομοπλασίας

Δεδομένου ότι ο αριθμός των νουκλεοτιδικών θέσεων που μπορούν να μεταλλαχθούν είναι πεπερασμένος, όσο μεγαλύτερη είναι η γενετική



απόσταση δύο ειδών (δηλαδή όσο πιο απομακρυσμένα εξελικτικά είναι τα είδη) τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα να συμβεί αλλαγή σε μία θέση στην οποία είχε συμβεί ήδη μια άλλη αλλαγή. Όταν παρατηρηθεί αυτό, τότε λέμε ότι έχουμε φτάσει σε κατάσταση κορεσμού των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων και ουσιαστικά σταματάει να ισχύει η γραμμική σχέση του χρόνου και της απόστασης δύο αλληλουχιών, με αποτέλεσμα να αλλοιώνεται η ποιότητα της φυλογενετικής πληροφορίας που κρύβουν οι αλληλουχίες (Page & Holmes 1998). Ο πλέον αποδεκτός τρόπος ελέγχου της ομοπλασίας των δεδομένων μας είναι η κατασκευή ενός διαγράμματος διασποράς, στο οποίο απεικονίζεται η σχέση του αριθμού των μεταπτώσεων και των μεταστροφών σε σχέση με τη γενετική απόσταση των αλληλουχιών. Αν ο αριθμός των μεταπτώσεων ή των μεταστροφών δεν αυξάνει γραμμικά με τη γενετική απόσταση, τότε υπάρχει ισχυρή ένδειξη για ομοπλασία στα δεδομένα (Nei & Kumar 2000). Με χρήση του προγράμματος PAUP v.4.0b10 (Swofford, 2002) υπολογίστηκε για κάθε γονίδιο χωριστά ο απόλυτος αριθμός των μεταπτώσεων και των μεταστροφών που παρουσιάζονται μεταξύ κάθε ζεύγους αλληλουχιών, προκειμένου να εκτιμηθεί κατά πόσο τα δεδομένα εμφανίζουν κορεσμό υποκαταστάσεων μέσω του γραφήματος των μεταπτώσεων και μεταστροφών σε συνάρτηση με τη γενετική απόσταση  $p$ . Για την κατασκευή των διαγραμμάτων διασποράς χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Excel.

Τέλος, εφαρμόστηκε ένας επιπλέον έλεγχος για να διαπιστωθεί αν οι υπό εξέταση νουκλεοτιδικές αλληλουχίες ενσωμάτωναν ή όχι σημαντικό ποσοστό φυλογενετικής πληροφορίας. Σύμφωνα με τον Huelsenbeck (1991), όταν τα δεδομένα είναι συνεπή προς μια φυλογενετική υπόθεση τότε τα μήκη των τυχαίων δένδρων που προκύπτουν από αυτά τα δεδομένα ακολουθούν κατανομή η οποία είναι ασύμμετρη προς τα αριστερά. Αντίθετα, όταν τα δεδομένα στηρίζουν πολλές εναλλακτικές υποθέσεις, τότε η κατανομή των μηκών των δένδρων είναι συμμετρική και δεν ξεχωρίζει από αυτή που θα έδινε ένα σύνολο τυχαίων δεδομένων. Για τον έλεγχο της ποιότητας του φυλογενετικού σήματος κατασκευάστηκαν 1.000.000 τυχαία δένδρα με τη

βοήθεια του φυλογενετικού προγράμματος PAUP (v.4.0b10, Swofford 2002). Η ασυμμετρία ( $g_1$ ) της κατανομής του μήκους των δένδρων υπολογίστηκε και η τιμή της συγκρίθηκε με αυτές που περιγράφονται στη δοκιμασία των Hillis & Huelsenbeck (1992).

#### 2.3.2.4.3 Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων

Η απλούστερη μέτρηση της απόστασης δύο νουκλεοτιδικών αλληλουχιών είναι η καταμέτρηση του αριθμού των νουκλεοτιδικών θέσεων στις οποίες οι δύο αυτές αλληλουχίες διαφέρουν (απόσταση  $p$ ), η οποία εκφράζεται ως το ποσοστό  $p$  των νουκλεοτιδικών θέσεων στις οποίες οι δυο αλληλουχίες είναι διαφορετικές. Όμως στις περιπτώσεις που ο εξελικτικός ρυθμός είναι μεγάλος, η απόσταση  $p$  υποεκτιμά ουσιαστικά την απόσταση των δυο αλληλουχιών (Page & Holmes, 1998). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι όσο αυξάνει ο βαθμός διαφοροποίησης μεταξύ δυο αλληλουχιών, τόσο αυξάνει και η πιθανότητα η ίδια νουκλεοτιδική θέση να έχει υποστεί πολλαπλές μεταλλάξεις και να έχει επανέλθει στην αρχική της κατάσταση, έχοντας στην ουσία αποκρύψει μεγάλο βαθμό διαφοροποίησης μεταξύ των αλληλουχιών (Nei & Kumar, 2000). Για το λόγο αυτόν έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που είναι γνωστές ως τεχνικές διόρθωσης των αποστάσεων, και έχουν ως στόχο να «διορθώσουν» τις παρατηρούμενες αποστάσεις εκτιμώντας το ποσοστό της γενετικής διαφοροποίησης που έχει καλυφθεί λόγω πολλαπλών αλλαγών σε μια νουκλεοτιδική θέση. Οι περισσότερες μέθοδοι διόρθωσης των αποστάσεων συσχετίζονται μεταξύ τους και διαφέρουν μόνο στον αριθμό των παραμέτρων που προσπαθούν να συμπεριλάβουν. Ορισμένες επιτρέπουν την ύπαρξη διαφορετικών νουκλεοτιδικών συχνοτήτων, άλλες δίνουν τη δυνατότητα για διαφορετική πιθανότητα εμφάνισης των διαφόρων τύπων νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων, ή λαμβάνουν υπόψη τη διακύμανση του ρυθμού υποκατάστασης μεταξύ διαφορετικών νουκλεοτιδικών θέσεων (Felsenstein, 2004). Η επιλογή του μοντέλου εκτίμησης της γενετικής απόστασης δεν είναι απλή υπόθεση. Προϋποθέτει εμπειρία και κριτική στάση απέναντι στα δεδομένα που έχει κάποιος στα χέρια του, και συχνά αποτελεί αρκετά

χρονοβόρα διαδικασία. Σύμφωνα με τους Kumar *et al.* (1993), εάν δύο μοντέλα εκτίμησης γενετικών αποστάσεων δίνουν παρόμοιες τιμές για ένα σύνολο δεδομένων, χρησιμοποιούμε το πιο απλό από αυτά, εξαιτίας του ότι το απλούστερο θα έχει μικρότερη διασπορά.

Οι γενετικές αποστάσεις (ανά ζεύγη) των αλληλουχιών εκτιμήθηκαν με βάση το διπαραμετρικό μοντέλο Kimura-2 parameters (K2P, Kimura, 1980) και με το μοντέλο που επιλέχθηκε μετά τη δοκιμασία του λόγου των πιθανοφανειών (Likelihood Ratio Test, LRT), που περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο. Τα φυλογενετικά προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποστάσεων είναι το MEGA (v 2.1, Kumar *et al.*, 2001) και το PAUP (v.4.0b10, Swofford, 2002).

#### 2.3.2.4.4 Επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου εξέλιξης

Το αποτέλεσμα των διαφορών φυλογενετικών μεθόδων εξαρτάται άμεσα από το μοντέλο που χρησιμοποιούν για την εκτίμηση των εξελικτικών αποστάσεων, αφού αυτές οι μέθοδοι κάνουν παραδοχές σε ό,τι αφορά τις νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις των αλληλουχιών (Felsenstein, 1988). Για να υπάρχει αξιοπιστία στα συμπεράσματα των φυλογενετικών αναλύσεων, είναι αναγκαία η αξιοπιστία του μοντέλου εξέλιξης (Goldman, 1993). Έτσι, όλες οι φυλογενετικές μέθοδοι που βασίζονται σε σαφή μοντέλα εξέλιξης θα πρέπει να εξεταστούν ώστε να βρεθεί ποιο εξελικτικό μοντέλο ταιριάζει καλύτερα στο συγκεκριμένο σύνολο δεδομένων που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση, ώστε να δικαιολογείται και η χρήση του (Posada & Crandall, 1998). Για την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου εξέλιξης νουκλεοτιδικής υποκατάστασης εφαρμόστηκε η δοκιμασία του λόγου των πιθανοφανειών (Likelihood Ratio Test, LRT) με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος ModelTest v. 3.5 (Posada & Crandall, 1998) και του PAUP v.4.0b10 (Swofford, 2002), το οποίο έχει τη δυνατότητα να επιλέξει ανάμεσα σε 56 διαφορετικά μοντέλα ποιο είναι αυτό που ταιριάζει καλύτερα με το αντίστοιχο σύνολο των αλληλουχιών. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας το μοντέλο και τις παραμέτρους που επιλέχθηκαν από το LRT ως αρχικές παραμέτρους στην ανάλυση μέγιστης πιθανοφάνειας

με το πρόγραμμα PAUP, ακολουθήθηκε η μέθοδος της διαδοχικής προσέγγισης (successive approximation, Sullivan *et al.*, 2005) ώστε να καταλήξουμε τελικά στις βέλτιστες παραμέτρους. Αυτό ξέρουμε ότι το πετύχαμε όταν σε δυο διαδοχικές αναζητήσεις καταλήξουμε στις ίδιες τιμές παραμέτρων (Sullivan *et al.*, 2005).

#### 2.3.2.4.5 Μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης και στατιστικός έλεγχος των παραγόμενων δέντρων

Το σύνολο των δεδομένων υποβλήθηκαν σε ανάλυση Σύνδεσης Γειτόνων (NJ, Neighbor-Joining), Μέγιστης Φειδωλότητας (MP, Maximum Parsimony), Μέγιστης Πιθανοφάνειας (ML, Maximum Likelihood) και Μπεϊεσιανή Συμπερασματολογία (BI, Bayesian Inference). Στη BI «αναλύθηκαν» 4 ανεξάρτητες αλυσίδες με  $10^7$  επαναλήψεις (γενεές) σε κάθε αλυσίδα, οι πρώτες  $10^5$  εκ των οποίων αγνοήθηκαν ως περίοδος «burn-in». Όλα τα φυλογενετικά δένδρα, πλην του ML και BI, εξετάστηκαν ως προς τη στατιστική τους ισχύ με τη δοκιμασία bootstrap. Το πλήθος των ψευδοδειγμάτων στη δοκιμασία bootstrap ήταν 1000 σε όλες τις μεθόδους. Για καθαρά υπολογιστικούς λόγους δεν εφαρμόστηκε η δοκιμασία bootstrap στην ML ανάλυση, αλλά η ισχύς του ML δέντρου επιβεβαιώθηκε έμμεσα από τη συμφωνία του με την BI ανάλυση. Τα φυλογενετικά προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: MEGA (v 2.1, Kumar *et al.*, 2001), PAUP (v.4.0b10, Swofford, 2002) και MrBayes (v. 3.0B4, Ronquist & Huelsenbeck, 2003).

Τέλος, με χρήση του προγράμματος TCS (version 1.21, Clement *et al.*, 2000) κατασκευάστηκε δίκτυο απλοτύπων (Haplotype Network) με σκοπό την διεξαγωγή Ανάλυσης Εγκιβωτισμένων Κλάδων (NCA, Nested Clade Analysis). Η μέθοδος αυτή δίνει τη δυνατότητα αποσαφήνισης της πληθυσμιακής δομής από την πληθυσμιακή ιστορία ανοικοδομώντας τη χρονική ακολουθία των γεγονότων που οδήγησαν στο τρέχον γενετικό πρότυπο που παρατηρείται σε έναν πληθυσμό (Templeton *et al.*, 1992; Templeton, 1998). Εισάγουμε στο TCS το αρχείο με τις νουκλεοτιδικές

αλληλουχίες (σε μορφή nexus), τις οποίες το πρόγραμμα μετατρέπει σε απλότυπους (πανομοιότυπες αλληλουχίες εντάσσονται στον ίδιο απλότυπο), υπολογίζοντας παράλληλα τις συχνότητες των απλοτύπων στο δείγμα. Στη συνέχεια κατασκευάζεται ένας πίνακας αποστάσεων για όλα τα ζεύγη απλοτύπων με βάση τον οποίο υπολογίζεται ο αριθμός των μεταλλακτικών διαφορών, δηλαδή ο μέγιστος αριθμός βημάτων που συνδέουν φειδωλά δυο απλότυπους. Με βάση τη συχνότητα και τη θέση του κάθε απλοτύπου στο παραγόμενο δίκτυο υπολογίζεται η ρίζα του δικτύου, δηλαδή ο απλότυπος που πιθανώς είναι ο πιο προγονικός.

Όμως το δίκτυο απλοτύπων που προέκυψε εμπειρίειχ πάρα πολλές πολλαπλές συνδέσεις (loops) ώστε ήταν αδύνατη η διεξαγωγή της ανάλυσης NCA. Οι πολλαπλές συνδέσεις υποδηλώνουν αμφισβητούμενες σχέσεις μεταξύ των απλοτύπων. Στα αποτελέσματα παρουσιάζεται ενδεικτικά το δίκτυο απλοτύπων μόνο για το *cyt b*. Τα αντίστοιχα δίκτυα τόσο για την D-loop όσο και για τη συνδυασμένη ανάλυση ήταν πολύ πιο πολύπλοκα και δύσκολο να παρασταθούν γραφικά με τρόπο ώστε να φαίνονται όλες οι συνδέσεις.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχες αλληλουχίες από τη βάση γενετικών δεδομένων GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Παρακάτω δίνονται οι κωδικοί πρόσβασης στην GenBank και οι εργασίες στις οποίες είναι δημοσιευμένες οι αλληλουχίες. Για το *Mauremys rivulata* χρησιμοποιήθηκε αλληλουχία του *cyt b* του είδους από την Τουρκία (**AJ564455**, Barth *et al.*, 2004). Δεν υπήρχε διαθέσιμη αντίστοιχη αλληλουχία για την περιοχή ελέγχου (D-loop). Ως παραομάδες (outgroups) για το γένος *Mauremys* χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχες αλληλουχίες των ειδών *Geoemyda spengleri* και *Testudo marginata*. Οι κωδικοί τους είναι οι εξής: *Geoemyda spengleri*- **AJ564449** (Barth *et al.*, 2004) και *Testudo marginata*- **NC007698** (Parham *et al.*, 2006). Το είδος *Geoemyda spengleri* είναι από τα πιο κατάλληλα για χρήση ως παραομάδα μιας και ανήκει στο βασικό κλαδί της οικογένειας Geoemydidae (Spinks *et al.*, 2004). Το είδος *T. marginata* χρησιμοποιήθηκε γιατί στην περίπτωση της περιοχής ελέγχου (D-loop) δεν υπήρχαν διαθέσιμες

αλληλουχίες για είδη της οικογένειας *Geoemydidae*, οπότε επιλέχθηκε ένα είδος της οικογένειας *Testudinidae*, που είναι η πιο συγγενική. Η ανάκτηση δειγμάτων κάποιου είδους της οικογένειας *Geoemydidae*, ώστε να γίνει προσδιορισμός αλληλουχιών από εμένα ήταν πράγμα αδύνατο, αφού πρόκειται για είδη της Ανατολικής Ασίας, τα περισσότερα μάλιστα από τα οποία είναι σε καθεστώς αυστηρής προστασίας. Έτσι, στη συνδυασμένη ανάλυση που παρουσιάζεται εδώ χρησιμοποιήθηκε η αντίστοιχη αλληλουχία της *G. spengleri* για το *cyt-b* και οι αλληλουχίες της *T. marginata* για το *cyt-b* και την *D-loop*.

Για τη γραφική αναπαράσταση όλων των δέντρων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα TreeView (version 1.6.6) και για την περαιτέρω επεξεργασία όλων των δέντρων και διαγραμμάτων το πρόγραμμα Corel Draw (version 11).

#### 2.3.2.4.6 Έλεγχος της ομοιογένειας του εξελικτικού ρυθμού

Υπάρχουν δυο κατηγορίες μεθόδων για τον έλεγχο του κατά πόσο οι εξεταζόμενες αλληλουχίες εξελίσσονται με τον ίδιο ρυθμό. Η μια κατηγορία εξετάζει αν μια γενεαλογική γραμμή εξελίσσεται με τον ίδιο ή διαφορετικό ρυθμό σε σχέση με κάποια άλλη (Έλεγχοι Σχετικού Ρυθμού ή Relative Rate Test). Η προσέγγιση αυτή, όμως, δεν λαμβάνει υπόψη κάποιο συγκεκριμένο μοντέλο και έτσι αγνοεί τις πολλαπλές υποκαταστάσεις, οι οποίες αλλοιώνουν την εικόνα των παρατηρούμενων αλλαγών. Η άλλη κατηγορία μεθόδων εξετάζει την ομοιογένεια ή όχι του εξελικτικού ρυθμού σε ένα σύνολο εξεταζόμενων αλληλουχιών (Έλεγχοι Ετερογένειας του Ρυθμού ή Rate Heterogeneity Tests). Η πιο κλασική μέθοδος αυτής της κατηγορίας είναι ο έλεγχος του λόγου των πιθανοφανειών (Likelihood Ratio Test, Felsenstein 1981, 1988).

Για τον έλεγχο της ομοιογένειας του εξελικτικού ρυθμού μέσα στους κλάδους του γένους *Mauremys* εφαρμόστηκε η δοκιμασία του λόγου των πιθανοφανειών (Likelihood Ratio Test, LRT) με τη βοήθεια του φυλογενετικού προγράμματος PAUP (v.4.0b10, Swofford, 2002).

2.3.2.4.7 Συσχέτιση της γενετικής διαφοροποίησης με τη γεωγραφική απόσταση των πληθυσμών

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η γενετική απόσταση των πληθυσμών συμμεταβάλλεται με τη γεωγραφική τους απόσταση (απομόνωση λόγω απόστασης), εφαρμόστηκε η μη-παραμετρική δοκιμασία του Mantel (1967) με τη βοήθεια του προγράμματος Mantel (version 2, Liedloff, 1999). Με τη δοκιμασία αυτή, οι τιμές δυο πινάκων που έχουν υπολογιστεί ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο, εξετάζονται ως προς την συσχέτιση των στοιχείων τους, η οποία εκφράζεται με το συντελεστή συσχέτισης  $r$ . Στην περίπτωση μας τα ζεύγη των πινάκων που εξετάζονται είναι ο πίνακας των γεωγραφικών αποστάσεων μεταξύ των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και των γενετικών τους αποστάσεων όπως αυτές υπολογίστηκαν με βάση το διπαραμετρικό μοντέλο Kimura-2 parameters (K2P, Kimura, 1980). Έγινε ξεχωριστός έλεγχος για το *cyt b* και την D-loop. Οι γεωγραφικές αποστάσεις υπολογίστηκαν ως η απόσταση μεταξύ των σημείων που ορίζουν οι γεωγραφικές συντεταγμένες των πληθυσμών με τη χρήση του προγράμματος ArcView (version 8.2).

2.3.3 Μικροδορυφορικοί δείκτες

2.3.3.1 Ανάπτυξη βιβλιοθήκης μικροδορυφορικών δεικτών για το είδος *M. rivulata*

Η ανάπτυξη βιβλιοθήκης μικροδορυφορικών δεικτών είναι μια δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία, κατά την οποία γίνεται εύρεση μικροδορυφορικών τόπων μέσα στο γονιδίωμα ενός συγκεκριμένου οργανισμού. Τα μικροδορυφορικά τμήματα συνήθως εμφανίζονται σε μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος, όπου ο ρυθμός υποκατάστασης των νουκλεοτιδίων είναι πολύ υψηλότερος από ό,τι σε κωδικές περιοχές. Έτσι, η ανάπτυξη καθολικών εκκινητών (universal primers), όπως στην περίπτωση του mtDNA, είναι συχνά προβληματική για τους μικροδορυφορικούς δείκτες. Ως αποτέλεσμα, οι μικροδορυφορικοί τόποι θα πρέπει να απομονώνονται εκ νέου για τα περισσότερα είδη που μελετώνται για πρώτη φορά (Zane *et al.*,

2002). Παρόλα αυτά, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ύπαρξης συντηρημένων περιοχών που περιβάλλουν τους μικροδορυφορικούς τόπους και δίνουν τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού με PCR ομόλογων περιοχών σε συγγενικά τάξα (FritzSimmons *et al.*, 1995; Rico *et al.*, 1996; Palkovacs *et al.*, 2003; King & Julian, 2004). Όμως αυτό δεν διασφαλίζει ότι οι τόποι που εμφανίζουν υψηλό πολυμορφισμό στο είδος για το οποίο έχουν σχεδιαστεί θα εμφανίζουν και αντίστοιχα υψηλό πολυμορφισμό και για συγγενικά του είδη (Rubinsztein *et al.*, 1995; Morin *et al.*, 1998; Rubinsztein *et al.*, 1999). Έτσι λοιπόν στην προκειμένη περίπτωση αναπτύχθηκε μια εμπλουτισμένη γενωμική βιβλιοθήκη για την εύρεση πολυμορφικών μικροδορυφορικών τόπων για το είδος *Mauremys rivulata*.

Η βιβλιοθήκη αναπτύχθηκε με βάση ήδη δημοσιευμένα πρωτόκολλα (Kijas *et al.*, 1994; Hamilton *et al.*, 1999), με κάποιες τροποποιήσεις (Mantziou *et al.*, 2005). Η εμπλουτισμένη βιβλιοθήκη προκύπτει από μια τεχνική με την οποία αποφεύγεται ο προσδιορισμός της αλληλουχίας μεγάλου πλήθους κλώνων, καθώς η επιλογή των κλώνων που εμπεριέχουν μικροδορυφορικές αλληλουχίες γίνεται νωρίτερα (Hamilton *et al.*, 1999; Zane *et al.*, 2002). Παρακάτω περιγράφεται συνοπτικά η διαδικασία, κατά την οποία έλαβε χώρα προσπάθεια εύρεσης δινουκλεοτιδικών μικροδορυφορικών αλληλουχιών τύπου GA και AC. Καταρχάς, γίνεται εξαγωγή του ολικού γενωμικού DNA, όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.1. Στη συνέχεια γίνεται πέψη του DNA με τα περιοριστικά ένζυμα *AluI*, *HaeIII* και *RsaI*. Μετά την πέψη ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης 2% και επιλέγονται κομμάτια των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται από 200 έως 800 bp (κόψιμο και καθαρισμός της ζώνης από 200-800bp). Στη συνέχεια, γίνεται πρόσδεση δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών (SNX-linker, Hamilton *et al.*, 1999) στα άκρα κάθε κομματιού και υβριδοποίηση με 5'-βιοτινυλιωμένους εκκινητές (GA)<sub>10</sub> και (AC)<sub>8</sub>. Κατά τη διαδικασία αυτή οι βιοτινυλιωμένοι εκκινητές θα προσδεθούν στα κομμάτια εκείνα που περιέχουν μικροδορυφορικές επαναλήψεις (GA) και (AC). Αφού γίνει αποδιάταξη των τεμαχίων του DNA, ώστε να βρεθούν σε μονόκλωνη μορφή,



προσθέτουμε στο διάλυμα μαγνητικά σφαιρίδια σιδήρου (Promega), που είναι επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη, η οποία προσδένεται στη βιοτίνη των εκκινητών. Με τον τρόπο αυτόν, τα μαγνητικά σφαιρίδια βρίσκονται προσδεμένα στα κομμάτια του DNA που περιέχουν μικροδορυφορικές επαναλήψεις. Με τη χρήση ενός μαγνήτη απομονώνουμε από το μείγμα μόνο εκείνα τα κομμάτια του DNA που εμπεριέχουν τις επαναλήψεις (GA) και (AC). Ακολουθεί πολλαπλασιασμός και μετατροπή του εμπλουτισμένου DNA από μονόκλωνο σε δίκλωνο μέσω της PCR, όπου ως εκκινητής χρησιμοποιείται η αλληλουχία του linker που αναφέρθηκε παραπάνω (SNX-linker, Hamilton *et al.*, 1999). Για την πιστοποίηση της επιτυχίας της αντίδρασης, 5μl από το προϊόν της PCR ηλεκτροφορούνται για 50min σε πήκτωμα αγαρόζης 1% που περιείχε 5% βρωμιούχο αιθίδιο. Ακολουθεί καθαρισμός του προϊόντος της PCR και εισαγωγή του εμπλουτισμένου DNA σε φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο) pGEM-T vector (Promega). Αμέσως μετά γίνεται μετασηματισμός σε βακτηριακά κύτταρα τύπου *Escherichia coli* (*E.coli*, JM109 competent cells, Promega) και καλλιέργεια αυτών σε τρυβλία πετρί, τα οποία περιέχουν θρεπτικό υλικό με αμπικιλίνη και επίστρωση X-Gal. Από την καλλιέργεια αναμένουμε δυο τύπους αποικιών: λευκές και μπλε. Οι λευκές αποικίες είναι τα βακτήρια που περιέχουν το ενσωματωμένο πλασμίδιο με το ένθεμα [επαναλήψεις (GA) και (AC)]. Οι μπλε αποικίες είναι τα βακτήρια που περιέχουν το ενσωματωμένο πλασμίδιο, αλλά στο οποίο δεν έχει εισαχθεί το ένθεμα και για το λόγο αυτό μεταβολίζουν το X-Gal και δίνουν το μπλε χρώμα. Γίνεται λοιπόν επιλογή των λευκών αποικιών και περαιτέρω καλλιέργειά τους. Αφού γίνει εξαγωγή πλασμιδίου ακολουθεί έλεγχος των αποικιών για την παρουσία μικροδορυφορικών αλληλουχιών με τη μέθοδο της τριπλής PCR, όπου χρησιμοποιούνται οι δυο εκκινητές του πλασμιδίου (T7 και SP6) και ένας εκκινητής (μη-βιοτινυλιωμένος) (GA)<sub>10</sub> ή (AC)<sub>8</sub>. 2μl των προϊόντων της PCR ηλεκτροφορούνται για 50min σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% που περιείχε 5% βρωμιούχο αιθίδιο. Έγινε επιλογή εκείνων των προϊόντων PCR που δίνουν τουλάχιστον δυο ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης και κατόπιν προσδιορισμός της αλληλουχίας τους σε αυτόματο αναλυτή τύπου LI-COR

4200L στο εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB-FORTH, Ηράκλειο, Κρήτη).

### 2.3.3.2 Έλεγχος πολυμορφισμού

Κατά την απομόνωση μικροδορυφορικών τόπων είναι πιθανό να προκύψουν τόποι οι οποίοι δεν είναι κατάλληλοι για τη μελέτη μας. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε γιατί δεν μπορούν να σχεδιαστούν κατάλληλοι εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό των τόπων (π.χ. οι επαναλήψεις είναι στο τέλος της αλληλουχίας), είτε γιατί οι τόποι δίνουν παραπροϊόντα κατά τον πολλαπλασιασμό τους, είτε τέλος γιατί οι τόποι μπορεί να μην είναι πολυμορφικοί. Μετά την απομόνωση των μικροδορυφορικών τόπων σχεδιάστηκαν εκκινητές ώστε να είναι δυνατός ο πολλαπλασιασμός τους με τη μέθοδο της PCR. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με το δικτυακό πρόγραμμα PRIMER version 3.0 (<http://www.genome.wi.mit.edu>) στην παράπλευρη περιοχή των επαναλήψεων με στόχο να καταλήξουμε σε προϊόντα μεγέθους από 100 – 250bp.

Για τον έλεγχο του πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκαν 10 πληθυσμοί από την Ελλάδα με ελάχιστο αριθμό 23 ατόμων. Οι αναλύσεις τόσο για τον έλεγχο του πολυμορφισμού όσο και για το σύνολο των πληθυσμών περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

### 2.3.3.3 Πολλαπλασιασμός των μικροδορυφορικών αλληλουχιών μέσω της μεθόδου PCR

Μετά και τον έλεγχο πολυμορφισμού προέκυψαν έξι κατάλληλοι μικροδορυφορικοί τόποι. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των τόπων αυτών και το μέγεθος του προϊόντος που παράγουν δίνονται στον **πίνακα 2.5**, ενώ οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για κάθε τόπο δίνονται στον **πίνακα 2.6**.

**Πίνακας 2.5.** Οι μικροδορυφορικοί τόποι που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, η σύνθεσή τους, οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, και το εύρος του μεγέθους των προϊόντων τους. Κάτω από την ονομασία κάθε τόπου δίνεται σε αγκύλη ο αριθμός πρόσβασης στη γενετική βάση δεδομένων GenBank, όπου έχουν κατατεθεί οι αλληλουχίες κατά την περιγραφή των μικροδορυφορικών τόπων (Mantziou *et al.*, 2005).

<b>Τόποι</b> [GenBank ID]	<b>Μικροδορυφορική Σύνθεση</b>	<b>Εκκινητές (5'-3')*</b>	<b>Εύρος μεγέθους προϊόντων (bp)</b>
<b>MR-1</b> [AY934859]	(AC) <sub>11</sub>	L:5'-FAM-TTTCTGCACCTGCTTAACTT R:5'-CTCATGGAGGTGGTGTACT	222-238
<b>MR-2</b> [AY934860]	(AC) <sub>9</sub>	L:5'-TET-ACGGAATCCTGATTAATTCC R:5'-CTTCCCTCAATACAATGGTT	155-239
<b>MR-3</b> [AY934861]	(GT) <sub>8</sub>	L:5'-TET-CATTTTCTTTATCGCCTCAC R:5'-CTTTCACAGCACAAAGTCTCA	181-193
<b>MR-5</b> [AY934862]	(GA) <sub>18</sub>	L:5'-TET-TCTAGGGTCGCCCTGTAGG R:5'-CTGGGAATGTTCTGCGGTTG	143-189
<b>MR-8</b> [AY934863]	(GT) <sub>32</sub> (GA) <sub>12</sub>	L:5'-TET-TGCCCTCTGATGCTCTGGTG R:5'-GCCCAAATGTCTACAACCTGTGG	126-194
<b>MR-9</b> [AY934864]	(CT) <sub>16</sub>	L: 5'-FAM-CCAATGCTCCAGGCGTG R:5'-GCCAGTCTTACTGCTGAACC	85-105

\*L: εμπρόσθιος εκκινητής, R: ανάστροφος εκκινητής

**Πίνακας 2.6.** Οι βέλτιστες θερμοκρασίες υβριδοποίησης των αντιδράσεων των PCR για τους μικροδορυφορικούς τόπους που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

<b>Μικροδορυφορικοί Τόποι</b>	<b>Θερμοκρασία Υβριδοποίησης, Ta (°C)</b>
<b>MR-1</b>	56
<b>MR-2</b>	52
<b>MR-3</b>	55
<b>MR-5</b>	62
<b>MR-8</b>	62
<b>MR-9</b>	55,5

Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις για τα επιμέρους αντιδραστήρια της PCR ήταν για όλους τους τόπους οι παρακάτω: σε τελικό όγκο αντίδρασης 10μl εμπεριέχονται περίπου 200ng DNA, 0,5μM του κάθε εκκινητή, 1x ρυθμιστικό διάλυμα της PCR (PCR buffer), 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 300μl dNTPs και 0,2 U Taq

DNA πολυμεράση (Promega). Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών χρησιμοποιήθηκε θερμικός κυκλοποιητής με δυνατότητα διαβάθμισης της θερμοκρασίας υβριδοποίησης (Ta) (Bio-Rad-Gradient Thermocycler: MyCycler™ Thermal Cycler).

#### 2.3.3.4 Οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων και προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων της PCR

Μετά το πέρας των αντιδράσεων PCR, τα προϊόντα αναμείχθηκαν με χρωστική dextran blue (loading dye), φορμαμίδη και αλληλουχία γνωστού μεγέθους (size standard) Gene-Scan-500 TAMRA (Applied Biosystems). Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήγμα ακρυλαμίδης 6% σε αυτοματοποιημένο αναλυτή αλληλουχιών τύπου ABI 377 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Η διάρκεια κάθε ηλεκτροφόρησης ήταν 150 min. Η συλλογή και αποθήκευση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα GENESCAN™ Fragment Analysis. Το ακριβές μέγεθος των αλληλομόρφων προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος GENOTYPER (Applied Biosystems).

#### 2.3.3.5 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τα μεγέθη των αλληλομόρφων που προσδιορίστηκαν για κάθε άτομο και για κάθε τόπο χωριστά καταγράφηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Excel (Microsoft Office) για να χρησιμοποιηθούν στις περαιτέρω στατιστικές αναλύσεις. Με τη χρήση του προγράμματος GENETIX (version 4.04, Belkhir *et al.*, 2000), υπολογίστηκαν οι αλληλικές συχνότητες, η μέση παρατηρούμενη ( $H_o$ ) και αναμενόμενη ( $H_e$ ) ετεροζυγωτία (nonbiased expected heterozygosity, Nei, 1978), ο αριθμός αλληλομόρφων ανά τόπο και οι τιμές  $F_{st}$  (Weir & Cockerham, 1984), που μας δίνουν μια εκτίμηση της γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών. Με χρήση του προγράμματος GENEPOP (version 3.4, Raymond & Rousset, 1995 και Genepop on the Web, Raymond & Rousset, 2004), πραγματοποιήθηκε έλεγχος ανισορροπίας σύνδεσης για τη στατιστική τεκμηρίωση του ανεξάρτητου διαχωρισμού των γενετικών τόπων. Η μηδενική

υπόθεση κατά τον έλεγχο αυτό είναι:  $H_0 =$  οι γονότυποι σε ένα γενετικό τόπο είναι ανεξάρτητοι από τους γονοτύπους ενός άλλου γενετικού τόπου. Στη συνέχεια έγινε έλεγχος πληθυσμιακής διαφοροποίησης με σκοπό τον ορισμό των διακριτών πληθυσμών. Ο έλεγχος εξετάζει την κατανομή των αλληλομόρφων στους υπό μελέτη πληθυσμούς και έχει ως μηδενική υπόθεση την  $H_0 =$  η κατανομή των αλληλομόρφων είναι ίδια για ζεύγη πληθυσμών. Με το ίδιο πρόγραμμα πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι απόκλισης από την ισορροπία Hardy-Weinberg. Η μηδενική υπόθεση στους ελέγχους αυτούς είναι η  $H_0 =$  τυχαία ένωση γαμετών. Έγιναν δυο έλεγχοι, ο πρώτος με εναλλακτική υπόθεση  $H_1 =$  έλλειμμα ετεροζυγωτίας και ο δεύτερος με  $H_1 =$  πλεόνασμα ετεροζυγωτίας. Το έλλειμμα ετεροζυγωτίας μπορεί να οφείλεται σε διάφορες αιτίες: α) στην ύπαρξη μηδενικών αλληλομόρφων (null alleles), που δεν πολλαπλασιάζονται κατά την αντίδραση της PCR, β) σε ομομιξία εντός των πληθυσμών (inbreeding) και γ) σε πληθυσμιακή υποδιαίρεση. Αντίθετα το πλεόνασμα ετεροζυγωτίας μπορεί να οφείλεται: α) σε φαινόμενα υπερκυριαρχίας (πλεονέκτημα του ετεροζυγώτη), β) στις συζεύξεις των ατόμων ενός πληθυσμού με άτομα άλλου πληθυσμού (outbreeding) και γ) σε φαινόμενο πληθυσμιακής στενωπού (bottleneck). Με το πρόγραμμα Micro-Checker (version 2.2.3, Shipley, 2003) έγινε έλεγχος για την πιθανότητα ύπαρξης μηδενικών αλληλομόρφων. Για την εξακρίβωση της ακριβούς αιτίας απόκλισης από την ισορροπία HW χρειάζονται επιπρόσθετα στοιχεία δημογραφίας.

Με το πρόγραμμα GENETIX έγινε στη συνέχεια Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών (CA) με την απόσταση  $\chi^2$ - Benzecri (Benzecri, 1973). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, αρχικά πραγματοποιείται μετασχηματισμός των γονοτύπων των ατόμων για τους υπό μελέτη γενετικούς τόπους σε πίνακα συνάφειας. Έτσι δημιουργείται ένας πολλαπλός πίνακας συνάφειας (multiple contingency table). Στη συνέχεια πραγματοποιείται σύνδεση του παραπάνω πίνακα με νέφος σημείων τοποθετημένων σε χώρο K- διαστάσεων ( $R^k$ ). Η μέτρηση της σχέσης μεταξύ δυο οποιονδήποτε σημείων του χώρου  $R^k$  γίνεται με την απόσταση  $\chi^2$ - Benzecri, και χρησιμοποιείται για την Ανάλυση

Συνιστωσών (Benzecri, 1973; She *et al.*, 1987). Το τελικό αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι ένα τρισδιάστατο γράφημα, όπου η τελική θέση του κάθε ατόμου- σημείου καθορίζεται από το γονότυπο του ατόμου αυτού σε όλους τους υπό μελέτη μικροδορυφορικούς τόπους.

Με τη βοήθεια του προγράμματος “GENEPOP on the WEB” (Raymond & Rousset, 2004) προκειμένου να διαπιστωθεί αν η γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών συµμεταβάλλεται με τη γεωγραφική τους απόσταση (απομόνωση λόγω απόστασης, IBD) εφαρµόστηκε η δοκιµασία του Mantel (1967). Για τον έλεγχο IBD χρησιµοποιήθηκαν οι τιμές  $F_{st}/(1 - F_{st})$  και οι νεπέριοι λογάριθμοι των γεωγραφικών αποστάσεων µεταξύ των πληθυσµών. Η µηδενική υπόθεση που εξετάζεται κατά τον έλεγχο αυτό είναι:  $H_0 =$  οι δυο µεταβλητές (γενετική διαφοροποίηση και γεωγραφική απόσταση) είναι ανεξάρτητες µεταξύ τους.

Στη συνέχεια, µε το πρόγραµµα Populations (v.1.2.28, Langelle, 1999) υπολογίστηκαν οι γενετικές αποστάσεις  $D_{AS}$  (Allele-Sharing Statistic, Stephens *et al.*, 1992) και  $D_C$  (Chord distance, Cavalli-Sforza & Edwards, 1967), οι οποίες χρησιµοποιήθηκαν για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων µε τη µέθοδο Σύνδεσης Γειτόνων (Neighbour-Joining). Οι αποστάσεις αυτές είναι από τις πλέον κατάλληλες για την εξαγωγή φυλογενετικών συµπερασµάτων όταν µελετώνται πολύ συγγενικά είδη ή πληθυσµοί του ίδιου είδους (Bowcock *et al.*, 1994; Goldstein *et al.*, 1995; Takezaki & Nei, 1996). Για τις αποστάσεις  $D_C$ , η στατιστική ισχύς του φυλογενετικού δέντρου εξετάστηκε µε τη δοκιµασία bootstrap. Από το πρόγραµµα Microsat (1.5d; Minch *et al.* 1996) αναπαράχθηκε πλήθος ψευδοπινάκων (για έξι µικροδορυφορικούς τόπους το πλήθος των ψευδοπινάκων που µπορεί να αναπαραχθεί ανέρχεται στους 462). Οι πίνακες χρησιµοποιήθηκαν στο πρόγραµµα Neighbor (Phylip v. 3.63; Felsenstein 2004) για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων. Το συναινετικό δέντρο κατασκευάστηκε µε το πρόγραµµα Consense (Phylip v. 3.63).

Οι µέθοδοι που βασίζονται σε γενετικές αποστάσεις είναι συνήθως απλές στην εφαρµογή τους και µε παραστατική απεικόνιση. Παρόλα αυτά, έχουν κάποια µειονεκτήµατα που εστιάζονται κυρίως στην εξάρτηση του

αποτελέσματος από την επιλογή τόσο της γενετικής απόστασης όσο και της γραφικής αναπαράστασης. Επίσης είναι δύσκολο να ενσωματωθεί επιπρόσθετη πληροφορία, όπως για παράδειγμα η γεωγραφική προέλευση των ατόμων (Pritchard *et al.*, 2000). Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε και μια προσέγγιση που βασίζεται σε μοντέλα. Έτσι, πραγματοποιήθηκε μελέτη της πληθυσμιακής δομής και της κατάταξης των ατόμων σε παμμικτικές ομάδες με τη βοήθεια του προγράμματος Structure (version 2, Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003). Οι προϋποθέσεις του μοντέλου είναι η ισορροπία HW μέσα στις ομάδες-πληθυσμούς και η ισορροπία σύνδεσης (linkage equilibrium) μεταξύ των μικροδορυφορικών τόπων. Το πρόγραμμα έχοντας τη γενετική πληροφορία των ατόμων και με χρήση Μπεϊεσιανής προσέγγισης, ομαδοποιεί τα άτομα σε παμμικτικές μονάδες. Με τη μέθοδο αυτή γίνονται δυο διαφορετικοί έλεγχοι. Στον πρώτο έλεγχο το πρόγραμμα, έχοντας ως δεδομένο μόνο τη γενετική πληροφορία, εκτιμά τον κατάλληλο αριθμό (K) πληθυσμών που κρίνονται απαραίτητοι για να μπορούν να ερμηνευτούν οι παρατηρούμενοι γονότυποι. Τέλος, με την εισαγωγή πληροφοριών στο πρόγραμμα, όπως η γεωγραφική προέλευση, γίνεται έλεγχος κατά πόσο οι γενετικά καθορισμένοι πληθυσμοί συμφωνούν με τους γεωγραφικά προκαθορισμένους πληθυσμούς.

#### **2.4 Μελέτη του τεχνητού υγρότοπου - βιολογικού καθαρισμού της Πόμπιας**

Στο δημοτικό διαμέρισμα Πόμπιας του δήμου Μοιρών έχει δημιουργηθεί, υπό την επίβλεψη του Οργανισμού Ανάπτυξης Ανατολικής Κρήτης (ΟΑΝΑΚ), ένας τεχνητός υγρότοπος-καλαμιώνας για επεξεργασία και διάθεση των υγρών αποβλήτων της. Στο πλαίσιο του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 01ΕΔ 424 έγιναν επαναληπτικές δειγματοληψίες στον τεχνητό υγρότοπο της Πόμπιας για τρία συνεχόμενα χρόνια. Τα απόβλητα της Πόμπιας αρχικά διοχετεύονται σε σηπτική δεξαμενή χωρητικότητας 655,2m<sup>3</sup>, όπου γίνεται καθίζηση των στερεών (πρωτοβάθμια επεξεργασία αποβλήτων). Στη συνέχεια τα υγρά απόβλητα διοχετεύονται στον τεχνητό υγρότοπο, ο

οποίος λειτουργεί ως δευτεροβάθμια επεξεργασία. Τα νερά του υγροτόπου τελικά διοχετεύονται σε φρεάτιο συλλογής (ρυάκι) και χρησιμοποιούνται για αρδευτικούς σκοπούς. Ο υγρότοπος έχει σχεδιαστεί να δέχεται τα απόβλητα 1200 ατόμων και αποτελείται από δυο λεκάνες με συνολική επιφάνεια 6810m<sup>2</sup> και βάθος από 20 εκατοστά έως 1 μέτρο (ρυθμιζόμενο εποχικά με ειδική διάταξη).

Η μελέτη στον υγρότοπο της Πόμπιας περιλάμβανε παρατηρήσεις του πληθυσμού του *M. rivulata*, εκτίμηση του πληθυσμιακού μεγέθους του είδους με την τεχνική της σύλληψης-επανασύλληψης, ανάλυση ιζήματος (για έλεγχο της υδρόβιας πανίδας) από τις δυο διαφορετικές δεξαμενές του βιολογικού καθαρισμού και από μια περιοχή “μάρτυρα” δίπλα στο βιολογικό καθαρισμό, και λήψη ιστού από τις χελώνες για εξαγωγή γενετικού υλικού με σκοπό τη μελέτη της πληθυσμιακής δομής και της υγείας του πληθυσμού.

#### 2.4.1 Ανάλυση μακροπανίδας

Τα δείγματα βένθους συλλέχθηκαν με τη βοήθεια ειδικού δειγματολήπτη τύπου σπάτουλας. Ο δειγματολήπτης έχει χωρητικότητα 1lt και είναι καλυμμένος στο επάνω του μέρος με μεταλλικό ανοξείδωτο δίχτυ μεγέθους ματιού 0,3 mm. Κατά τη δειγματοληψία δεν διαταράσσεται ιδιαίτερα ο πυθμένας ώστε να μην χάνονται τα ευκίνητα είδη της πανίδας και οι οργανισμοί του πυθμένα ανασύρονται μαζί με το ίζημα στο οποίο ζουν, με αποτέλεσμα να ανασύρονται και αυτοί που είναι προσκολλημένοι (Βορεάδου, 1993). Από το σταθμό 1, ο οποίος αντιπροσωπεύει το πρώτο στάδιο των λεκανών τεχνητού υγροβιότοπου, εξετάστηκαν 2 δείγματα, και από το σταθμό 2, ο οποίος αντιπροσωπεύει το δεύτερο στάδιο των λεκανών του τεχνητού υγροβιότοπου (νερό έτοιμο προς διάθεση), εξετάστηκαν 3 δείγματα. Επιπλέον, εξετάστηκαν ακόμα 3 δείγματα από το ρυάκι το οποίο ρέει δίπλα στον τεχνητό υγροβιότοπο (περιοχή Ο) και στο οποίο καταλήγει τελικά το νερό που εκρέει. Τα δείγματα αυτά πάρθηκαν πριν από την εκροή του νερού του υγροβιότοπου, για να χρησιμοποιηθεί το ρυάκι ως “μάρτυρας” και να συγκριθεί με το νερό που εκρέει από το σύστημα καθαρισμού.



Για κάθε δείγμα καταγράφηκε ο αριθμός ατόμων ανά τάξη στην κατώτερη δυνατή ταξινομική ομάδα. Η ποικιλότητα σε κάθε σταθμό υπολογίστηκε με τη βοήθεια του δείκτη του Shannon H' (Shannon & Weaver, 1949) βάσει του παρακάτω τύπου:

$$H' = -\sum p_i \log p_i$$

όπου  $p_i$  είναι το ποσοστό του συνολικού αριθμού των ατόμων του είδους  $i$ .

Ο δείκτης Shannon H' αποτελεί έναν από τους πιο δημοφιλείς για την εκτίμηση της ποικιλότητας των ειδών (Krebs, 1999) και έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα σε μελέτες μειοβενθικών και μακροβενθικών συστημάτων (Βορεάδου, 1993; Χατζηγιάννη, 2003).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος PRIMER 5 του εργαστηρίου θαλάσσιας βιολογίας του Plymouth Μεγάλης Βρετανίας.

#### 2.4.2 Εκτίμηση μεγέθους του πληθυσμού

Για την εκτίμηση του μεγέθους του πληθυσμού του *M. rivulata* έγιναν τρεις δειγματοληψίες στον υγρότοπο της Πόμπιας. Κάθε φορά γινόταν καταγραφή των συλλήψεων και επανασυλλήψεων. Τα άτομα που συλλαμβάνονταν κάθε φορά εξετάζονταν αρχικά για σημάδια από προηγούμενες συλλήψεις και στη συνέχεια σημαίνονταν (αν δεν ήταν ήδη σεσημασμένα) και απελευθερώνονταν. Για την εκτίμηση χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι των Schnabel και Schumacher (Krebs, 1999) με χρήση του προγράμματος Ecological Methodology (2<sup>nd</sup> edition, Krebs, 2002).

### 2.5 Μελέτη της δραστηριότητας του *M. rivulata* με χρήση ραδιοτηλεμετρίας

Στο πλαίσιο του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 01ΕΔ 424 έγιναν κάποιες προκαταρκτικές παρατηρήσεις για τη μελέτη της εποχικής και της ημερήσιας δραστηριότητας των ζώων με χρήση ραδιοτηλεμετρίας.

Για τη μελέτη της δραστηριότητας του *M. rivulata* χρησιμοποιήσαμε πομπούς πολύ υψηλής συχνότητας (VHF) της εταιρίας "Sirtrack Landcare Research". Έχουν βάρος περίπου 9gr, μήκος 40mm και είναι επενδυμένοι με ένα ειδικό αδιαβροχοποιητικό υλικό για να αποτρέπει την είσοδο του νερού στα ηλεκτρονικά κυκλώματα. Στην άκρη του πομπού υπάρχει μια κεραία από εύκαμπο μέταλλο, επενδυμένη με διάφανο εύκαμπο πλαστικό υλικό, για να αποτρέπει την πιθανή διάβρωση του μετάλλου, όταν αυτό έρχεται σε επαφή με το νερό. Οι πομποί διαθέτουν αισθητήρα θερμοκρασίας μέσω του οποίου καταλαβαίνουμε εάν τα ζώα είναι μέσα στο νερό ή έξω από αυτό και λιάζονται. Όταν τα ζώα βρίσκονται μέσα σε υδάτινο περιβάλλον, όπου επικρατεί σχετικά σταθερή θερμοκρασία καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας, τότε το σήμα είναι σταθερό, αργό. Εάν όμως μετακινηθούν προς την επιφάνεια ή βγουν από το νερό, τότε η συχνότητα και ένταση του σήματος αυξάνεται.

Ο δέκτης (RX-8910HE) που χρησιμοποιήσαμε είναι της εταιρίας "TELEVILT International AB" και έχει ενσωματωμένη σπαστή κεραία από σκληρό ελαστικό πλαστικό. Έχει τη δυνατότητα να αποθηκεύει μέχρι 10 συχνότητες από 151 MHz έως 152 MHz.

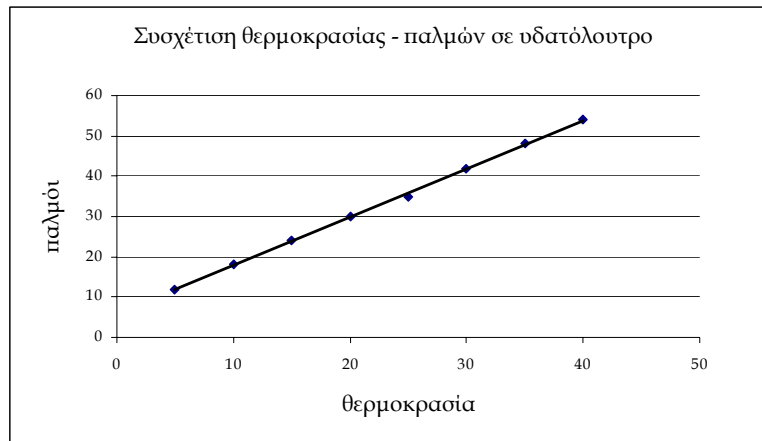
Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στον Αλμυρό ποταμό, περίπου 8 χιλιόμετρα δυτικά της πόλης του Ηρακλείου και έχει ενταχθεί στο δίκτυο "Natura 2000" (GR4310001). Πρόκειται για μια καρστική πηγή και ένα ποτάμι συνεχούς ροής. Η πηγή βρίσκεται στον πυθμένα χοάνης διαμέτρου περίπου 70-90m και βάθους λίγο περισσότερο από 20m, η οποία είναι γεμάτη νερό και είναι γνωστή ως Λίμνη ή Κόλυμπος του Αλμυρού. Πρόκειται για το σημείο εκβολής ενός από τους πιο σημαντικούς καρστικούς αγωγούς. Η πηγή έχει μέση ετήσια παροχή περίπου 7m<sup>3</sup>/s και το νερό είναι υφάλμυρο λόγω σιφωνισμού με θαλασσινό νερό σε μεγάλο βάθος (Μυλωνάς, 1997).

Το ποτάμι ξεκινά από το βορειοανατολικό σημείο της λίμνης ακολουθώντας πορεία συνολικού μήκους 1800m προς βορειοανατολικά και καταλήγει στον κόλπο του Αλμυρού στη θαλάσσια περιοχή της Αμμουδάρας. Το πλάτος της κοίτης του κυμαίνεται από 5 έως 20m. Ο ποταμός σχηματίζει

δυο τυφλά άκρα και ένα εκτεταμένο παραποτάμιο σύστημα, το οποίο πλημμυρίζει την περίοδο των βροχών. Ακολουθώντας την πορεία του ποταμού στην αριστερή πλευρά και περίπου στη μέση της διαδρομής του προς τη θάλασσα, συναντούμε ένα μόνιμο τέλμα εκτάσεως περίπου 2643m<sup>2</sup>. Στο τέλμα αυτό παρατηρείται η μεγαλύτερη συγκέντρωση του πληθυσμού των χελωνών (Μάντζιου, 2000).

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με 10 χελώνες (5 αρσενικές, 5 θηλυκές). Χρησιμοποιήσαμε 10 πομπούς, ρυθμισμένους σε 10 διαφορετικές συχνότητες, σύμφωνα με τις δυνατότητες του δέκτη μας. Οι συχνότητες είναι από 151.020 MHz έως 151.200 MHz, χαρακτηριστικές για κάθε ζώο. Οι πομποί τοποθετήθηκαν στις πλευρικές πλάκες (marginal) κοντά στην ουρά. Είναι ένα σημείο, όπου οι πλάκες κάνουν ένα βαθύλωμα και δεν εμποδίζεται η κίνηση των χελωνών.

Στην συνέχεια επαληθεύσαμε την απόκριση των πομπών σε διάφορες θερμοκρασίες σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Sirtrack Landcare Research). Σε υδατόλουτρο με ενσωματωμένο θερμόμετρο, το οποίο μας δίνει τη δυνατότητα να έχουμε σταθερή θερμοκρασία από 15 °C έως 50 °C, βυθίζαμε έναν-έναν τους πομπούς. Επειδή το υδατόλουτρο δεν είχε τη δυνατότητα να παρέχει νερό με θερμοκρασία μικρότερη των 15 °C, προσθέσαμε πάγο μέχρι να κατεβάσουμε τη θερμοκρασία στα επιθυμητά όρια. Η διαδικασία αυτή έγινε σε θερμοκρασίες από 5° C έως 40° C. Στη συνέχεια, αφού ενεργοποιήσαμε το δέκτη, για 10 sec λαμβάναμε τους παλμούς του. Έπειτα πολλαπλασιάζαμε τον αριθμό των παλμών επί 6 για να βρούμε τον αριθμό των παλμών σε 1 min. Κάθε μέτρηση επαναλαμβανόταν 6 φορές και ως τελικό αποτέλεσμα λαμβανόταν ο μέσος όρος των 6 επαναλήψεων. Έτσι γνωρίζοντας τους παλμούς που αντιστοιχούν σε διάφορες θερμοκρασίες κατασκευάσαμε ένα διάγραμμα διασποράς (εικόνα 2.2).



**Εικόνα 2.2.** Διάγραμμα συσχέτισης του αριθμού των παλμών με τη θερμοκρασία του νερού στο υδατόλουτρο.

Η γραμμική εξίσωση που προέκυψε περιγράφεται από τον τύπο:  $y=1,2x + 5,9$  με συντελεστή καθορισμού  $R^2= 0,999$ . Η εξίσωση αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη μετατροπή του αριθμού των παλμών που καταγράψαμε στο πεδίο σε θερμοκρασία.

Η καταγραφή στο πεδίο ξεκίνησε τον Απρίλιο του 2003 και είχε διάρκεια 3 μηνών. Συνολικά έγιναν 39 επισκέψεις στο βιότοπο του Αλμυρού. Σε κάθε επίσκεψη γινόταν καταγραφή της ώρας και της ημερομηνίας που γινόταν λήψη κάθε σήματος, του αριθμού των παλμών, της θερμοκρασίας νερού και αέρα. Με βάση αυτά τα στοιχεία κατασκευάστηκαν γραφήματα της δραστηριότητας των χελωνών ανάλογα με τις θερμοκρασίες αέρα ( $T_{αέρα}$ ) και νερού ( $T_{νερού}$ ), και της ημερήσιας δραστηριότητας των ζώων καθ' όλο το εικοσιτετράωρο.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Μοριακοί δείκτες

#### 3.1.1 Μιτοχονδριακά γονίδια

##### 3.1.1.1 Νουκλεοτιδική σύσταση και έλεγχος ομοπλασίας

##### 3.1.1.1.1 Κυτόχρωμα β

Η ανάλυση των 73 νέων αλληλουχιών *M. rivulata* του κυτοχρώματος β, που ελήφθησαν στην παρούσα μελέτη, αποκάλυψε 13 διαφορετικούς απλότυπους (πίνακας 3.1). Το μήκος των αλληλουχιών είναι 426 ζεύγη βάσεων (bp) και όπως ήταν αναμενόμενο, αφού πρόκειται για κωδική περιοχή, δεν περιέχουν ελλείψεις (deletions), προσθήκες (insertions) και κωδικόνια λήξης της πρωτεϊνοσύνθεσης (stop codons). Οι αλληλουχίες των απλοτύπων θα κατατεθούν στη βάση γενετικών δεδομένων GenBank.

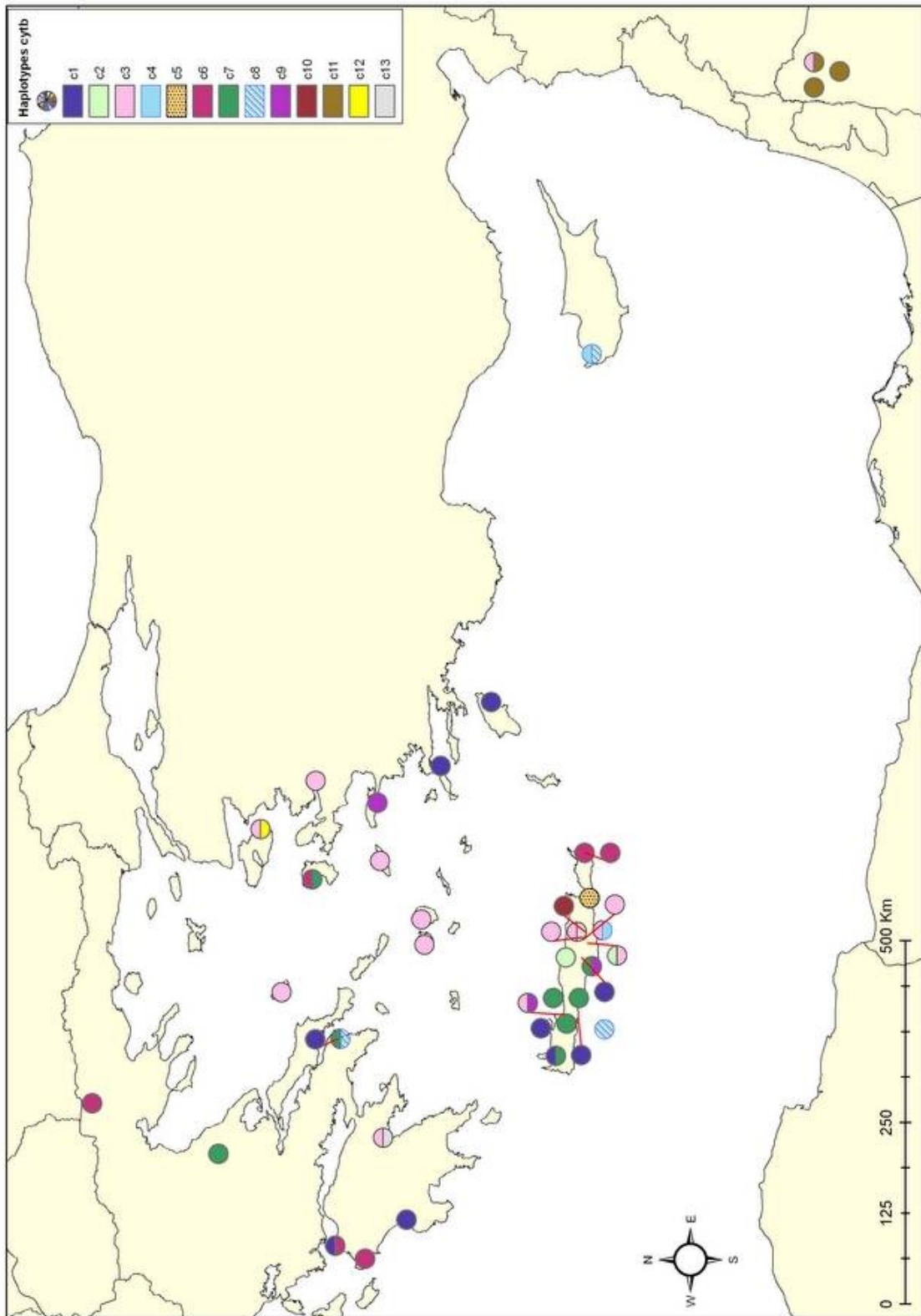
**Πίνακας 3.1.** Απλότυποι *M. rivulata* με βάση το cyt b. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων φαίνεται στον πίνακα 2.1. Ο αριθμός δίπλα στον κωδικό του κάθε πληθυσμού είναι χαρακτηριστικός για το συγκεκριμένο άτομο που χρησιμοποιήθηκε (βλέπε Παράρτημα I).

Απλότυπος	Δείγματα	
c1	AKR 75	KOS 133
	FRA 114	ROD 83
	FRA 115	ROD 85
	GER 255	MAR 899
	GER 257	MAR 908
	VRY 94	PAX 881
	KOS 132	PKY 137
	c2	ALM 16
ALM 41		
PLA 407		
c3	AMU 238	SKY 199
	AMU 247	SKY 200
	GEO 77	IKA 100
	PAR 311	LES 98
	PAR 317	NAX 51
	PLA 409	NAX 53
	SKI 287	PAG 882
	THR 196	JOR 56 AJ564455
c4	SKI 286	
	CYP 896	
	CYP 897	
	CYP 939	
c5	BRA 281	

Απλότυπος	Δείγματα	
c6	CHI 127 KER 914 PAX 880 PPA 877 ZAK 45 ZAK 889	
c7	CHI 128 LAR 135 LAR 136 MAK 901 MAK 905	KUR 110 PLK 494 POM 523 PRE 125 VRY 93
c8	GAV 66 GAV 71 MAK 903 CYP 940	
c9	GEO 79 POM 522 SAM 103 SAM 104	
c10	INI 46 INI 47	
c11	JOR 57 JOR 58 JOR 59 JOR 60 JOR 61	
c12	LES 97	
c13	PAG 884 PAG 885 THR 191	

Όσον αφορά τα δείγματα του *M. caspica*, τα δυο άτομα που αναλύθηκαν έδωσαν διαφορετικούς απλότυπους, και για το *M. leprosa*, από τα 5 άτομα που αναλύθηκαν προέκυψαν 5 διαφορετικοί απλότυποι.

Στην **εικόνα 3.1** παρουσιάζεται ο χάρτης με τη γεωγραφική κατανομή των απλοτύπων του *cyt b* του *M. rivulata*.



Εικόνα 3.1. Χάρτης κατανομής των απλοτύπων του *M. rivulata* για το κυτόχρωμα β.

Ο απλότυπος με τη μεγαλύτερη συχνότητα είναι ο c3 και εμφανίζει ευρεία κατανομή που περιλαμβάνει την Πελοπόννησο, την Κρήτη, κάποια νησιά του Αιγαίου, και την Ιορδανία. Στον απλότυπο c3 εντάσσεται επίσης και η αλληλουχία AJ564455 από τη Σμόρνη (Τουρκία). Όσον αφορά την Κρήτη, όπου εστιάζεται και το μεγαλύτερο μέρος των δειγματοληψιών, μόνο τρεις απλότυποι είναι μοναδικοί για το νησί (c2, c5, c10) και αυτοί με πολύ μικρή συχνότητα. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ζώων της Κρήτης εμφανίζουν απλότυπους με ευρεία κατανομή (c1, c3, c7).

Η μέση νουκλεοτιδική σύσταση των παραπάνω αλληλουχιών είναι θυμίνη (T) 26,9%, κυτοσίνη (C) 29%, αδερίνη (A) 32,2% και γουανίνη (G) 12% (πίνακας 3.2). Η νουκλεοτιδική σύσταση εμφανίζει, όπως φαίνεται και από τον προηγούμενο πίνακα, ισχυρή μεροληψία ως προς τη γουανίνη (Bias C του Irwin *et al.* 1991), στοιχείο που είναι χαρακτηριστικό τόσο του *cyt b*, όσο και άλλων μιτοχονδριακών πρωτεϊνικών γονιδίων στα θηλαστικά και τα ερπετά (Irwin *et al.* 1991, Lenk *et al.* 2001, Surget-Groba *et al.* 2001). Η συχνότητα της G είναι πολύ μικρή (12%), ενώ τα ποσοστά των υπόλοιπων βάσεων (A, T και C) είναι σχετικά παρόμοια και κυμαίνονται από 26,9 έως 32,2%. Μεγαλύτερη μεροληψία παρατηρείται στη δεύτερη και κυρίως στην τρίτη θέση του κωδικονίου. Η συχνότητα της γουανίνης στην πρώτη θέση είναι 20,2%, στη δεύτερη 14,2%, ενώ είναι σημαντικά μικρότερη στην τρίτη θέση (1,5%).

Οι πραγματικές εξελικτικές σχέσεις των υπό εξέταση αλληλουχιών μπορεί να μην αποκαλυφθούν εάν οι νουκλεοτιδικές θέσεις έχουν κορεστεί από πολλαπλές υποκαταστάσεις (Swofford *et al.*, 1996). Προκειμένου να ελεγχθεί ο βαθμός κορεσμού των αλληλουχιών σε νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις, κατασκευάστηκε για το σύνολο των αλληλουχιών του *cyt b* διάγραμμα του αριθμού των μεταπτώσεων (Ti) και των μεταστροφών (Tv) συναρτήσει της γενετικής απόστασης *p* (εικόνα 3.2). Οι πραγματικές εξελικτικές σχέσεις των υπό εξέταση αλληλουχιών μπορεί να μην αποκαλυφθούν εάν οι νουκλεοτιδικές θέσεις έχουν κορεστεί από πολλαπλές υποκαταστάσεις (Swofford *et al.*, 1996). Προκειμένου να ελεγχθεί ο βαθμός

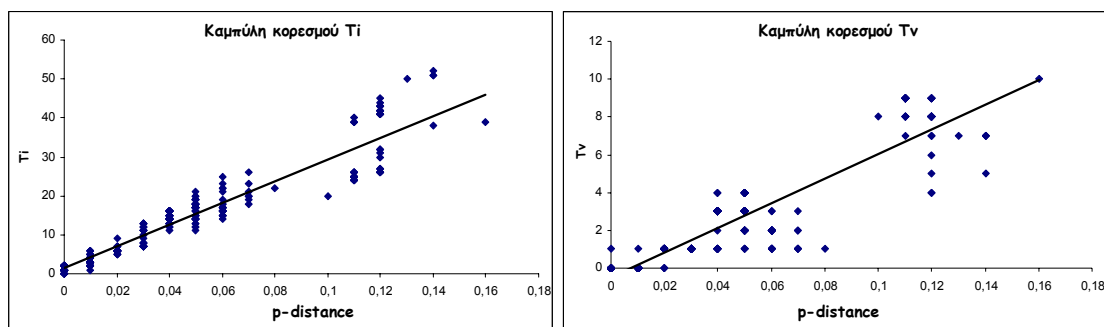


κορεσμού των αλληλουχιών σε νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις, κατασκευάστηκε για το σύνολο των αλληλουχιών του *cyt b* διάγραμμα του αριθμού των μεταπτώσεων (Ti) και των μεταστροφών (Tv) συναρτήσει της γενετικής απόστασης *p* (εικόνα 3.2).

**Πίνακας 3.2.** Μέση συχνότητα των νουκλεοτιδίων ανά κωδικονιακή θέση και στο σύνολο της αλληλουχίας για όλες τις υπό εξέταση αλληλουχίες, και ο δείκτης μεροληψίας C.

Νουκλεοτιδία	Θέση			Μέση τιμή
	Πρώτη	Δεύτερη	Τρίτη	
A	32,1	22,3	42,2	32,2
T	25,9	37,6	17,1	26,9
C	21,8	25,9	39,2	29,0
G	20,2	14,2	1,5	12,0
Δείκτης μεροληψίας (C)	0,107	0,180	0,417	---

Σημείωση. Ο δείκτης μεροληψίας νουκλεοτιδικής σύστασης (Compositional bias index) δίνεται από το μαθηματικό τύπο  $C = (2/3) \sum |c_i - 0.25|$ , όπου C είναι ο δείκτης μεροληψίας νουκλεοτιδικής σύστασης (compositional bias index) και  $c_i$  η συχνότητα της *i*th βάσης (Irwin *et al.* 1991).



**Εικόνα 3.2.** Αριθμός μεταπτώσεων (Ti) και μεταστροφών (Tv) συναρτήσει της γενετικής απόστασης *p* για όλες τις θέσεις των κωδικονίων του *cyt b*. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει μια ανά ζεύγος σύγκριση μεταξύ των ταξινομικών ομάδων.

Ο συντελεστής καθορισμού (Sokal & Rohlf, 1995) που χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι κατά ζεύγη μεταπτώσεις και μεταστροφές συσχετίζονται με τη γενετική απόσταση, έχει τιμές  $r^2=0,90$  και  $r^2=0,84$  για τις

μεταπτώσεις (Ti) και τις μεταστροφές (Tv) αντίστοιχα, δηλώνοντας την απουσία κορεσμού στις μελετώμενες αλληλουχίες.

### 3.1.1.1.2 Περιοχή ελέγχου

Η ανάλυση των 73 νέων αλληλουχιών *M. rivulata* της περιοχής ελέγχου (D-loop) που ελήφθησαν στην παρούσα μελέτη, αποκάλυψε 18 διαφορετικούς απλότυπους (πίνακας 3.3). Το μήκος των αλληλουχιών κυμαίνεται από 481 έως 488 ζεύγη βάσεων (bp). Οι αλληλουχίες των απλοτύπων θα κατατεθούν στη βάση γενετικών δεδομένων GenBank.

**Πίνακας 3.3.** Απλότυποι *M. rivulata* με βάση την D-loop. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων φαίνεται στον πίνακα 2.1. Ο αριθμός δίπλα στον κωδικό του κάθε πληθυσμού είναι χαρακτηριστικός για το συγκεκριμένο άτομο που χρησιμοποιήθηκε (βλέπε Παράρτημα I).

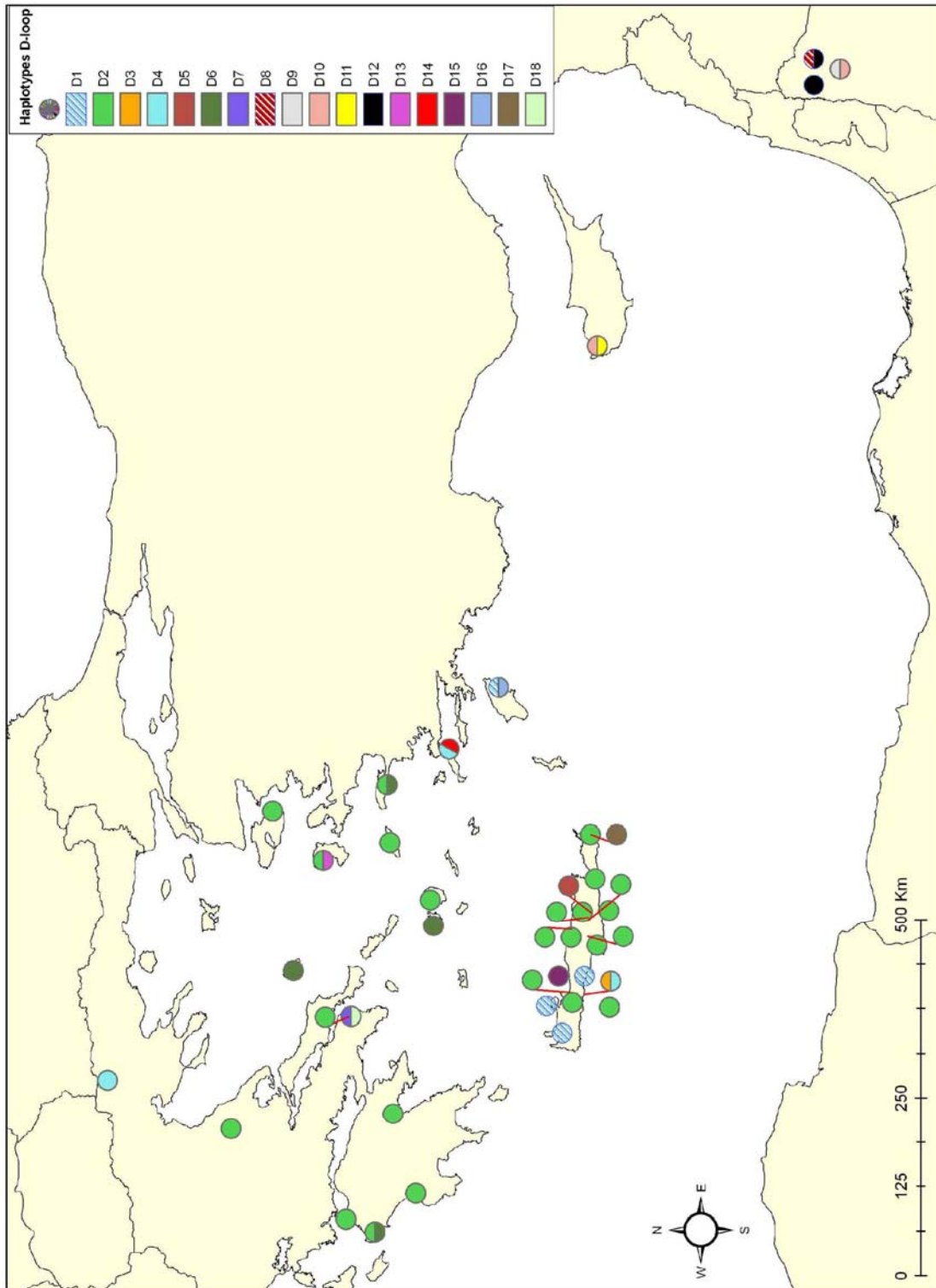
Απλότυπος	Δείγματα	
D1	ROD 83 PRE 125 VRY 93 VRY 94 AKR 75	
D2	PAG 884 PAG 885 PAR 311 PAR 317 PAX 880 PAX 881 PKY 137 PLA 407 PLA 409 POM 522 POM 523 PPA 877 SAM 103 SKI 286 SKI 287 THR 191 THR 196 ZAK 889 MAR 899 MAR 908	ALM 16 ALM 41 AMU 238 AMU 247 BRA 281 CHI 127 GAV 66 GAV 71 GEO 77 GEO 79 GER 255 GER 257 IKA 100 KUR 110 LAR 135 LAR 136 LES 97 LES 98 NAX 51 PAG 882
D3	FRA 114	
D4	KOS 132 KER 914 FRA 115	
D5	INI 46 INI 47	
D6	SAM 104	

Απλότυπος	Δείγματα
	SKY 199 SKY 200 NAX 53
D7	MAK 905 MAK 901
D8	JOR 56
D9	JOR 61
D10	CYP 896 CYP 897 JOR 59 JOR 60
D11	CYP 940 CYP 939
D12	JOR 57 JOR 58
D13	CHI 128
D14	KOS 133
D15	PLK 494
D16	ROD 85
D17	ZAK 45
D18	MAK 903

Ο απλότυπος με τη μεγαλύτερη συχνότητα είναι ο D2 και εμφανίζει ευρεία κατανομή που περιλαμβάνει την Κρήτη και τα περισσότερα δείγματα των νησιών του Αιγαίου και της ηπειρωτικής Ελλάδας. Όσον αφορά την Κρήτη, όπου εστιάζεται και το μεγαλύτερο μέρος των δειγματοληψιών, μόνο 4 απλότυποι είναι μοναδικοί για το νησί (D3, D5, D15, D17) με πολύ μικρή συχνότητα. Ο πιο κοινός απλότυπος στην Κρήτη είναι ο D2, που έχει την πιο ευρεία κατανομή και στην υπόλοιπη Ελλάδα.

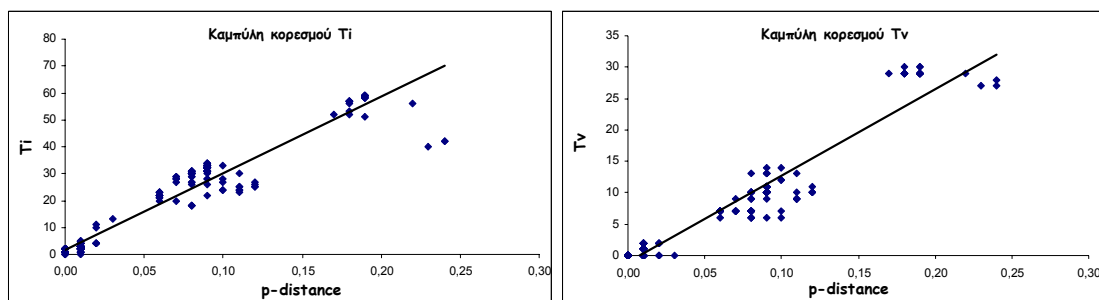
Όσον αφορά τα δείγματα του *M. caspica*, τα δυο άτομα που αναλύθηκαν έδωσαν διαφορετικούς απλότυπους, και για το *M. leprosa*, από τα 5 άτομα που αναλύθηκαν προέκυψαν 3 διαφορετικοί απλότυποι.

Στην **εικόνα 3.3** παρουσιάζεται ο χάρτης με τη γεωγραφική κατανομή των απλοτύπων του *M. rivulata* για την περιοχή ελέγχου (D-loop).



Εικόνα 3.3. Χάρτης κατανομής των αιλοτύπων της *M. rioulata* για την D-loop.

Η μέση νουκλεοτιδική σύσταση των παραπάνω αλληλουχιών είναι θυμίνη (T) 34,1%, κυτοσίνη (C) 19,9%, αδενίνη (A) 31,9% και γουανίνη (G) 14,1%. Όπως και στην περίπτωση του *cyt b*, προκειμένου να ελεγχθεί ο βαθμός κορεσμού των αλληλουχιών της D-loop σε νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις, κατασκευάστηκε για το σύνολο αλληλουχιών διάγραμμα του αριθμού των μεταπτώσεων και των μεταστροφών συναρτήσει της γενετικής απόστασης  $p$ . Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κορεσμού απεικονίζονται στην **εικόνα 3.4**. Ο συντελεστής καθορισμού που χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι κατά ζεύγη μεταπτώσεις και μεταστροφές συσχετίζονται με τη γενετική απόσταση, έχει τιμές  $r^2=0,93$  και  $r^2=0,94$  για τις μεταπτώσεις ( $T_i$ ) και τις μεταστροφές ( $T_v$ ) αντίστοιχα, δηλώνοντας την απουσία κορεσμού τόσο στις μεταπτώσεις όσο και στις μεταστροφές, ακόμα και στα μεγάλα επίπεδα γενετικής απόστασης (π.χ. όταν στην ανάλυση περιλαμβάνεται και η παραομάδα).



**Εικόνα 3.4.** Αριθμός μεταπτώσεων ( $T_i$ ) και μεταστροφών ( $T_v$ ) συναρτήσει της γενετικής απόστασης  $p$  για όλες τις θέσεις της περιοχής ελέγχου (D-loop). Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει μια ανά ζεύγος σύγκριση μεταξύ των ταξινομικών ομάδων.

### 3.1.1.2 Ανεξάρτητη ή συνδυασμένη ανάλυση

Για να ελεγχθεί αν τα δυο μιτοχονδριακά γονίδια μπορούν να συνδυαστούν για τις περαιτέρω αναλύσεις εφαρμόστηκε η στατιστική δοκιμασία των Farris *et al.* (1995). Η δοκιμασία δεν υπέδειξε αντίθεση στο φυλογενετικό σήμα για τα δυο σύνολα δεδομένων. Η τιμή  $p$  της δοκιμασίας ήταν 0,11 ( $p>0,05$ ), οπότε το *cyt b* και η D-loop, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ίδια φυλογενετική ανάλυση. Στον **πίνακα 3.4** παρουσιάζονται οι

απλότυποι που προέκυψαν από το συνδυασμό των δύο γονιδίων. Οι φυλογενετικές αναλύσεις που παρουσιάζονται παρακάτω βασίζονται στο συνδυασμένο σύνολο των δεδομένων του *cyt b* και της D-loop.

**Πίνακας 3.4** Απλότυποι *M. rivulata* με βάση το συνδυασμένο σύνολο δεδομένων του *cyt b* και της D-loop. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων φαίνεται στον πίνακα 2.1. Ο αριθμός δίπλα στον κωδικό του κάθε πληθυσμού είναι χαρακτηριστικός για το συγκεκριμένο άτομο που χρησιμοποιήθηκε (βλέπε Παράρτημα I).

Απλότυπος	Δείγματα	
M1	AKR 75 ROD 83 VRY 94	
M2	ALM 16 ALM 41 PLA 407	
M3	AMU 238 AMU 247 GEO 77 IKA 100 LES 98 NAX 51	PAG 882 PAR 311 PAR 317 PLA 409 SKI 287 THR 196
M4	BRA 281	
M5	CHI 127 PAX 880	PPA 877 ZAK 889
M6	CHI 128	
M7	FRA 114	
M8	FRA 115 KOS 132	
M9	GAV 66 GAV 71	
M10	GEO 79 POM 522 SAM 103	
M11	GER 255 GER 257 MAR 899	MAR 908 PAX 881 PKY 137
M12	INI 46 INI 47	
M13	KER 914	
M14	KOS 133	
M15	KUR 110 POM 523	LAR 135 LAR 136
M16	LES 97	
M17	MAK 901 MAK 905	
M18	MAK 903	
M19	NAX 53 SKY 199 SKY 200	

Απλότυπος	Δείγματα
M20	PAG 884 PAG 885 THR 191
M21	PLK 494
M22	PRE 125 VRY 93
M23	ROD 85
M24	SAM 104
M25	SKI 286
M26	ZAK 45
M27	CYP 896 CYP 897
M28	CYP 939
M29	CYP 940
M30	JOR 56
M31	JOR 57 JOR 58
M32	JOR 59 JOR 60
M33	JOR 61

### 3.1.1.3 Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων

Οι αποστάσεις μεταξύ των υπό εξέταση αλληλουχιών εκτιμήθηκαν και για τα δυο γονίδια με τα μοντέλα K2P και HKY85+I+G (Hasegawa-Kishino-Yano, Hasegawa *et al.*, 1985). Το HKY85+I+G είναι το μοντέλο που επιλέχθηκε μέσω της δοκιμασίας του λόγου των πιθανοφανειών (Likelihood Ratio Test, LRT), με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος ModelTest (v. 3.5, Posada & Crandall, 1998) και του PAUP (v.4.0b10, Swofford 2002). Το μοντέλο HKY85 επιτρέπει διαφορετική συχνότητα στα τέσσερα νουκλεοτίδια ( $\Pi_A \neq \Pi_C \neq \Pi_T \neq \Pi_G$ ) και διαφορετικό ρυθμό εμφάνισης των μεταπτώσεων και μεταστροφών. Επίσης θεωρεί ότι ο ρυθμός υποκατάστασης στις διάφορες νουκλεοτιδικές θέσεις δεν είναι σταθερός αλλά ακολουθεί την κατανομή γάμμα (HKY+G) και τέλος επιτρέπει σε κάποιες θέσεις να είναι αμετάβλητες (HKY+G+I, G=gamma distribution, I=invariable sites). Το μοντέλο K2P είναι πολύ πιο απλό και απλά επιτρέπει διαφορετικό ρυθμό εμφάνισης των μεταπτώσεων και μεταστροφών. Οι αποστάσεις K2P υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA (Kumar *et al.*, 2001) ενώ οι αποστάσεις HKY+G+I με το πρόγραμμα PAUP (Swofford, 2002).

Τα μοντέλα HKY85+I+G και K2P δίνουν παρόμοιες τιμές για το σύνολο των δεδομένων μας, οπότε χρησιμοποιούμε το πιο απλό από αυτά, εξαιτίας του ότι το απλούστερο θα έχει μικρότερη διασπορά (Kumar *et al.*, 1993). Στους πίνακες 1 και 2 του Παραρτήματος II, παρουσιάζονται οι γενετικές αποστάσεις K2P μεταξύ των απλοτύπων για το *cyt b* και την D-loop αντίστοιχα.

Στους πίνακες 3.5, 3.6 και 3.7 παρουσιάζονται οι μέσες (διορθωμένες) γενετικές αποστάσεις μέσα στο κάθε είδος και μεταξύ των ειδών για το *cyt b*, την D-loop και το συνδυασμένο σύνολο δεδομένων αντίστοιχα.

Η ενδοειδική διαφοροποίηση του *M. rivulata* για το συνδυασμένο σύνολο δεδομένων κυμαίνεται από 0,1% έως 1,1%. Η μεγαλύτερη γενετική απόσταση (1,1%) εμφανίζεται μεταξύ απλοτύπων της Ιορδανίας και της Ελλάδας.

**Πίνακας 3.5** Οι εκτιμώμενες γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ειδών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μελέτη με βάση το μοντέλο Kimura 2-parameter για τις αλληλουχίες του *cyt b*. Στη διαγώνιο οι τιμές αντιπροσωπεύουν την εντός των ειδών διαφοροποίηση που παρατηρείται στηριζόμενοι στο ίδιο μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης.

	<i>M. rivulata</i>	<i>M. caspica</i>	<i>M. leprosa</i>
<i>M. rivulata</i>	0,006		
<i>M. caspica</i>	0,024	0,012	
<i>M. leprosa</i>	0,040	0,049	0,011

**Πίνακας 3.6** Οι εκτιμώμενες γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ειδών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μελέτη με βάση το μοντέλο Kimura 2-parameter για τις αλληλουχίες της D-loop. Στη διαγώνιο οι τιμές αντιπροσωπεύουν την εντός των ειδών διαφοροποίηση που παρατηρείται στηριζόμενοι στο ίδιο μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης.

	<i>M. rivulata</i>	<i>M. caspica</i>	<i>M. leprosa</i>
<i>M. rivulata</i>	0,007		
<i>M. caspica</i>	0,063	0,021	
<i>M. leprosa</i>	0,088	0,078	0,018



**Πίνακας 3.7** Οι εκτιμώμενες γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ειδών που περιλαμβάνονται στην παρούσα μελέτη με βάση το μοντέλο Kimura 2-parameter για το σύνολο των δεδομένων (cyt *b* & D-loop). Στη διαγώνιο οι τιμές αντιπροσωπεύουν την εντός των ειδών διαφοροποίηση που παρατηρείται στηριζόμενοι στο ίδιο μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης.

	<i>M. rivulata</i>	<i>M. caspica</i>	<i>M. leprosa</i>
<i>M. rivulata</i>	0,005		
<i>M. caspica</i>	0,033	0,009	
<i>M. leprosa</i>	0,063	0,060	0,014

#### 3.1.1.4 Συσχέτιση της γενετικής διαφοροποίησης με τη γεωγραφική απόσταση των πληθυσμών

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η γενετική απόσταση των ατόμων συμμεταβάλλεται με τη γεωγραφική τους απόσταση, εφαρμόστηκε η μη παραμετρική δοκιμασία του Mantel (1967) μεταξύ των πινάκων των γενετικών αποστάσεων K2P και των γεωγραφικών αποστάσεων, που υπολογίστηκαν ως η απόσταση μεταξύ των σημείων που ορίζουν οι γεωγραφικές συντεταγμένες των πληθυσμών. Σύμφωνα με τη μη παραμετρική δοκιμασία του Mantel, όπως αυτή εφαρμόζεται από το πρόγραμμα Mantel (version 2, Liedloff, 1999), η μηδενική υπόθεση είναι η  $H_0 =$  δεν υπάρχει καμία συσχέτιση μεταξύ των στοιχείων των δυο υπό εξέταση πινάκων. Αν η τιμή  $g$  είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη τιμή ( $cv$ , critical value), τότε απορρίπτεται η  $H_0$ , δηλαδή υπάρχει συσχέτιση το μέγεθος της οποίας φαίνεται από το δείκτη συσχέτισης  $r$ . Η δοκιμασία του Mantel έδειξε ότι υπάρχει συσχέτιση της γενετικής απόστασης με τη γεωγραφική απόσταση των μελετώμενων ατόμων. Συγκεκριμένα, για το cyt *b* η τιμή του  $g$  είναι 5,09 με κρίσιμη τιμή  $cv=1,65$  ( $p<0,05$ ) και η τιμή του δείκτη συσχέτισης είναι:  $r=0,2$ . Για την D-loop η τιμή του  $g$  είναι 6,61 με κρίσιμη τιμή  $cv=1,65$  ( $p<0,05$ ) και η τιμή του δείκτη συσχέτισης είναι:  $r=0,55$ .

### 3.1.1.5 Φυλογενετική ανάλυση

Για τη φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών του συνδυασμένου συνόλου δεδομένων του *cyt b* και της D-loop χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο 73 διαφορετικών αλληλουχιών του *M. rivulata* (συν την αλληλουχία AJ564455, [Barth *et al.*, 2004] από την περιοχή της Τουρκίας, για την οποία όμως υπήρχε μόνο διαθέσιμη αλληλουχία για το *cyt b*), 2 αλληλουχιών *M. caspica*, 5 αλληλουχιών *M. leprosa*. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν ως παραομάδες οι αλληλουχίες *Geoemyda spengleri*- AJ564449 (Barth *et al.*, 2004) και *Testudo marginata*- NC007698 (Parham *et al.*, 2006). Από το σύνολο των 73 αλληλουχιών του *M. rivulata* προέκυψαν 33 διαφορετικοί απλότυποι (βλέπε **πίνακα 3.4**). Συνολικά ευθυγραμμίστηκαν 914 ζεύγη βάσεων (bp), από το σύνολο των οποίων, λαμβάνοντας υπόψη μόνο τους απλότυπους του *M. rivulata*, οι 19 θέσεις (2,08%) είναι πολυμορφικές και μόνο οι 11 (1,2%) πληροφοριακές σύμφωνα με το κριτήριο της φειδωλότητας. Αν συμπεριληφθούν και τα υπόλοιπα είδη του γένους *Mauremys*, οι πολυμορφικές θέσεις γίνονται 116 (12,68%) και οι πληροφοριακές 101 (11,04%). Τέλος, αν συμπεριληφθούν και οι παραομάδες, οι πολυμορφικές θέσεις είναι 233 (25,46%) και οι πληροφοριακές 113 (12,35%).

Για την εκτίμηση της ύπαρξης ή όχι φυλογενετικού σήματος στο σύνολο των αλληλουχιών, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία των Hillis & Huelsenbeck (1992). Όταν τα δεδομένα είναι συνεπή προς μια φυλογενετική υπόθεση, τότε τα μήκη των τυχαίων δένδρων που προκύπτουν από αυτά τα δεδομένα ακολουθούν κατανομή η οποία είναι ασύμμετρη προς τα αριστερά. Η παράμετρος  $g_1$  στην οποία στηρίζεται η δοκιμασία αυτή, αποτελεί εκτίμηση της ασυμμετρίας της κατανομής του μήκους των δέντρων και υπολογίστηκε με το πρόγραμμα PAUP ( $10^6$  τυχαία δένδρα). Η δοκιμασία εφαρμόστηκε χωριστά για το σύνολο δεδομένων του *cyt b* και της D-loop, καθώς επίσης και για το συνδυασμένο σύνολο δεδομένων. Η τιμή για σύνολο δεδομένων του *cyt b* ανέρχεται σε  $g_1 = -0,92$ , για την D-loop σε  $g_1 = -1,74$  και για τα δυο γονίδια μαζί σε  $g_1 = -1,72$ . Συγκρίνοντας τις τιμές αυτές με τις τιμές που παρατίθενται στην εργασία των Hillis & Huelsenbeck (1992), διαπιστώνεται ότι και οι τρεις

είναι μικρότερες από την κρίσιμη τιμή (για τους συγκεκριμένους αριθμούς μελετώμενων αλληλουχιών και χαρακτήρων η κρίσιμη τιμή είναι  $-0,09$ ), που είναι και το επιθυμητό αποτέλεσμα. Θεωρητικά λοιπόν, το σύνολο των αλληλουχιών του *cyt b*, της D-loop αλλά και το συνδυασμένο σύνολο δεδομένων περιέχει πολύ σημαντικό ποσό φυλογενετικής πληροφορίας (Hillis & Huelsenbeck, 1992).

Στην ανάλυση της Σύνδεσης Γειτόνων (Neighbor-Joining, NJ) δοκιμάστηκαν διάφορες μέθοδοι εκτίμησης γενετικών αποστάσεων (Kimura-two-parameter, Tamura-Nei, HKY+I+G) και σε όλες τις περιπτώσεις παράγονταν ένα δέντρο με την ίδια τοπολογία, το οποίο δίνεται στην **εικόνα 3.5**. Η αξιοπιστία των κλάδων ελέγχτηκε με δοκιμασία bootstrap, πραγματοποιώντας 1000 επαναλήψεις (ψευδοαντίγραφα του πρωτότυπου συνόλου δεδομένων).

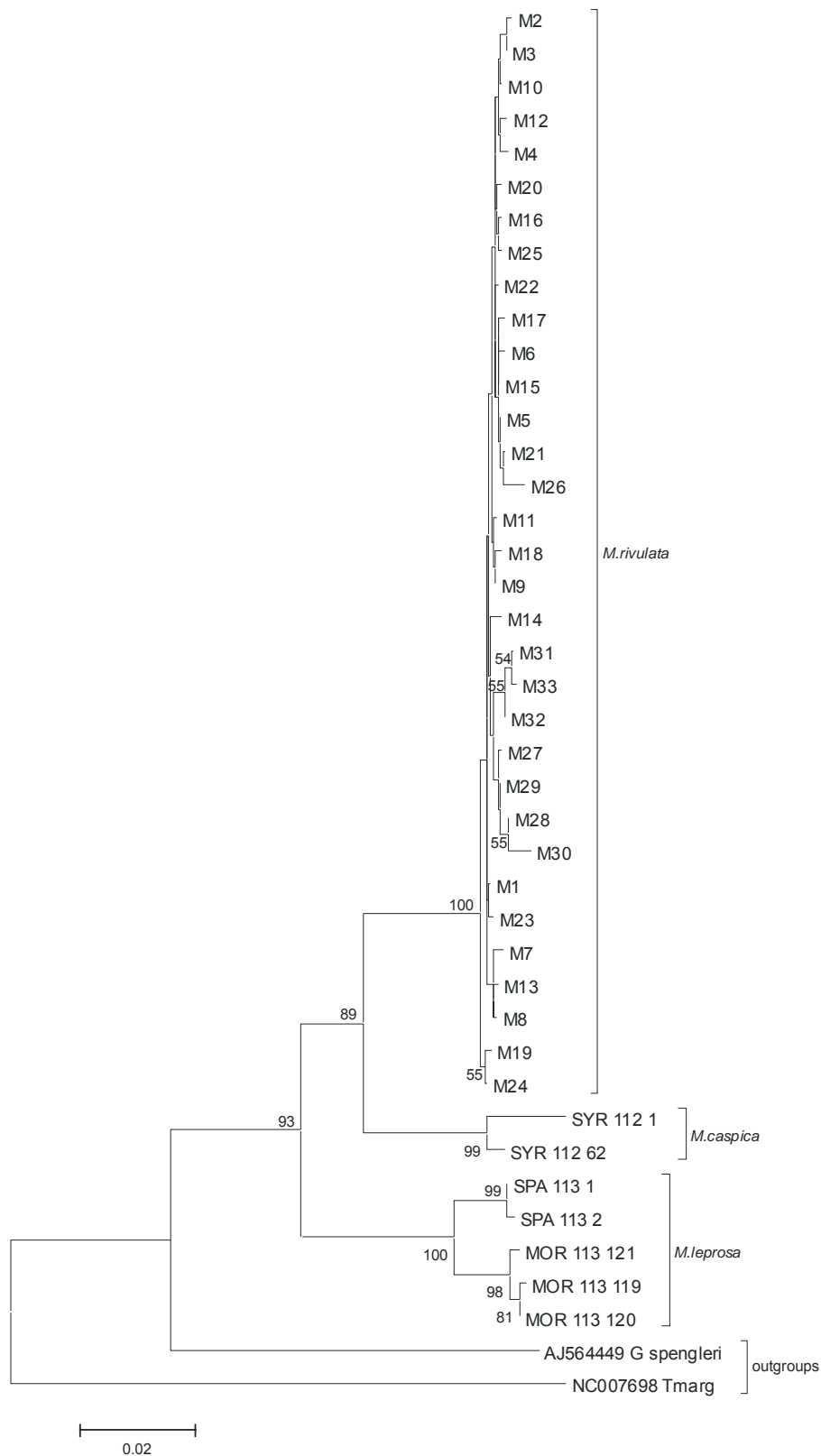
Η μη σταθμισμένη, όσον αφορά τους χαρακτήρες, ανάλυση μέγιστης φειδωλότητας (Maximum Parsimony, MP) έδωσε περισσότερα από 5000 εξίσου φειδωλά δέντρα, το μήκος των οποίων είναι 327 εξελικτικά βήματα (HI=0,202, RI=0,864) (**εικόνα 3.6**). Ο μεγάλος αριθμός των παραγόμενων δέντρων οφείλεται κατά κύριο λόγο στην τοποθέτηση των ατόμων που ανήκουν στο είδος *M. rivulata* και παρουσιάζουν πολύ μικρή διαφοροποίηση μεταξύ τους. Ο έλεγχος της αξιοπιστίας των κλάδων έγινε μέσω της ανάλυσης bootstrap (1000 επαναλήψεις).

Για την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου εξέλιξης νουκλεοτιδικής υποκατάστασης εφαρμόστηκε η δοκιμασία του λόγου των πιθανοφανειών (Likelihood Ratio Test, LRT) με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος ModelTest v. 3.5 (Posada & Crandall, 1998) και του PAUP v.4.0b10 (Swofford, 2002). Το LRT έχει τη δυνατότητα να επιλέξει ανάμεσα σε 56 διαφορετικά μοντέλα ποιο είναι αυτό που ταιριάζει καλύτερα με το αντίστοιχο σύνολο των αλληλουχιών. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας το μοντέλο και τις παραμέτρους που επιλέχθηκαν από το LRT, ως αρχικές παραμέτρους στην ανάλυση μέγιστης πιθανοφάνειας (ML) με το πρόγραμμα PAUP ακολουθήθηκε η μέθοδος της διαδοχικής προσέγγισης (successive

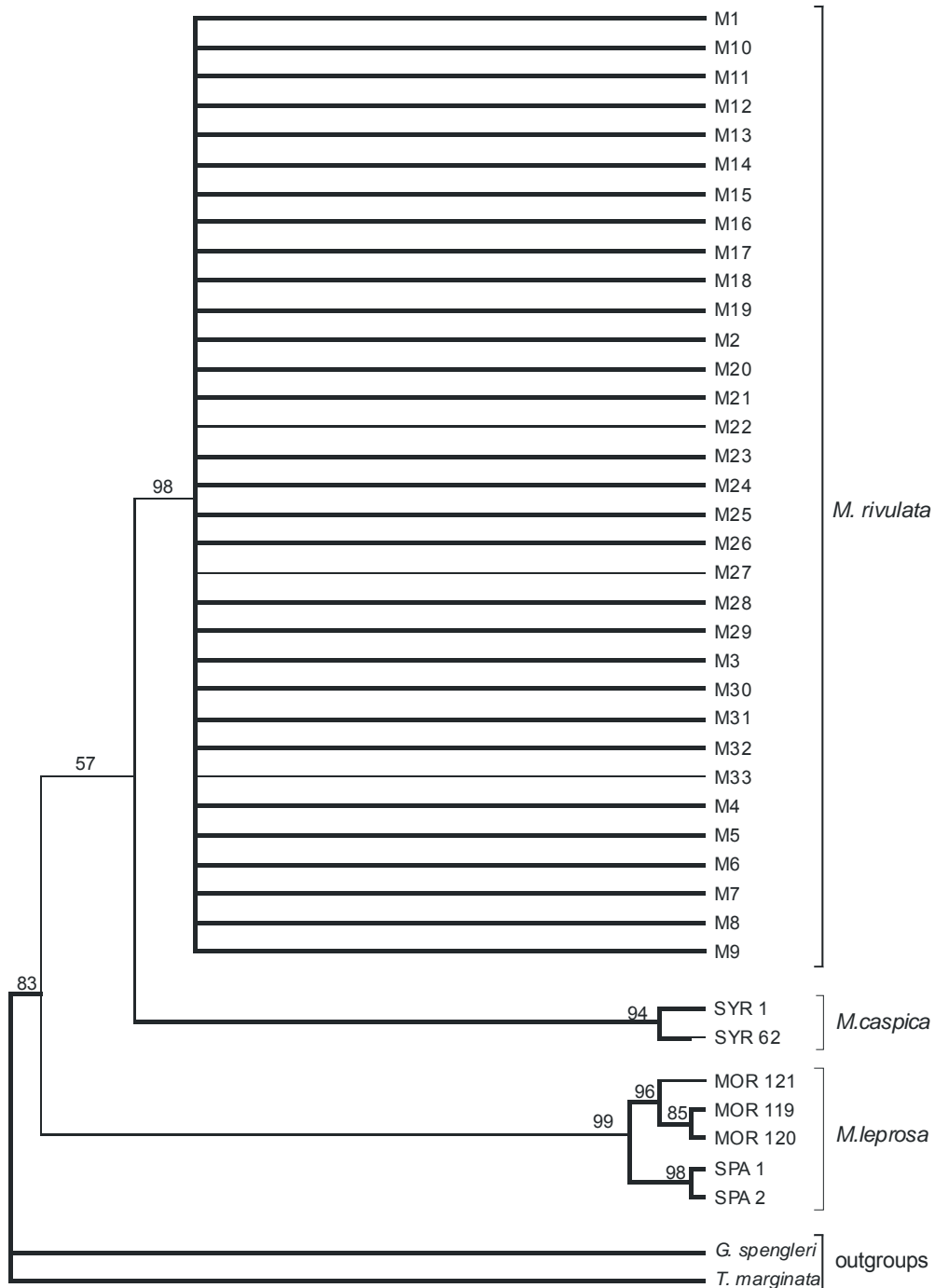
approximation, Sullivan *et al.*, 2005) ώστε να καταλήξουμε τελικά στις βέλτιστες παραμέτρους. Βάσει της παραπάνω διαδικασίας το μοντέλο που επιλέχθηκε ως πιο κατάλληλο για το σύνολο των δεδομένων μας (cyt *b* & D-loop) είναι το μοντέλο Hasegawa-Kishino-Yano (HKY85+I+G, Hasegawa *et al.*, 1985), με ποσοστό αμετάβλητων θέσεων  $I=0,4712$  και παράμετρο για την κατανομή γάμμα των μεταβλητών θέσεων  $\alpha=0,5607$ . Το HKY επιτρέπει διαφορετικό ρυθμό εμφάνισης των μεταπτώσεων ( $T_i$ ) και μεταστροφών ( $T_v$ ), που στην προκειμένη περίπτωση υπολογίστηκε σε:  $T_i/T_v= 7,0747$ . Οι συχνότητες των νουκλεοτιδίων είναι:  $A=0,33997$ ,  $C=0,23681$ ,  $G=0,12261$ ,  $T=0,30061$ .

Κατά την ML ανάλυση, για την αναζήτηση του δέντρου με τη μεγαλύτερη πιθανοφάνεια χρησιμοποιήθηκε η ευρετική μέθοδος αναζήτησης (heuristic search) με τη χρήση του αλγορίθμου αναδιάταξης κλάδων tree bisection and reconnection (TBR). Το αρχικό δέντρο προέκυψε με διαδοχική προσθήκη των αλληλουχιών. Το δέντρο με τη μεγαλύτερη πιθανοφάνεια έχει τιμή  $-\ln L= 2688,42$  και δίνεται στην **εικόνα 3.7**.

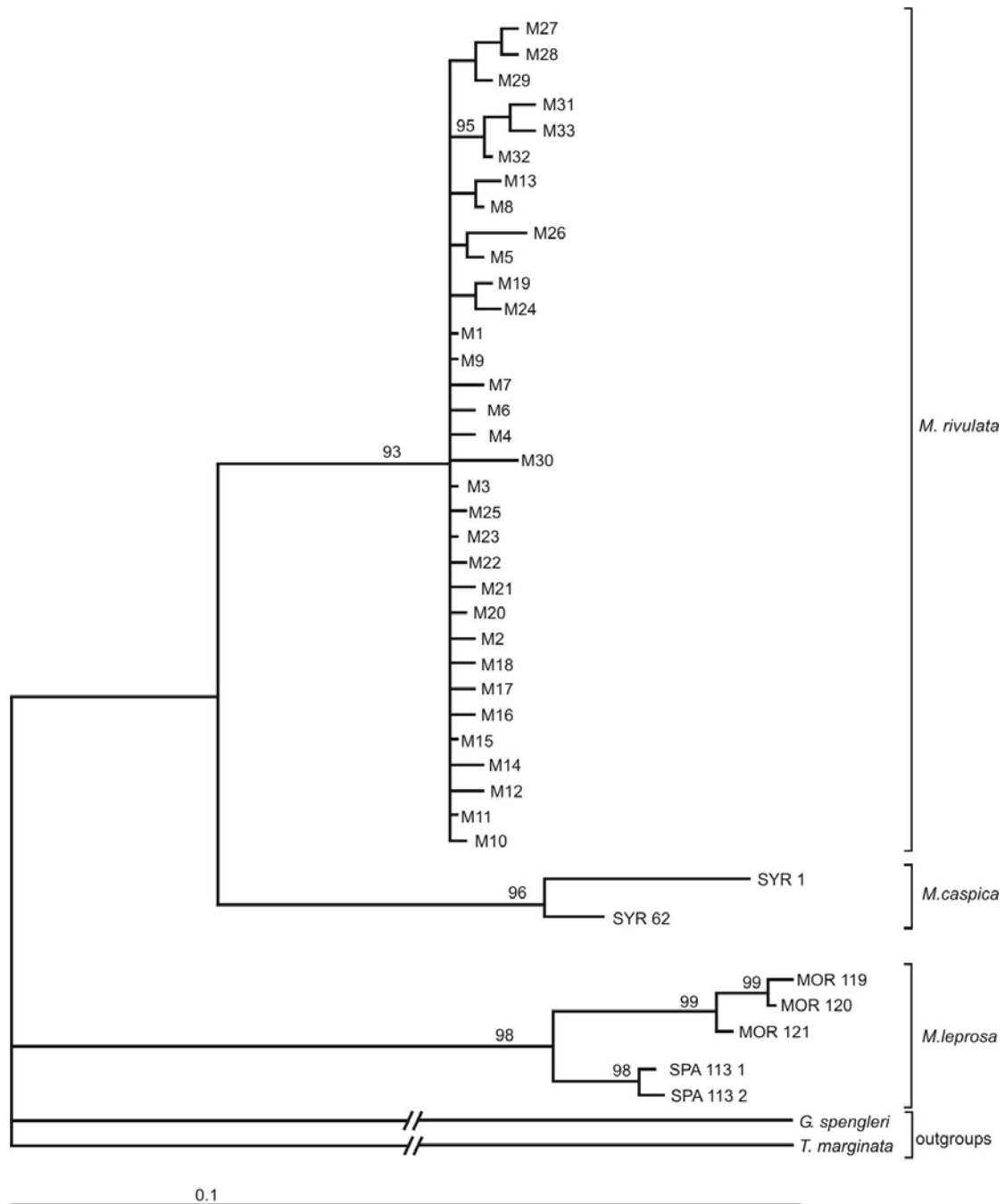
Τέλος, η ανάλυση της Μπεϊσειανής Συμπερασματολογίας (BI) οδήγησε σε ίδιες τοπολογίες κατά τη διάρκεια των 4 ανεξάρτητων εφαρμογών, αν και οι εκ των υστέρων πιθανότητες για κάποιους κόμβους ήταν ελάχιστα διαφορετικές (**εικόνα 3.7**). Η εικόνα απεικονίζει το δέντρο που αποτελεί το συναινετικό δέντρο (50% majority rule tree) των  $9 \cdot 10^4$  δέντρων που απέμειναν μετά την απόρριψη των πρώτων 10.000 δέντρων, που είναι το διάστημα μέχρι να σταθεροποιηθεί η τιμή της πιθανοφάνειας ( $-\ln L$ ). Η μέση τιμή των  $-\ln likelihood$  των δέντρων αυτών είναι:  $-\ln L= -2781,81$ .



**Εικόνα 3.5.** Δένδρο Neighbor-Joining με βάση την απόσταση Kimura-two-parameter για το συνδυασμένο σύνολο δεδομένων του *cyt b* και της D-loop. Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (1000 επαναλήψεις). Μόνο τιμές bootstrap μεγαλύτερες από 50% παρουσιάζονται.



**Εικόνα 3.6.** Το συναινετικό δέντρο (consensus tree) της ανάλυσης της Μέγιστης Φειδωλότητας (MP), βάσει του κανόνα της 50% πλειονότητας (50% majority rule). Οι αριθμοί των κλάδων αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (1000 επαναλήψεις). Μόνο τιμές bootstrap μεγαλύτερες από 50% παρουσιάζονται.

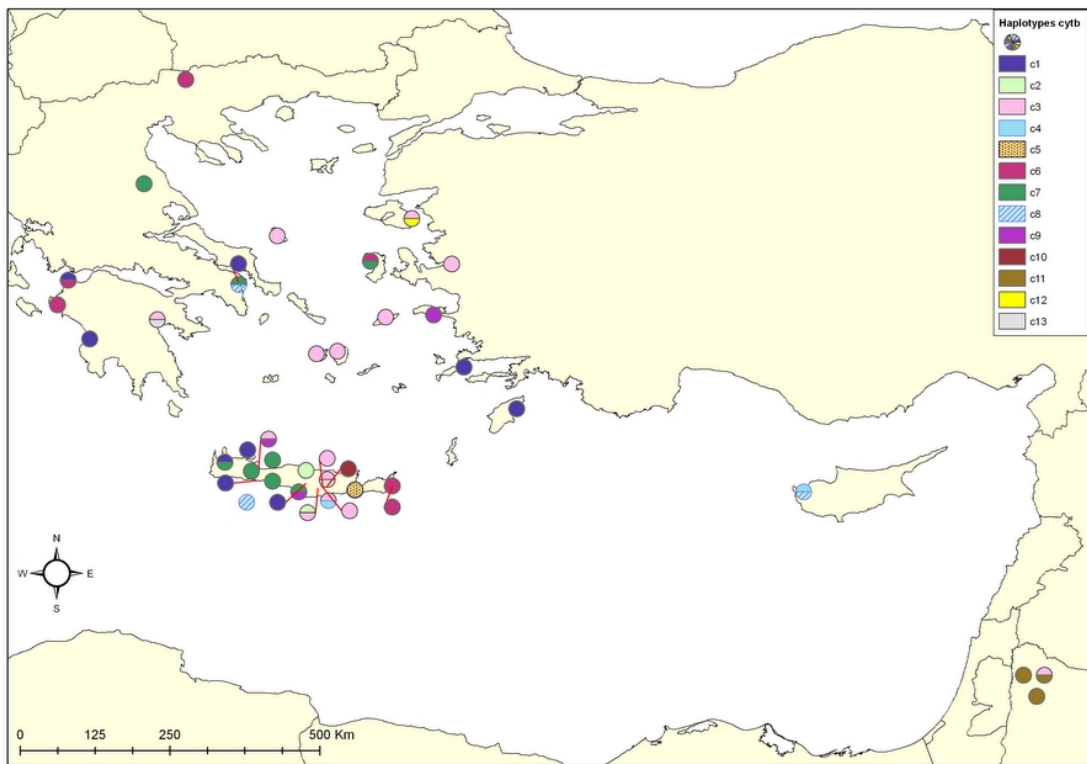
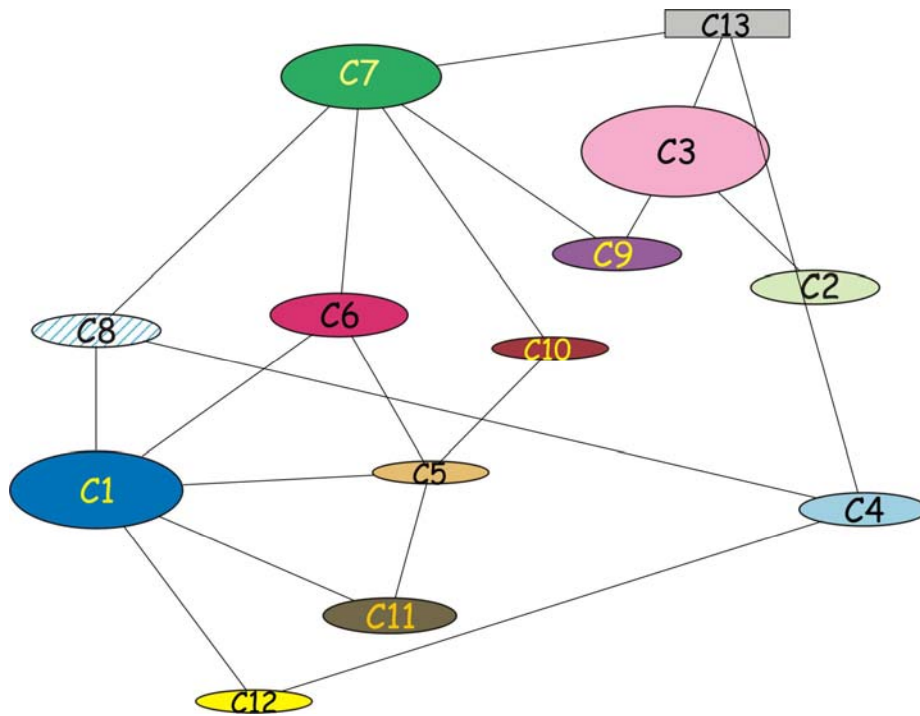


**Εικόνα 3.7.** Δενδρόγραμμα Μέγιστης Πιθανοφάνειας (ML) βάσει του μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης HKY+I+G. Το ίδιο δέντρο προέκυψε και από την ανάλυση Μπείσειανής Συμπερασματολογίας (BI). Οι αριθμοί επάνω στους κλάδους στις εκ των υστέρων πιθανότητες της Μπείσειανής ανάλυσης. Μόνο τιμές μεγαλύτερες από 95% παρουσιάζονται.

Όλες οι φυλογενετικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν συγκλίνουν στην ίδια γενικά τοπολογία. Το είδος *M. rivulata* εμφανίζεται ως μια μονοφυλετική ομάδα με πολύ καλή στατιστική στήριξη (NJ:100%, MP:98%, BI: 93%). Το ίδιο ισχύει και για τα είδη *M. caspica* και *M. leprosa*. Τα αποτελέσματα μας είναι σύμφωνα με την αναγωγή του *M. rivulata* σε ξεχωριστό είδος από τους Fritz & Wischuf (1997). Μέσα στο είδος *M. rivulata* δεν έχουμε ξεκάθαρη ομαδοποίηση απλοτύπων, εκτός από την περίπτωση των απλοτύπων της Ιορδανίας M31, M32, M33 (εικόνα 3.5 και 3.7).

Τέλος, με χρήση του προγράμματος TCS (version 1.21, Clement *et al.*, 2000) κατασκευάστηκε δίκτυο απλοτύπων (Haplotype Network) με σκοπό την διεξαγωγή Ανάλυσης Εγκιβωτισμένων Κλάδων (NCA, Nested Clade Analysis). Η μέθοδος αυτή δίνει τη δυνατότητα αποσαφήνισης της πληθυσμιακής δομής από την πληθυσμιακή ιστορία ανοικοδομώντας τη χρονική ακολουθία των γεγονότων που οδήγησαν στο τρέχον γενετικό πρότυπο που παρατηρείται σε έναν πληθυσμό (Templeton *et al.*, 1992; Templeton, 1998). Όμως το δίκτυο απλοτύπων που προέκυψε, εμπεριείχε πάρα πολλές πολλαπλές συνδέσεις (loops) ώστε ήταν αδύνατη η διεξαγωγή της ανάλυσης NCA. Οι πολλαπλές συνδέσεις υποδηλώνουν αμφισβητούμενες σχέσεις μεταξύ των απλοτύπων. Στη συνέχεια παρουσιάζεται ενδεικτικά το δίκτυο απλοτύπων μόνο για το *cyt b* (εικόνα 3.8). Τα αντίστοιχα δίκτυα τόσο για την D-loop όσο και για τη συνδυασμένη ανάλυση ήταν πολύ πιο πολύπλοκα και δύσκολο να παρασταθούν γραφικά με τρόπο που να φαίνονται όλες οι συνδέσεις. Το δίκτυο παρατίθεται σε συνδυασμό με το χάρτη των απλοτύπων του *cyt b*.





**Εικόνα 3.8.** Δίκτυο απλοτύπων του *M. rivulata* για το *cyt b* σε παράθεση με τον χάρτη κατανομής τους. Το μέγεθος της κάθε έλλειψης είναι αντιπροσωπευτικό της συχνότητας του απλοτύπου. Ο απλότυπος σε παραλληλόγραμμο δηλώνει ότι πιθανά είναι ο πιο προγονικός.

### 3.1.1.6 Έλεγχος του ρυθμού εξέλιξης των αλληλουχιών

Παρόλο που δεν έχουμε σαφές πρότυπο μέσα στο είδος *M. rivulata*, η ύπαρξη ενός μοριακού ρολογιού θα βοηθούσε πολύ στην χρονολόγηση απόσχισης κλάδων που είναι πιο διαφοροποιημένοι, όπως για παράδειγμα οι απλότυποι της Κύπρου και Ιορδανίας (βλέπε **εικόνα 3.7**). Επίσης θα ήταν πολύ χρήσιμο στη χρονολόγηση της απόκλισης μεταξύ των τριών υπό εξέταση ειδών του γένους *Mauremys*. Με τον τρόπο αυτό θα γινόταν πιο κατανοητή η εξελικτική και βιογεωγραφική ιστορία του γένους στο χώρο της Μεσογείου. Για τον έλεγχο της ομοιογένειας του εξελικτικού ρυθμού μέσα στους κλάδους του γένους *Mauremys* εφαρμόστηκε η δοκιμασία του λόγου των πιθανοφανειών (Likelihood Ratio Test, LRT). Η τιμή του LRT για το συνδυασμένο σύνολο δεδομένων (cyt *b* & D-loop) είναι:

$$\Delta = 2*(L_1-L_0) = 2*[-2688,41800 - (-2731,57205)] = 86,31$$

Ο αριθμός των εξεταζόμενων αλληλουχιών (απλοτύπων) είναι 42 άρα οι βαθμοί ελευθερίας (β.ε.= $n-2$ , όπου  $n$  ο αριθμός των αλληλουχιών) είναι 40, οπότε η τιμή του  $p$  σύμφωνα με την κατανομή  $\chi^2$  είναι:  $p = 3*10^{-5}$  δηλαδή  $p < 0,05$ . Οπότε η δοκιμασία του λόγου των πιθανοφανειών απορρίπτει τη μηδενική υπόθεση της ομοιογένειας του εξελικτικού ρυθμού στο συνδυασμένο σύνολο δεδομένων.

Αν εφαρμόσουμε την LRT στα ανεξάρτητα σύνολα δεδομένων βλέπουμε ότι με βάση τις αλληλουχίες cyt *b* έχουμε ομοιογένεια στον εξελικτικό ρυθμό ενώ με βάση την D-loop όχι.

Συγκεκριμένα για την D-loop:

$$\Delta = 2*(L_1-L_0) = 2*[-1443.39671 - (-1481.76016)] = 76.73$$

Ο αριθμός των εξεταζόμενων αλληλουχιών (απλοτύπων) είναι 24 άρα οι βαθμοί ελευθερίας είναι 22, οπότε η τιμή του  $p$  σύμφωνα με την κατανομή  $\chi^2$  είναι:  $p = 5*10^{-8}$  δηλαδή  $p < 0,05$ . Οπότε η δοκιμασία του λόγου των πιθανοφανειών απορρίπτει τη μηδενική υπόθεση της ομοιογένειας του εξελικτικού ρυθμού με βάση τις αλληλουχίες της D-loop.

Αντίθετα για το cyt *b*:

$$\Delta = 2*(L_1-L_0) = 2*[-1138.23689 - (-1152.17216)] = 27,87$$

Ο αριθμός των εξεταζόμενων αλληλουχιών (απλοτύπων) είναι 22 άρα οι βαθμοί ελευθερίας είναι 20, οπότε η τιμή του  $p$  σύμφωνα με την κατανομή  $\chi^2$  είναι:  $p= 0,1125$  δηλαδή  $p>0,05$ . Άρα ισχύει η μηδενική υπόθεση της ομοιογένειας του εξελικτικού ρυθμού όταν εξετάζουμε τις αλληλουχίες του *cyt b*.

#### 3.1.1.7 Εκτίμηση χρόνων απόκλισης

Η ομοιογένεια του εξελικτικού ρυθμού που παρατηρείται στις αλληλουχίες του *cyt b* των ειδών του γένους *Mauremys* στον χώρο Μεσογείου μας επιτρέπει τη συνδυασμένη χρήση των εκτιμώμενων γενετικών αποστάσεων μεταξύ των ειδών και του εξελικτικού ρυθμού που έχει χρησιμοποιηθεί σε κοντινά είδη, για την εύρεση του χρόνου απόκλισης μεταξύ των τριών μεσογειακών ειδών. Σε πολλές μελέτες χελωνών έχει χρησιμοποιηθεί ο εξελικτικός ρυθμός της τάξης του 0,3%- 0,4% ανά εκατομμύριο χρόνια συμπεριλαμβανομένων και μελετών για είδη του γένους *Mauremys* (Avisé *et al.* 1992; Caccone *et al.* 1999; Lenk *et al.* 1999; Mantziou *et al.*, 2004; Barth *et al.*, 2004). Αν εφαρμόσουμε στα αποτελέσματά μας τον προαναφερόμενο εξελικτικό ρυθμό καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το *M. leprosa* απέκλινε από τον κλάδο των *rivulata/caspica* κατά το Μέσο Μειόκαινο, περίπου 11-15 εκ. χρ. πριν από σήμερα. Στη συνέχεια η απόκλιση του κλάδου του *M. caspica* από το *M. rivulata* μπορεί να χρονολογηθεί περίπου στο Ανώτερο Μειόκαινο, 6-8 εκ. χρ. πριν από σήμερα.

#### 3.1.2 Μικροδορυφορικοί δείκτες

##### 3.1.2.1 Απομόνωση μικροδορυφορικών τόπων και έλεγχος πολυμορφισμού

Έξι από τους μικροδορυφορικούς τόπους που απομονώθηκαν ήταν πολυμορφικοί και κατάλληλοι για την παρούσα μελέτη (Mantziou *et al.*, 2005). Για τον έλεγχο του πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκαν 10 πληθυσμοί από την Ελλάδα με ελάχιστο αριθμό 23 ατόμων για τον έλεγχο του κάθε τόπου. Τα δείγματα προήλθαν από τις εξής περιοχές: Λάρισα, Άργος, Ρόδος, Κως, Λέσβος, Γαύδος, και 4 περιοχές της Κρήτης (Αλμυρός, Γεωργιούπολη,

Θραψανό, Πάρτιρα). Για τους 10 αυτούς πληθυσμούς ο αριθμός αλληλομόρφων κυμάνθηκε από 5 έως 18 και η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία από 0,19 έως 0,79. Από τον έλεγχο ανισοροπίας σύνδεσης (Linkage Disequilibrium) φάνηκε ότι οι τόποι μας δεν είναι συνδεδεμένοι. Δηλαδή οι γονότυποι σε κάθε γενετικό τόπο είναι ανεξάρτητοι από τους γονοτόπους των άλλων γενετικών τόπων. Στον **πίνακα 3.8** παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των τόπων και τα κύρια στοιχεία από τις αναλύσεις για τον έλεγχο πολυμορφισμού.

**Πίνακας 3.8.** Χαρακτηριστικά των έξι μικροδουρυφορικών τόπων και στοιχεία από την ανάλυση για τον έλεγχο πολυμορφισμού. n=αριθμός ατόμων, Na=αριθμός αλληλομόρφων, H<sub>0</sub>= παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, H<sub>E</sub>= αναμενόμενη ετεροζυγωτία (nonbiased, Nei, 1978), HWE= Hardy-Weinberg equilibrium.

Τόποι [GenBank ID]	Μικροδουρυφορική Σύνθεση	n	Na	H <sub>0</sub>	H <sub>E</sub>	p value για HWE
<b>MR-1</b> [AY934859]	(AC) <sub>11</sub>	26	5	0,577	0,716	0,3827
<b>MR-2</b> [AY934860]	(AC) <sub>9</sub>	23	5	0,783	0,652	0,6950
<b>MR-3</b> [AY934861]	(GT) <sub>8</sub>	26	5	0,192	0,468	0,0001
<b>MR-5</b> [AY934862]	(GA) <sub>18</sub>	27	10	0,593	0,848	0,0031
<b>MR-8</b> [AY934863]	(GT) <sub>32</sub> (GA) <sub>12</sub>	29	18	0,793	0,912	0,0001
<b>MR-9</b> [AY934864]	(CT) <sub>16</sub>	27	5	0,482	0,771	0,0064

Μόνο οι τόποι MR-1 και MR-2 βρισκόταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Το έλλειμμα ετεροζυγωτίας που εκδηλώνουν οι υπόλοιποι τόποι οφείλεται πιθανότατα στην πληθυσμιακή υποδιαίρεση μιας και τα μελετώμενα άτομα ανήκουν σε γεωγραφικά διακριτά διαφορετικούς πληθυσμούς (Wahlund effect) (Mantziou *et al.*, 2005).

### 3.1.2.2 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

#### 3.1.2.2.1 Ομαδοποίηση δεδομένων

Στην αρχική φάση των αναλύσεων συμπεριλήφθηκαν όλοι οι διαθέσιμοι πληθυσμοί. Όμως τελικά καταλήξαμε να μη συμπεριλάβουμε ορισμένους από αυτούς διότι δημιουργούσαν προβλήματα στις αναλύσεις (θόρυβο, background noise). Τα προβλήματα προκαλούνταν κυρίως λόγω του μικρού αριθμού ατόμων στους πληθυσμούς αυτούς σε συνδυασμό με τη μικρή διαφοροποίησή τους από άτομα άλλων πληθυσμών. Συνέπεια αυτού ήταν ότι δεν ήταν δυνατή η διάκριση αυτών από όλους τους υπόλοιπους πληθυσμούς. Έτσι αποκλείστηκαν όλοι οι πληθυσμοί με λιγότερα των 5 ατόμων, με εξαίρεση την Κύπρο και την Ιορδανία, απ' όπου συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση τα 4 άτομα ανά πληθυσμό που διαθέταμε. Παρά το μικρό μέγεθος του δείγματος δεν δημιουργήθηκε πρόβλημα στις αναλύσεις λόγω της μεγάλης διαφοροποίησης των συγκεκριμένων πληθυσμών από τους υπόλοιπους. Επίσης συμπεριλήφθηκαν οι πληθυσμοί Ινι, Κουρνάς, Κυπαρισσία, Παλαιοχώρι και Άραξος, παρόλο που διαθέτουν λιγότερα των 5 άτομα, γιατί στην πρώτη φάση των αναλύσεων (έλεγχος πληθυσμιακής διαφοροποίησης) έγινε συνένωσή τους με κοντινούς γεωγραφικά πληθυσμούς. Ο έλεγχος της ομοιότητας των πληθυσμών έγινε με την ανάλυση πληθυσμιακής διαφοροποίησης με το πρόγραμμα "Generop on the Web" (Raymond & Rousset, 2004).

Οι πληθυσμοί, οι οποίοι δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους και η γεωγραφική τους κατανομή επέτρεπε την ομαδοποίησή τους (π.χ. κοντινοί υγρότοποι ή υγρότοποι στην ίδια λεκάνη απορροής), ομαδοποιούνταν σε έναν κοινό πληθυσμό για τις περαιτέρω αναλύσεις. Ομαδοποιήθηκαν οι παρακάτω πληθυσμοί: α) Πάρτιρα, Ινι και Σκινιάς στην ομάδα του ανατολικού Αναποδάρη (ANE), β) Πλακιώτισσα και Αμουργέλλες στην ομάδα του δυτικού Αναποδάρη (ANW), γ) Νέα Μάκρη και Μαραθώνας στην ομάδα της Αττικής (ATT), δ) Ρόδος και Κως στην ομάδα των Δωδεκανήσων (DOD), ε) Γεωργιούπολη και Κουρνάς στην ομάδα GEK, στ)

Παλαιοχώρι, Κυπαρισσία, Άργος και Άραξος στην ομάδα της Πελοποννήσου (PEL). Στην περίπτωση της Πελοποννήσου, οι υγρότοποι δεν είναι ιδιαίτερα κοντινοί, αλλά έχουμε λίγα άτομα από κάθε πληθυσμό, τα οποία είναι πιο συγγενικά μεταξύ τους και αρκετά διαφοροποιημένα από τις υπόλοιπες περιοχές μελέτης. Έτσι, με δεδομένο το αποτέλεσμα του ελέγχου ομοιότητας πληθυσμών του GENEPOP μπορούμε να τους ομαδοποιήσουμε χωρίς να επηρεαστούν οι περαιτέρω αναλύσεις. Το ίδιο ακριβώς ισχύει και για τις Κω και Ρόδο που ενοποιήθηκαν στην ομάδα των Δωδεκανήσων. Η ομαδοποίηση πληθυσμών για τους προαναφερόμενους λόγους έχει χρησιμοποιηθεί και σε άλλες παρόμοιες μελέτες (Pearse *et al.*, 2006). Τελικά, από τους 26 πληθυσμούς που επιλέχθηκαν για να συμπεριληφθούν στις αναλύσεις των μικροδορυφορικών τόπων, προέκυψαν 17 διακριτές πληθυσμιακές ομάδες που από εδώ και έπειτα θα ονομάζονται πληθυσμοί και παρουσιάζονται στον **πίνακα 3.9**.

**Πίνακας 3.9.** Ομαδοποίηση πληθυσμών σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ελέγχου πληθυσμιακής διαφοροποίησης (GenePop v3.4).

Κωδικοποίηση	Περιοχή	Αριθμός ατόμων
ALM	Κρήτη, Αλμυρός ποταμός	33
ANE	Κρήτη, Πάρτιρα	32
	Κρήτη, Ίνι	
ANW	Κρήτη, Σκινιάς	29
	Κρήτη, Αμουργέλλες	
ATT	Κρήτη, Πλακιώτισσα	13
	Αττική, Μαραθώνας	
BRA	Αττική, Νέα Μάκρη	8
CYP	Κρήτη, Μπραμιανά	4
DOD	Κύπρος	10
	Αιγαίο, Ρόδος	
GAV	Αιγαίο, Κως	27
GEK	Κρήτη, Γαύδος	11
	Κρήτη, Γεωργιούπολη	
GER	Κρήτη, Κουρνάς	19
JOR	Κρήτη, Γέργερη	4
	Ιορδανία	4

Κωδικοποίηση	Περιοχή	Αριθμός ατόμων
KER	Κερκίνη	14
LES	Αιγαίο, Λέσβος	7
PEL	Πελ/νησος, Παλαιοχώρι	11
	Πελ/νησος, Κυπαρισσία	
	Πελ/νησος, Άργος	
	Πελ/νησος, Άραξος	
POM	Κρήτη, Πόμπια	23
PRE	Κρήτη, Πρέβελι	5
THR	Κρήτη, Θραψανό	23

Ο πληθυσμός της Πρέβελης (PRE) δημιουργεί ένα μικρό πρόβλημα αφού φαίνεται να μη διαφέρει σημαντικά από πολλούς άλλους πληθυσμούς της Κρήτης, με τους οποίους όμως δεν δικαιολογείται η ομαδοποίησή του. Θεωρώ ότι αυτό οφείλεται σε κακή διακριτική ικανότητα λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος. Προς το παρόν, όμως, αποφάσισα να διατηρήσω τον πληθυσμό της Πρέβελης στις αναλύσεις, αφού αποτελεί έναν από τους δυο διαθέσιμους πληθυσμούς της Νότιας Κρήτης. Έχοντας, όμως, υπόψη την όχι τόσο καλή συμπεριφορά του δείγματος, αποκλείστηκε από την Μπείεσιανή ανάλυση στην οποία και δημιουργούσε πρόβλημα.

#### 3.1.2.2.2 Στατιστική και πληθυσμιακή ανάλυση

Στον **πίνακα 3.10** παρουσιάζεται ο αριθμός και τα μεγέθη των αλληλομόρφων ανά τόπο, ενώ στον **πίνακα 3.11** ο αριθμός των αλληλομόρφων ανά τόπο και ανά πληθυσμό. Ο αριθμός των αλληλομόρφων κυμαίνεται από 6 έως 25.

**Πίνακας 3.10.** Αριθμός και μεγέθη (bp) αλληλόμορφων για κάθε μικροδορυφορικό τόπο.

	MR 1	MR 2	MR 3	MR 5	MR 8	MR 9
<i>No of alleles</i>	8	18	6	16	25	9
1	222	155	181	143	126	85
2	224	161	183	145	128	89
3	226	165	185	147	144	91
4	228	167	187	149	150	93
5	230	183	189	153	154	97
6	232	185	193	155	156	99
7	234	195		157	158	101
8	238	199		159	160	103
9		201		161	162	105
10		207		163	164	
11		209		165	166	
12		211		175	168	
13		223		177	170	
14		225		179	172	
15		227		183	174	
16		229		189	176	
17		231			178	
18		239			180	
19					182	
20					184	
21					186	
22					188	
23					190	
24					192	
25					194	

**Πίνακας 3.11.** Αριθμός αλληλομόρφων ανά πληθυσμό για κάθε μικροδορυφορικό τόπο.

	MR-1	MR-2	MR-3	MR-5	MR-8	MR-9
<i>No of alleles</i>	8	18	6	16	25	9
ALM	5	6	3	5	12	5
ANE	5	5	3	5	9	4
ANW	5	4	1	5	7	3
ATT	2	3	3	3	3	3
BRA	3	5	2	2	6	4
CYP	4	3	3	3	4	3
DOD	3	9	3	10	11	5
GAV	4	3	3	5	4	3
GEK	3	4	2	6	7	4
GER	5	4	2	4	5	3
JOR	3	2	3	2	1	3
KER	2	1	3	4	5	4
LES	2	3	2	5	4	2
PEL	3	3	2	5	6	3
POM	6	5	2	4	7	4
PRE	4	3	1	5	4	4
THR	5	5	2	5	9	3



Τα μοναδικά αλληλόμορφα (private alleles), δηλαδή αλληλόμορφα που υπάρχουν μόνο σε έναν πληθυσμό, εμφανίζονται στην πλειονότητά τους στους πληθυσμούς της Κύπρου (CYP) και των Δωδεκανήσων (DOD). Στον **πίνακα 3.12** φαίνεται η κατανομή των μοναδικών αλληλομόρφων στους πληθυσμούς.

Επίσης εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν τέσσερα αλληλόμορφα τα οποία είναι κοινά μεταξύ των πληθυσμών της Κύπρου και της Ιορδανίας και τα οποία δεν εμφανίζονται σε κανέναν άλλο πληθυσμό. Τα αλληλόμορφα αυτά είναι τα εξής: α) τόπος MR-5: 143 bp, 145 bp, β) τόπος MR-8: 144 bp, γ) τόπος MR-9: 91 bp.

Παρά το ότι κατά τον έλεγχο πολυμορφισμού έγινε έλεγχος για τον ανεξάρτητο διαχωρισμό των μικροδορυφορικών τόπων (Linkage Disequilibrium), ο ίδιος έλεγχος πραγματοποιήθηκε και για το σύνολο των πληθυσμών. Τα αποτελέσματα του ελέγχου ήταν ενδεικτικά της απουσίας σύνδεσης των γενετικών τόπων που αναλύθηκαν.

Πίνακας 3.12. Μοναδικά αλληλόμορφα (private alleles) σε κάθε πληθυσμό.

Πληθυσμός	Αρ. Μοναδικών Αλληλομόρφων	Τόπος	Αλληλόμορφα (bp)
DOD	8	MR-2	183
			195
			201
		MR-5	183
			189
			162
		MR-8	172
			MR-9
CYP	155		
	MR-2	161	
		167	
MR-5		147	
	MR-8	126	
		128	
MR-9		150	
	GAV	85	
		GEK	165
KER			228
	THR		166
		JOR	194
MR-2			165
	MR-2		185

Η μέση παρατηρούμενη ( $H_o$ ) και αναμενόμενη ( $H_e$ ) ετεροζυγωτία (Nei, 1978) υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος GENETIX και παρουσιάζονται στον **πίνακα 3.13**. Η αναμενόμενη ετεροζυγωτία κυμαίνεται από 0,41 έως 0,79 ενώ η παρατηρούμενη από 0,31 έως 0,75.

**Πίνακας 3.13.** Παρατηρούμενες ( $H_o$ ) και αναμενόμενες ( $H_e$ , non-biased, Nei, 1978) τιμές ετεροζυγωτίας για κάθε μικροδορυφορικό τόπο και κάθε πληθυσμό.

Πληθυσμός	MR-1		MR-2		MR-3		MR-5		MR-8		MR-9		Συνολικά	
	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$
ALM	0,73	0,58	0,70	0,64	0,09	0,09	0,67	0,70	0,76	0,76	0,72	0,79	<b>0,61</b>	<b>0,59</b>
ANE	0,75	0,69	0,61	0,74	0,09	0,03	0,59	0,59	0,73	0,72	0,64	0,71	<b>0,57</b>	<b>0,58</b>
ANW	0,71	0,76	0,66	0,73	0,00	0,00	0,72	0,57	0,79	0,72	0,60	0,61	<b>0,58</b>	<b>0,57</b>
ATT	0,44	0,31	0,39	0,45	0,59	0,31	0,52	0,46	0,22	0,23	0,28	0,31	<b>0,41</b>	<b>0,35</b>
BRA	0,67	0,63	0,60	0,63	0,23	0,00	0,46	0,38	0,84	0,63	0,70	1,00	<b>0,58</b>	<b>0,54</b>
CYP	0,82	1,00	0,68	0,50	0,68	0,50	0,61	0,50	0,82	1,00	0,75	1,00	<b>0,73</b>	<b>0,75</b>
DOD	0,64	0,40	0,84	0,89	0,64	0,50	0,93	0,63	0,94	0,90	0,74	0,56	<b>0,79</b>	<b>0,64</b>
GAV	0,61	0,63	0,55	0,54	0,15	0,00	0,53	0,38	0,39	0,41	0,37	0,20	<b>0,44</b>	<b>0,36</b>
GEK	0,52	0,36	0,52	0,64	0,25	0,09	0,72	0,27	0,82	1,00	0,71	0,73	<b>0,59</b>	<b>0,52</b>
GER	0,66	0,58	0,64	0,58	0,31	0,26	0,63	0,63	0,69	0,63	0,61	0,89	<b>0,59</b>	<b>0,60</b>
JOR	0,46	0,50	0,54	0,75	0,46	0,50	0,54	0,25	0,00	0,00	0,75	1,00	<b>0,46</b>	<b>0,50</b>
KER	0,25	0,29	0,00	0,00	0,26	0,00	0,66	0,43	0,73	0,71	0,56	0,43	<b>0,41</b>	<b>0,31</b>
LES	0,36	0,43	0,44	0,17	0,36	0,43	0,80	0,29	0,57	0,71	0,53	0,17	<b>0,51</b>	<b>0,37</b>
PEL	0,26	0,27	0,42	0,10	0,45	0,45	0,72	0,60	0,72	0,55	0,48	0,40	<b>0,51</b>	<b>0,40</b>
POM	0,73	0,65	0,73	0,65	0,16	0,09	0,67	0,59	0,62	0,61	0,63	0,43	<b>0,59</b>	<b>0,50</b>
PRE	0,80	0,60	0,62	0,40	0,00	0,00	0,80	0,80	0,78	0,60	0,73	0,80	<b>0,62</b>	<b>0,53</b>
THR	0,73	0,57	0,50	0,57	0,09	0,00	0,61	0,61	0,85	0,70	0,61	0,39	<b>0,56</b>	<b>0,47</b>

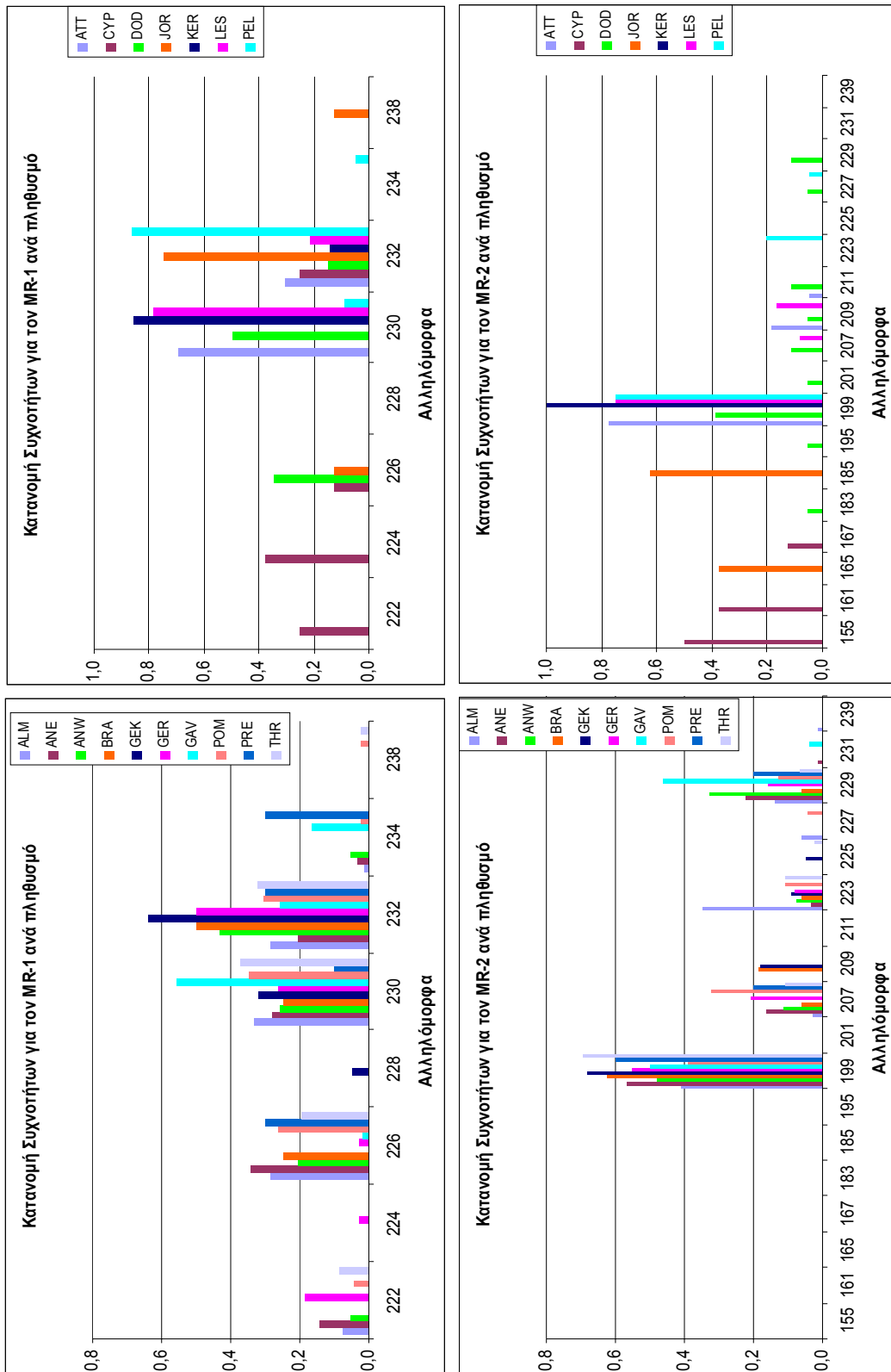
Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών που παρατηρούνται μεταξύ  $H_o$  και  $H_e$  καθορίστηκε με τον έλεγχο απόκλισης από την ισορροπία Hardy-Weinberg, που έγινε με το πρόγραμμα GENEPOP. Έγιναν δυο έλεγχοι ο πρώτος με εναλλακτική υπόθεση  $H_1 =$  έλλειμμα ετεροζυγωτίας και ο δεύτερος με  $H_1 =$  πλεόνασμα ετεροζυγωτίας. Από τους ελέγχους προέκυψε ότι κανένας πληθυσμός δεν παρουσιάζει πλεόνασμα ετεροζυγωτίας, ενώ έλλειμμα παρουσιάζουν οι εξής πληθυσμοί: ATT, DOD, GAV, GEK, KER, LES, PEL, POM, THR. Το έλλειμμα ετεροζυγωτίας μπορεί να οφείλεται σε διάφορες αιτίες (Hoarau *et al.*, 2005; Dorak, 2006): α) στην ύπαρξη μηδενικών αλληλομόρφων (null alleles) που δεν πολλαπλασιάζονται κατά την αντίδραση της PCR, β) σε ομομιξία εντός των πληθυσμών, και γ) σε πληθυσμιακή υποδιαίρεση. Από τον έλεγχο για την πιθανότητα ύπαρξης μηδενικών αλληλομόρφων με το πρόγραμμα Micro-Checker (v2.2.3) προέκυψε ότι κάποιοι από τους πληθυσμούς μπορεί να οφείλουν το έλλειμμα σε ύπαρξη μηδενικών αλληλομόρφων. Οι πληθυσμοί και οι

μικροδορυφορικοί τόποι στους οποίους μπορεί να υπάρχουν μηδενικά αλληλόμορφα φαίνονται στον **πίνακα 3.14**.

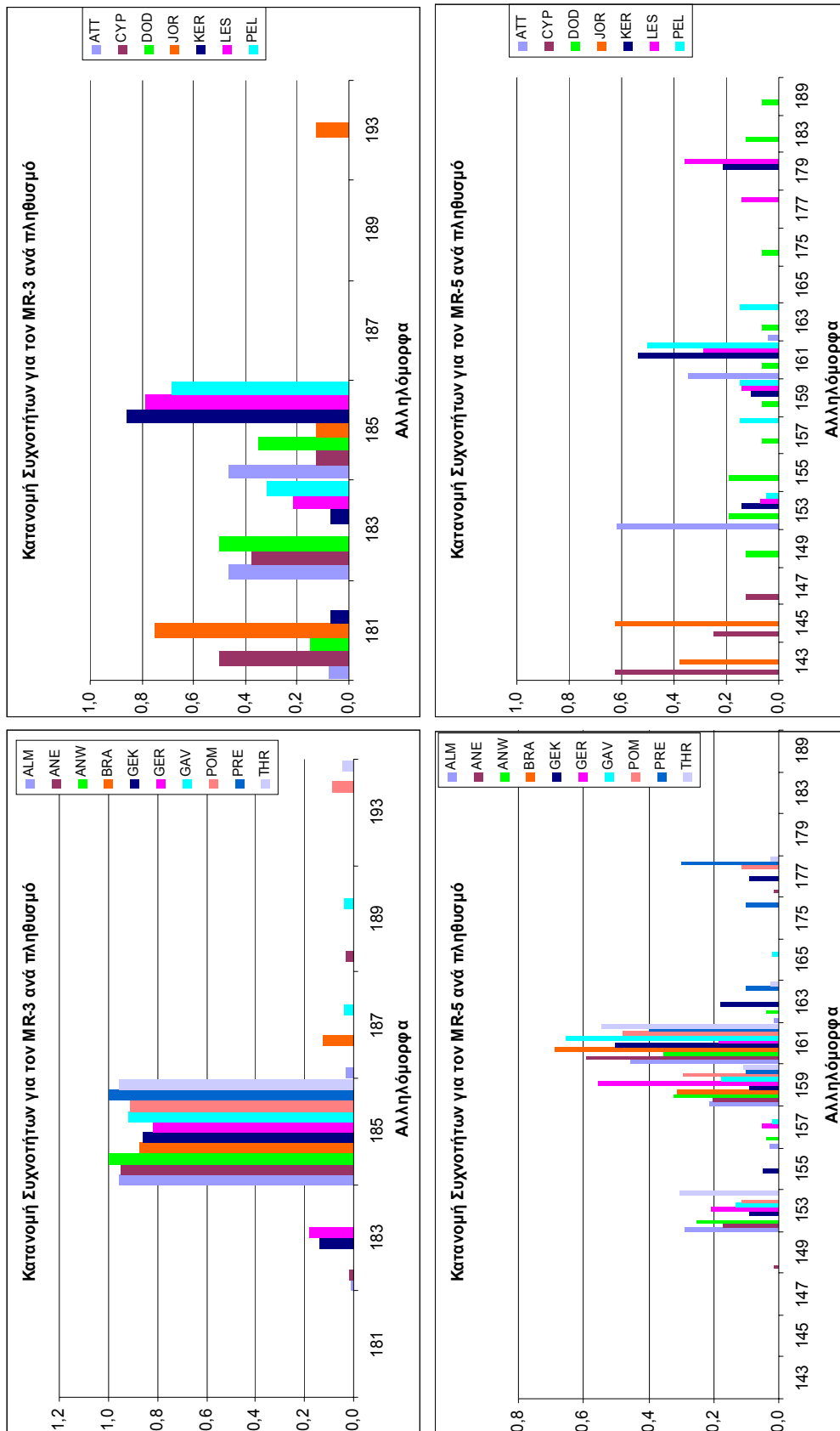
**Πίνακας 3.14.** Οι πληθυσμοί και οι αντίστοιχοι μικροδορυφορικοί τόποι στους οποίους μπορεί να υπάρχουν μηδενικά αλληλόμορφα.

Πληθυσμοί	Μικροδορυφορικοί τόποι
DOD	MR-5
GAV	MR-3, MR-9
GEK	MR-5
KER	MR-3
LES	MR-5
PEL	MR-2
THR	MR-3

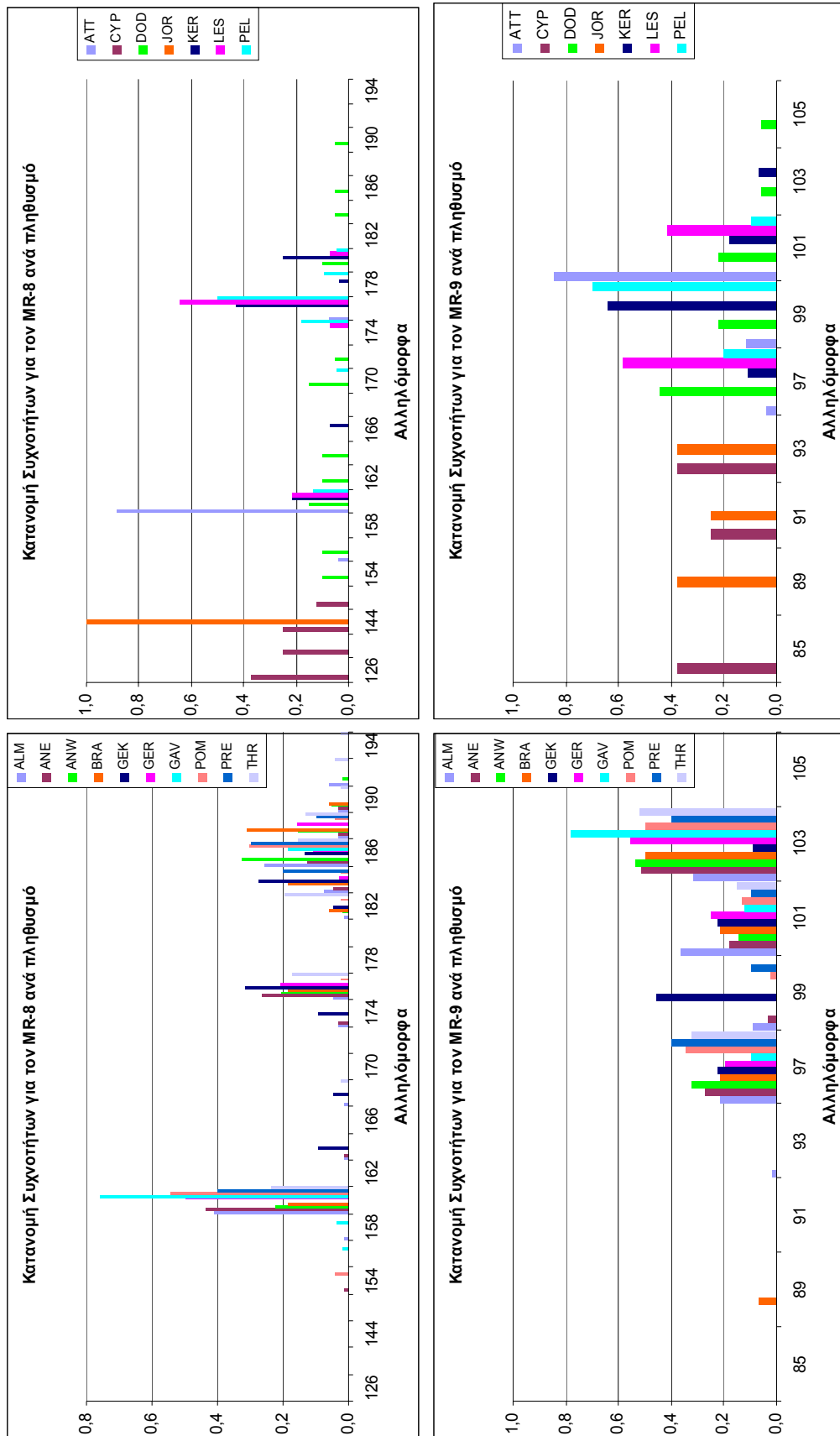
Οι αλληλικές συχνότητες για κάθε πληθυσμό και κάθε μικροδορυφορικό τόπο παρουσιάζονται στην **εικόνα 3.9**. Από τα διαγράμματα παρατηρούμε ότι στον πληθυσμό της Κύπρου (CYP) έχουμε την εμφάνιση σχεδόν πάντα των μικρότερων σε μέγεθος (bp) αλληλομόρφων. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στους περισσότερους τόπους για την Ιορδανία (JOR).



Εικόνα 3.9. Κατανομή Συχνοτήτων για κάθε μικροδορυφορικό τόπο και κάθε πληθυσμό. Στα αριστερά διαγράμματα παρουσιάζονται οι πληθυσμοί της Κρήτης, ενώ στα δεξιά της υπόλοιπης περιοχής μελέτης.



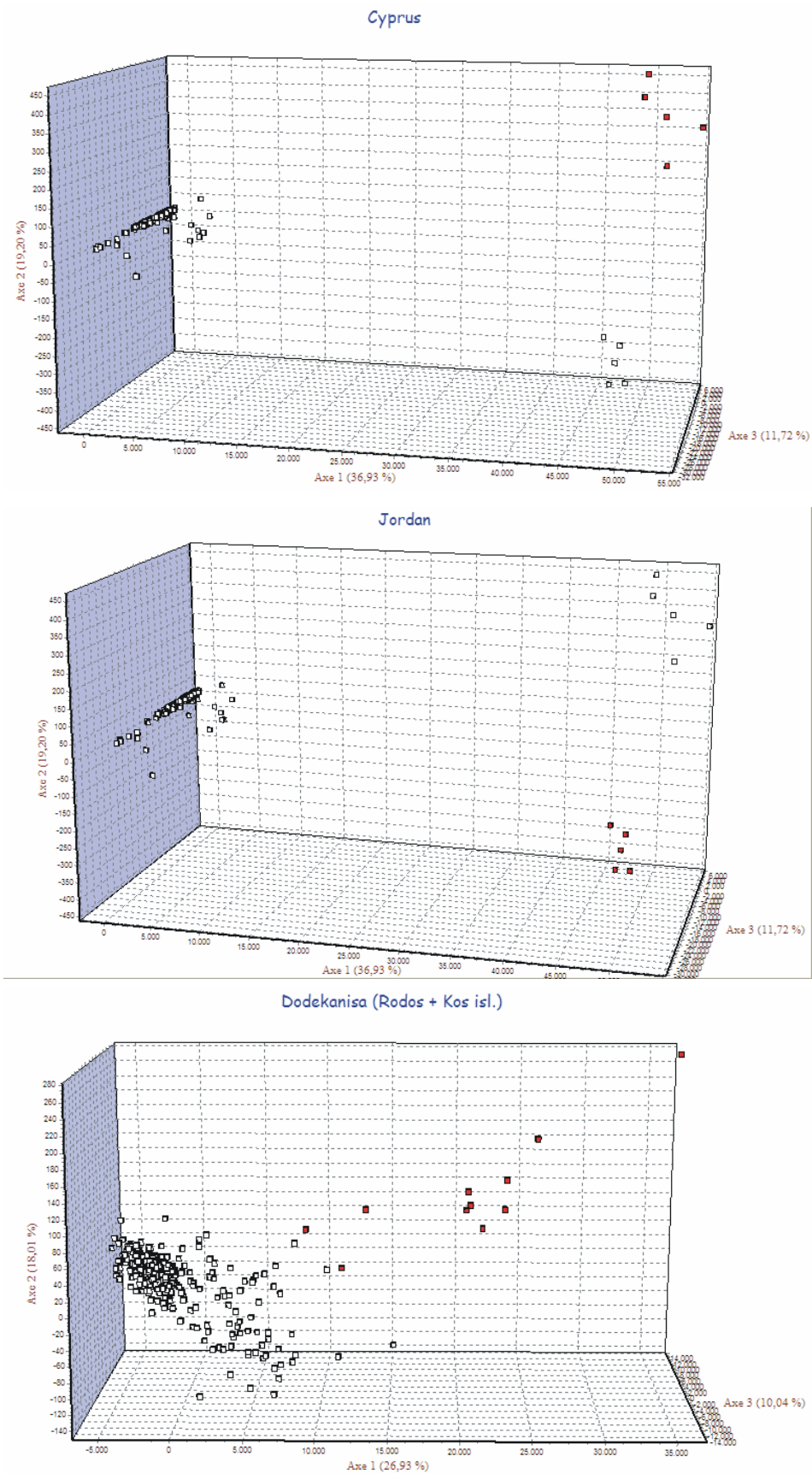
Εικόνα 3.9. (συνέχεια) Κατανομή Συχνοτήτων για κάθε μικροδορυφορικό τόπο και κάθε πληθυσμό. Στα αριστερά διαγράμματα παρουσιάζονται οι πληθυσμοί της Κρήτης, ενώ στα δεξιά της υπόλοιπης περιοχής μελέτης.



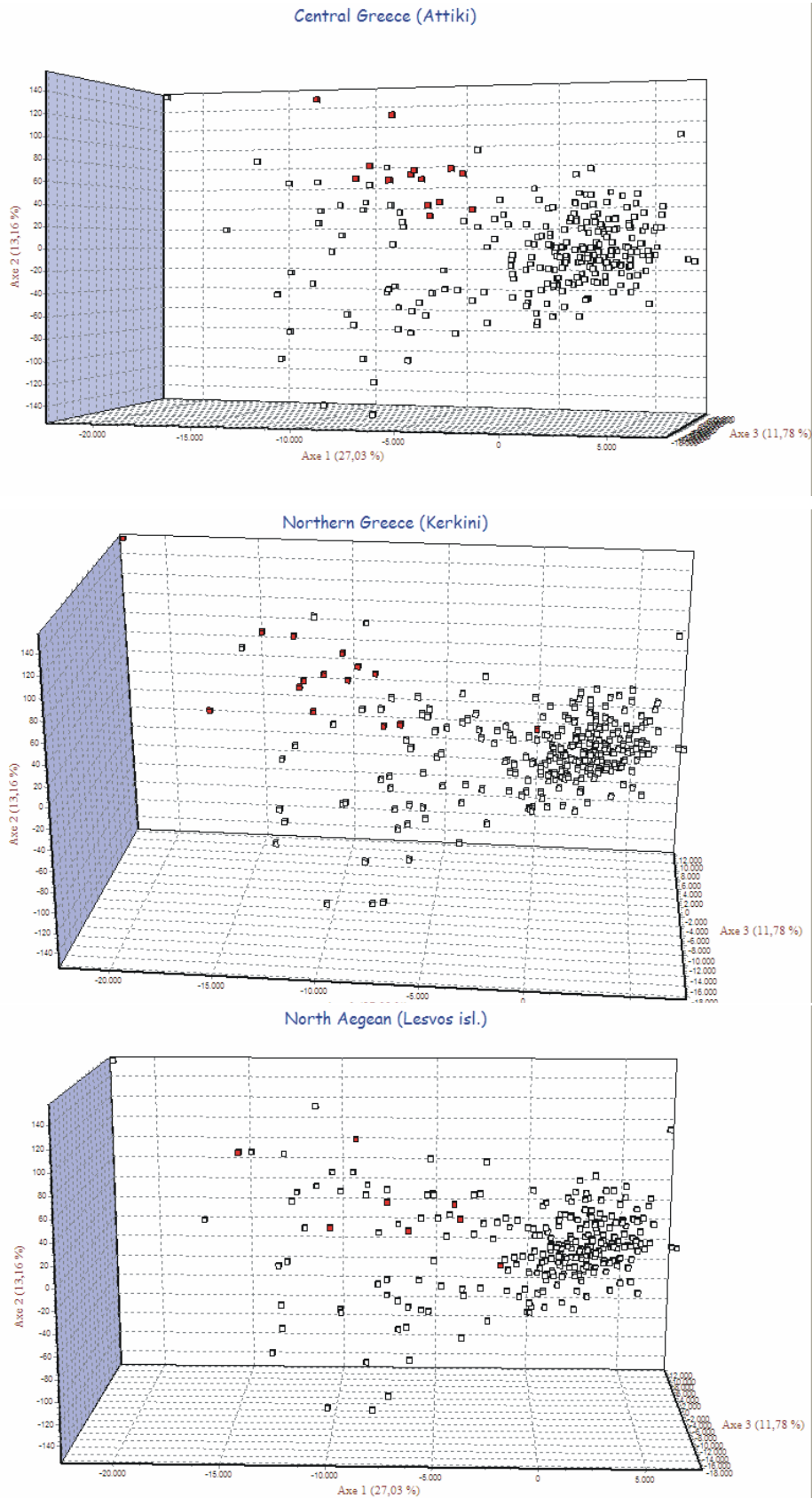
Εικόνα 3.9. (συνέχεια) Κατανομή Συχνοτήτων για κάθε μικροδορυφορικό τύπο και κάθε πληθυσμό. Στα αριστερά διαγράμματα παρουσιάζονται οι πληθυσμοί της Κρήτης, ενώ στα δεξιά της υπόλοιπης περιοχής μελέτης.

Τα τρισδιάστατα γραφήματα που προέκυψαν από την Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών (CA) φαίνονται στην **εικόνα 3.10**. Η τελική θέση του κάθε ατόμου- σημείου στο γράφημα καθορίζεται από το γονότυπο του ατόμου αυτού σε όλους τους υπό μελέτη μικροδορυφορικούς τόπους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το 94,09% της συνολικής διαφοροποίησης στην περιοχή μελέτης ερμηνεύεται από τους 10 άξονες, ενώ οι τρεις πρώτοι ερμηνεύουν το 67,85% της παρατηρούμενης διαφοροποίησης. Για την κατασκευή των γραφημάτων αρχικά συμπεριλήφθηκαν όλοι οι πληθυσμοί και έτσι πήραμε τα δυο πρώτα διαγράμματα όπου με κόκκινα σημεία φαίνονται τα άτομα των πληθυσμών της Κύπρου και της Ιορδανίας. Στη συνέχεια αφαιρέσαμε από την ανάλυση αυτούς τους πιο διαφοροποιημένους πληθυσμούς, ώστε να έχουμε μεγαλύτερη ανάλυση στους υπόλοιπους. Έτσι πήραμε το γράφημα όπου διαχωρίζεται ο πληθυσμός των Δωδεκανήσων, και αφού τον αφαιρέσαμε καταλήξαμε στα διαγράμματα των πληθυσμών Αττικής, Κερκίνης, Λέσβου και Πελοποννήσου. Τέλος, αφαιρέσαμε όλους τους προαναφερόμενους πληθυσμούς και καταλήξαμε μόνο με τους πληθυσμούς της Κρήτης. Στα τελευταία αυτά τρία διαγράμματα βλέπουμε να διαχωρίζεται ο πληθυσμός της Γαύδου και της δυτικής Κρήτης (Κουρνάς και Γεωργιούπολη) και να ομαδοποιούνται όλοι μαζί οι πληθυσμοί της ανατολικής και κεντρικής Κρήτης.

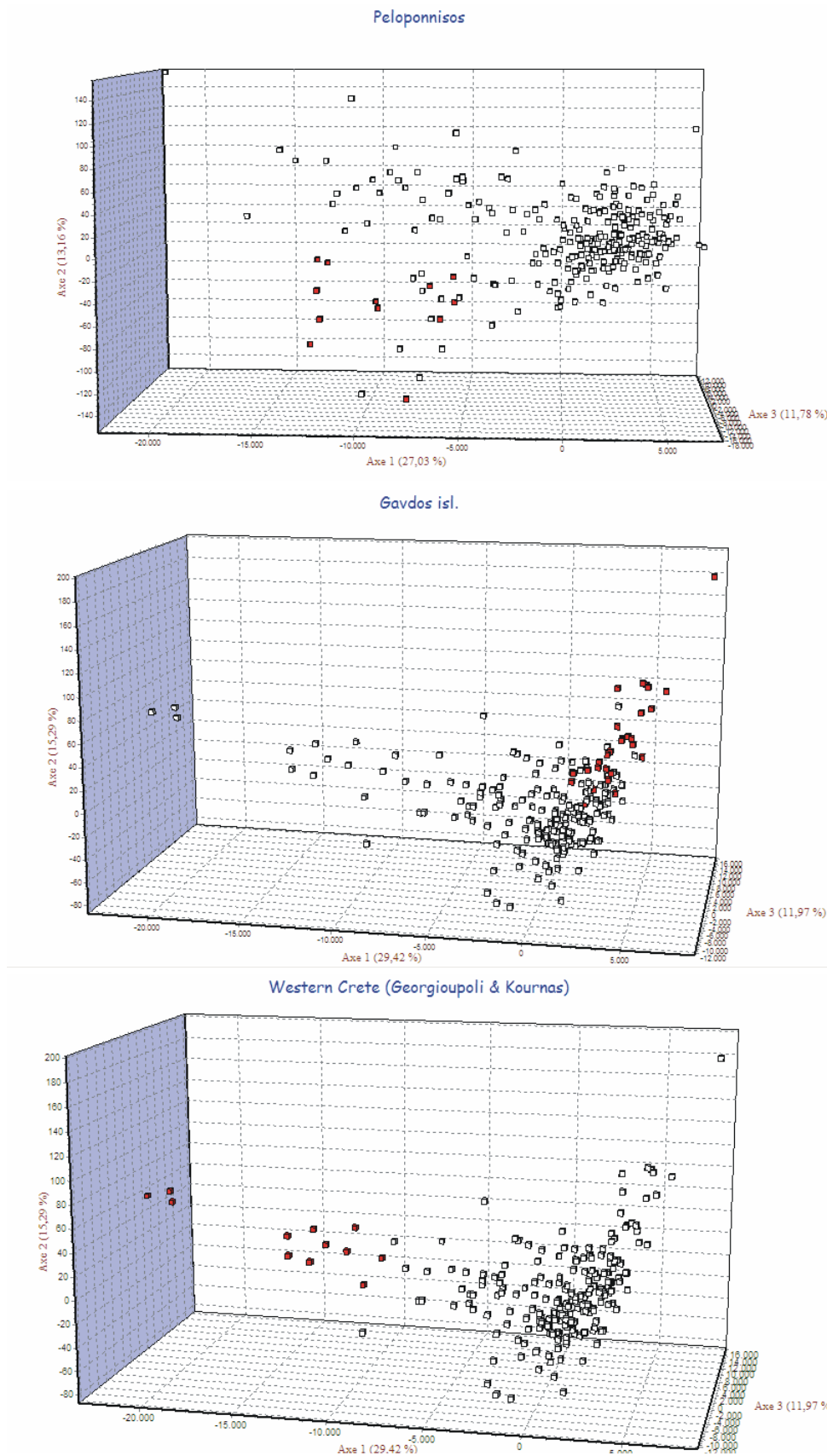




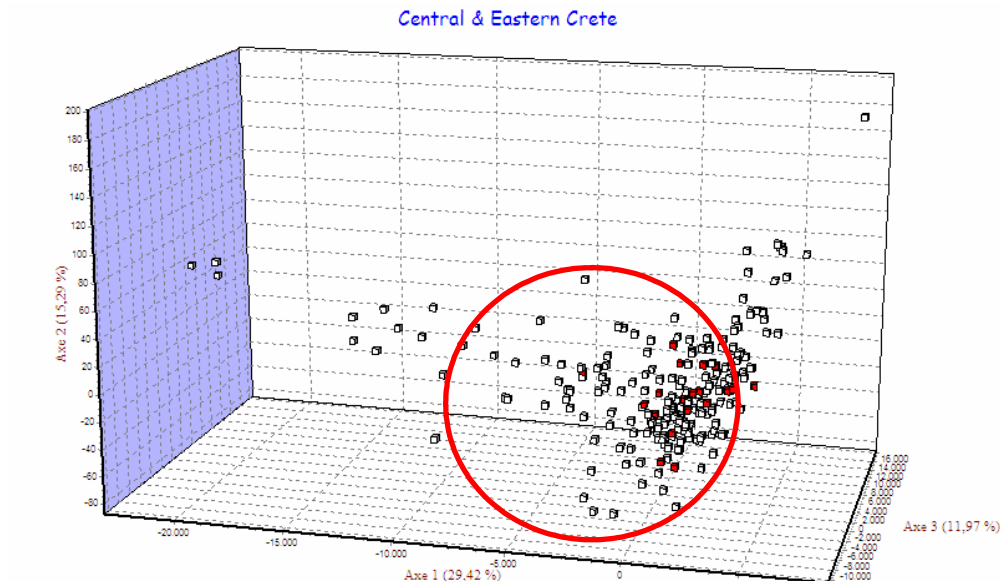
Εικόνα 3.10. Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών (CA). Με κόκκινο παρουσιάζονται τα άτομα του πληθυσμού που αναφέρεται στο τίτλο του γραφήματος.



Εικόνα 3.10 (συνέχεια). Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών (CA). Με κόκκινο παρουσιάζονται τα άτομα του πληθυσμού που αναφέρεται στο τίτλο του γραφήματος.



Εικόνα 3.10 (συνέχεια). Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών (CA). Με κόκκινο παρουσιάζονται τα άτομα του πληθυσμού που αναφέρεται στο τίτλο του γραφήματος.



**Εικόνα 3.10 (συνέχεια).** Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών (CA). Όλα τα άτομα που βρίσκονται μέσα στο κόκκινο ελλειπτικό σχήμα ανήκουν σε πληθυσμούς της κεντρικής και ανατολικής Κρήτης (ALM, ANE, ANW, BRA, GER, POM, PRE, THR).

Οι τιμές  $F_{st}$  (Weir & Cockerham, 1984), όπως υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα GENETIX (v 4.04) παρουσιάζονται στον **πίνακα 3.15**.

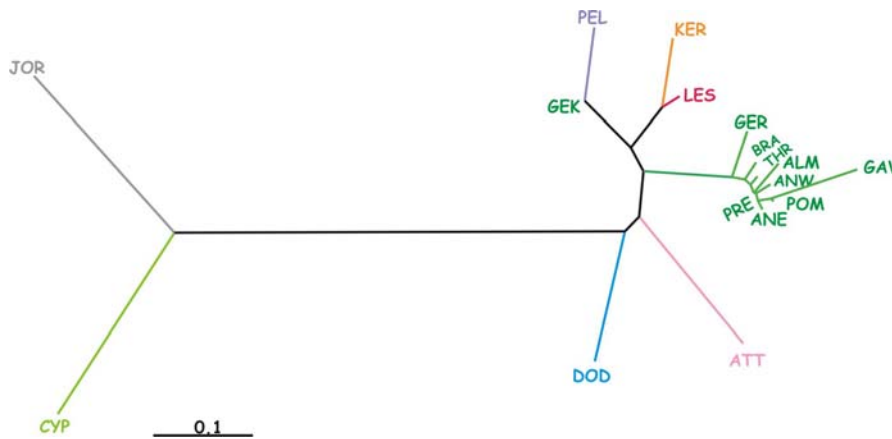
**Πίνακας 3.15.** Τιμές  $F_{st}$  μεταξύ των πληθυσμών που αναλύθηκαν. Οι τιμές που παρουσιάζονται με *italics* δεν είναι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές από το μηδέν.

	ANE	ANW	ATT	BRA	CYP	DOD	GAV	GEK	GER	JOR	KER	LES	PEL	POM	PRE	THR
ALM	0,03	0,04	0,20	0,05	0,32	0,13	0,11	0,10	0,07	0,40	0,19	0,15	0,18	0,03	<i>0,03</i>	0,04
ANE		0,03	0,25	0,03	0,35	0,16	0,08	0,12	0,06	0,44	0,18	0,15	0,20	0,02	<i>0,01</i>	0,02
ANW			0,29	0,03	0,34	0,16	0,10	0,11	0,04	0,41	0,22	0,16	0,19	0,03	<i>0,01</i>	0,02
ATT				0,29	0,45	0,19	0,30	0,26	0,23	0,55	0,28	0,23	0,33	0,25	0,30	0,24
BRA					0,32	0,14	0,13	0,06	0,06	0,41	0,20	0,14	0,15	0,05	<i>0,02</i>	<i>0,01</i>
CYP						0,18	0,46	0,32	0,32	0,23	0,46	0,36	0,36	0,33	0,30	0,35
DOD							0,26	0,12	0,15	0,30	0,20	0,10	0,18	0,14	0,10	0,15
GAV								0,25	0,12	0,53	0,28	0,28	0,33	0,08	0,11	0,11
GEK									0,13	0,40	0,12	0,11	<i>0,02</i>	0,14	0,07	0,09
GER										0,41	0,23	0,16	0,19	0,05	0,07	0,06
JOR											0,55	0,48	0,43	0,41	0,41	0,43
KER												0,11	0,19	0,23	0,23	0,16
LES													0,20	0,16	0,15	0,13
PEL														0,22	0,18	0,18
POM															<i>0,01</i>	0,03
PRE																<i>0,02</i>

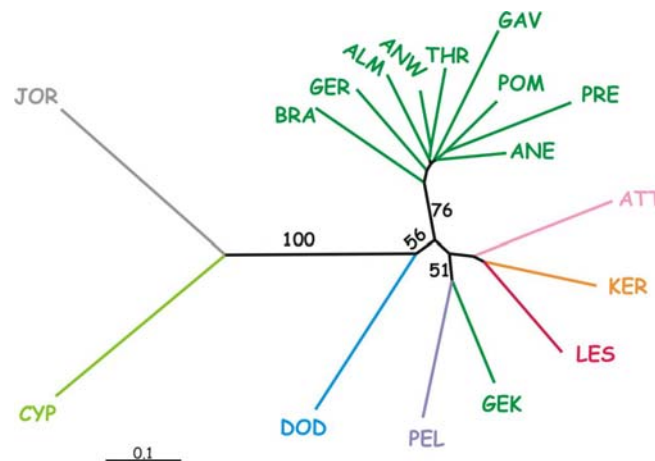
Η μεγαλύτερη τιμή  $F_{st}$  παρατηρείται μεταξύ Ιορδανίας και Κερκίνης και Ιορδανίας και Αττικής ( $F_{st} = 0,55$ ). Η μικρότερη τιμή  $F_{st}$  παρατηρείται μεταξύ κάποιων πληθυσμών της Κρήτης ( $F_{st} = 0,01$ ).

Κατά τον έλεγχο της απομόνωσης λόγω απόστασης (IBD, isolation by distance) εξετάστηκαν οι τιμές  $F_{st}/(1 - F_{st})$  σε σχέση με τους νεπέριους λογάριθμους των γεωγραφικών αποστάσεων μεταξύ των πληθυσμών. Από τον έλεγχο αυτό προέκυψε ότι υπάρχει συσχέτιση της γενετικής διαφοροποίησης και της γεωγραφικής απόστασης μεταξύ των πληθυσμών ( $p < 0,05$ ,  $R^2 = 0,485$ ).

Οι γενετικές αποστάσεις  $D_{AS}$  (Allele-Sharing Statistic, Stephens *et al.*, 1992) και  $D_C$  (Chord distance, Cavalli-Sforza & Edwards, 1967) που υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα Populations (v.1.2.28, Langelle, 1999), χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων με τη Μέθοδο Σύνδεσης Γειτόνων (Neighbour-Joining). Τα δέντρα παρουσιάζονται στην **εικόνα 3.11** και **3.12** αντίστοιχα, ενώ στην **εικόνα 3.13** παρουσιάζονται οι περιοχές μελέτης με τα ίδια χρώματα που παρουσιάζονται οι πληθυσμοί στα φυλογενετικά δέντρα.



**Εικόνα 3.11.** Άρριζο ακτινωτό φυλογενετικό δέντρο με τη Μέθοδο Σύνδεσης Γειτόνων (Neighbour-Joining), με βάση τις γενετικές αποστάσεις  $D_{AS}$  (Allele-Sharing Statistic, Stephens *et al.*, 1992).



**Εικόνα 3.12.** Άρριζο ακτινωτό φυλογενετικό δέντρο με τη Μέθοδο Σύνδεσης Γειτόνων (Neighbour-Joining), με βάση τις γενετικές αποστάσεις  $D_C$  (Chord distance, Cavalli-Sforza & Edwards, 1967). Οι αριθμοί στους κλάδους αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (μόνο τιμές μεγαλύτερες από 50% παρουσιάζονται).



**Εικόνα 3.13.** Χάρτης περιοχών μελέτης. Ο κάθε πληθυσμός παρουσιάζεται με το ίδιο χρώμα όπως στα δυο παραπάνω φυλογενετικά δέντρα.

Τέλος με την Μπεϊεσιανή προσέγγιση από το πρόγραμμα Structure (version 2, Pritchard *et al.*, 2000) έγινε προσπάθεια κατάταξης των ατόμων σε παμμικτικές ομάδες. Η ανάλυση εφαρμόστηκε σε όλους τους πληθυσμούς με εξαίρεση τον πληθυσμό της Πρέβελης (PRE) που δημιουργούσε πολλά προβλήματα στις ομαδοποιήσεις (σύνολο 16 πληθυσμοί). Για να βρούμε τον πιθανό αριθμό των ομάδων ( $K$ ), τρέξαμε τα δεδομένα μας για  $K$  από 1 έως 18. Για κάθε  $K$  έγιναν 3 ανεξάρτητες αλυσίδες-επαναλήψεις. Η αρχική περίοδος ανάλυσης (burn-in period: τα αποτελέσματα της αρχικής αυτής περιόδου, που εφαρμόζεται για τη σταθεροποίηση των παραμέτρων, αγνοούνται) ήταν 50.000 επαναλήψεις. Η περίοδος ανάλυσης κατά την οποία γινόταν συλλογή αποτελεσμάτων ήταν  $10^5$  επαναλήψεις. Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο των μεικτών ομάδων (admixture model) που επιτρέπει στα άτομα να προέρχονται από περισσότερες της μιας ομάδες. Για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται ο λογάριθμος ( $L_n$ ) των εκ των υστέρων πιθανοτήτων των δεδομένων μας υπό τις εναλλακτικές τιμές του  $K$ . Έγιναν δυο ανεξάρτητοι έλεγχοι. Στον πρώτο έλεγχο το πρόγραμμα, έχοντας ως δεδομένο μόνο τη γενετική πληροφορία, εκτιμά τον κατάλληλο αριθμό ομάδων ( $K$ ) που κρίνονται απαραίτητες έτσι ώστε να μπορούν να ερμηνευτούν οι παρατηρούμενοι γονότυποι. Στη συνέχεια, με την εισαγωγή πληροφοριών, όπως η γεωγραφική προέλευση, γίνεται έλεγχος κατά πόσο οι γενετικά καθορισμένοι πληθυσμοί συμφωνούν με τους γεωγραφικά προκαθορισμένους πληθυσμούς.

Κατά τον πρώτο λοιπόν έλεγχο προέκυψε ότι οι ομάδες πληθυσμών που ικανοποιούν τις προϋποθέσεις του μοντέλου (ισορροπία HW μέσα στις ομάδες και ισορροπία σύνδεσης μεταξύ των μικροδορυφορικών τόπων) είναι  $K=5$  ( $L_n = -3976,6$ ). Στον **πίνακα 3.16** φαίνονται οι τιμές ένταξης (assignment scores) κάθε πληθυσμού στις πέντε διαφορετικές ομάδες (clusters).



**Πίνακας 3.16.** Τιμές ένταξης (assignment scores) του κάθε πληθυσμού στις πέντε ομάδες (clusters).

Πληθυσμός	Ομάδες πληθυσμών (clusters)				
	1	2	3	4	5
ALM	0,01	0,37	0,17	0,39	0,07
ANE	0,01	0,46	0,09	0,38	0,07
ANW	0,01	0,55	0,06	0,36	0,03
ATT	0,02	0,02	0,03	0,02	0,92
BRA	0,01	0,53	0,17	0,23	0,07
CYP	0,98	0,00	0,01	0,00	0,00
DOD	0,04	0,03	0,82	0,02	0,10
GAV	0,01	0,16	0,05	0,72	0,07
GEK	0,01	0,05	0,46	0,04	0,44
GER	0,01	0,69	0,06	0,21	0,03
JOR	0,98	0,00	0,01	0,00	0,00
KER	0,01	0,04	0,07	0,04	0,84
LES	0,01	0,06	0,13	0,10	0,72
PEL	0,01	0,03	0,21	0,01	0,74
POM	0,01	0,36	0,10	0,52	0,01
THR	0,01	0,51	0,13	0,27	0,08

Από τις τιμές ένταξης παρατηρούμε ότι οι ομάδες πληθυσμών που προκύπτουν είναι οι εξής πέντε:

1. Κύπρος -Ιορδανία
2. Κρήτη
3. Δωδεκάνησα
4. Κρήτη - Γαύδος
5. Ηπειρωτική Ελλάδα - Λέσβος.

Η Κύπρος και η Ιορδανία τοποθετούνται στην ίδια ομάδα με πολύ υψηλές τιμές ένταξης (0,98 και για τους δυο πληθυσμούς).

Οι πληθυσμοί της Κρήτης εντάσσονται στη δεύτερη και στην τέταρτη ομάδα, με εξαίρεση τον πληθυσμό της Γαύδου που εντάσσεται κυρίως στην τέταρτη ομάδα (τιμή ένταξης=0,72). Αξιοσημείωτη εξαίρεση, επίσης, αποτελεί ο πληθυσμός Γεωργιούπολης-Κουρνά (GEK) που εντάσσεται στην τρίτη και στην πέμπτη ομάδα.

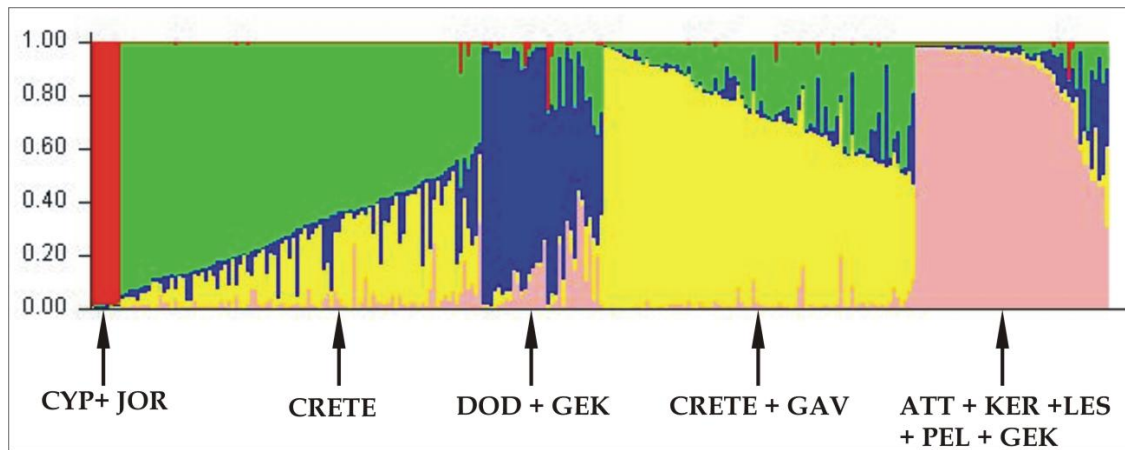
Στην τρίτη ομάδα εντάσσονται κατά κύριο λόγο τα Δωδεκάνησα αλλά και ένα ποσοστό των ατόμων του πληθυσμού Γεωργιούπολης και Κουρνά (GEK).



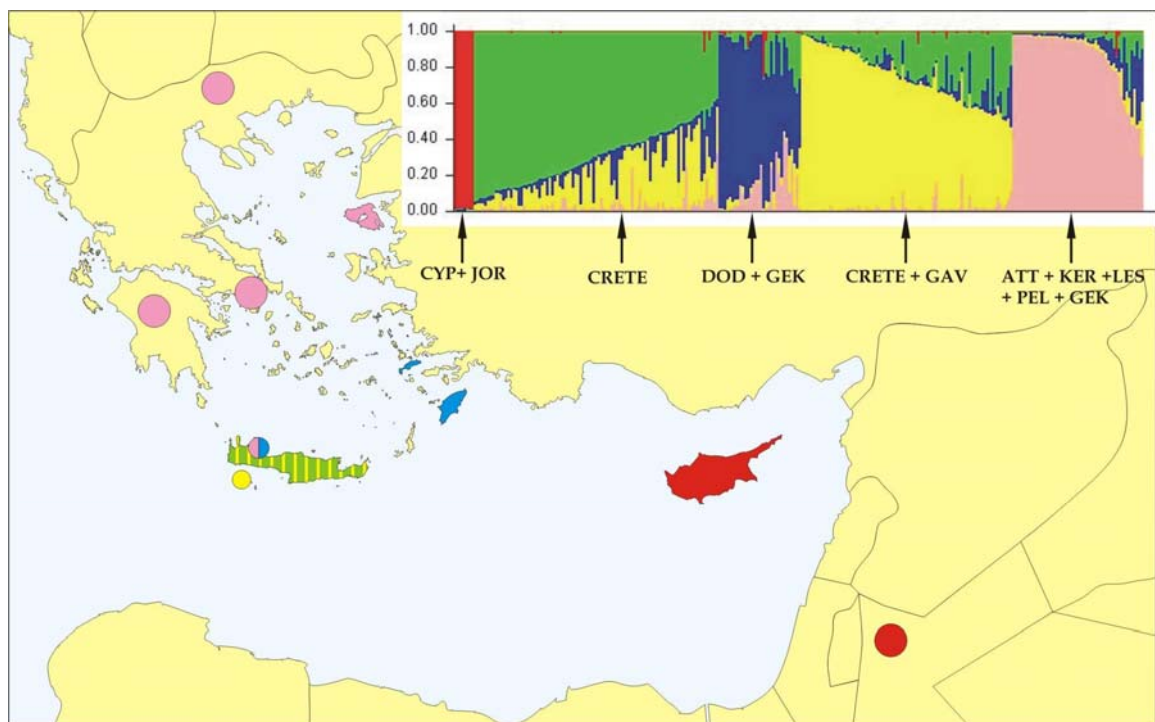
Τέλος στην πέμπτη ομάδα έχουμε όλους τους πληθυσμούς της Ηπειρωτικής Ελλάδας (Πελοπόννησος, Αττική, Κερκίνη), τον πληθυσμό της Λέσβου και ένα ποσοστό των ατόμων του πληθυσμού Γεωργιούπολης και Κουρνά (GEK). Σχηματικά μπορούμε να δούμε τα αποτελέσματα της Μπείσειανής ανάλυσης στο ραβδόγραμμα της **εικόνας 3.14**. Τα 5 διαφορετικά χρώματα αναπαριστούν τις 5 διαφορετικές ομάδες (clusters). Κάθε άτομο αντιπροσωπεύεται από μια κάθετη ράβδο, η οποία μπορεί να διαιρείται σε περαιτέρω χρωματικά τμήματα (μέχρι 5). Το μήκος τους απεικονίζει το ποσοστό κατάταξης του κάθε ατόμου σε κάθε ομάδα (cluster).

Στην **εικόνα 3.15** παρουσιάζεται το ίδιο ραβδόγραμμα σε συνδυασμό με το χάρτη περιοχών μελέτης. Οι αρχικοί πληθυσμοί είναι πλέον χρωματισμένοι σύμφωνα με τις ομαδοποιήσεις που προέκυψαν από την Μπείσειανή ανάλυση.

Στο δεύτερο έλεγχο με το πρόγραμμα Structure, ορίζουμε εκ των προτέρων ποιοι είναι οι πληθυσμοί μας (με βάση τη γεωγραφική προέλευση). Τρέξαμε λοιπόν την ίδια ανάλυση που περιγράφεται παραπάνω (50.000 επαναλήψεις για περίοδο burn-in, 3 ανεξάρτητες αλυσίδες,  $10^5$  επαναλήψεις η κάθε αλυσίδα) με τη διαφορά ότι υπήρχε μεροληψία στις ομαδοποιήσεις. Από τον έλεγχο αυτόν προέκυψαν 16 ομάδες ( $K=16$ ), όσες και οι αρχικοί μας πληθυσμοί ( $L_n = -3719,7$ ). Το ποσοστό ένταξης του κάθε πληθυσμού στην αντίστοιχη ομάδα ήταν πολύ υψηλό ( $>0,97$ ). Φαίνεται ότι η μεροληψία ήταν αρκετά ισχυρή ή τουλάχιστον πολύ πιο ισχυρή από οποιαδήποτε γενετική πληροφορία που θα μας έδινε κάποια εναλλακτική ομαδοποίηση. Αν θέλαμε να συγκρίνουμε την τιμή για  $K=16$  με την τιμή για  $K=5$  (που ήταν το αποτέλεσμα του ελέγχου χωρίς χρήση της πληροφορίας των προκαθορισμένων πληθυσμών), βλέπουμε ότι κατά τον έλεγχο με χρήση της πληθυσμιακής πληροφορίας η τιμή της εκ των υστέρων πιθανότητας των δεδομένων μας για  $K=5$  ήταν πολύ χαμηλότερη ( $L_n = -4085$ ) από ό,τι για  $K=16$  ( $L_n = -3719,7$ ).



**Εικόνα 3.14.** Ραβδόγραμμα αποτελεσμάτων της Μπεϊζιανής ανάλυσης για  $K=5$ , χωρίς χρήση της πληροφορίας των γεωγραφικά προκαθορισμένων πληθυσμών. Η ανάλυση έγινε με το μοντέλο των μεικτών πληθυσμών (admixture model) με χρήση του προγράμματος Structure (v. 2, Pritchard *et al.*, 2000). Κάθε κάθετη ράβδος αντιπροσωπεύει ένα άτομο και τα 5 διαφορετικά χρώματα αναπαριστούν τις 5 διαφορετικές ομάδες (clusters).



**Εικόνα 3.15.** Χάρτης περιοχών μελέτης. Ο κάθε πληθυσμός παρουσιάζεται με το ίδιο χρώμα όπως στο ραβδόγραμμα που προέκυψε από την Μπεϊζιανή ανάλυση.

## 3.2 Μελέτη του τεχνητού υγρότοπου-βιολογικού καθαρισμού της Πόμπιας

### 3.2.1 Ανάλυση μακροπανίδας

Στους πίνακες 3.17 και 3.18 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση δειγμάτων του βένθους στους τρεις σταθμούς δειγματοληψίας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται για κάθε δείγμα χωριστά, αλλά δίνονται και μέσες τιμές ανά περιοχή.

**Πίνακας 3.17.** Αφθονία των τάξεων στις τρεις περιοχές δειγματοληψίας.

ΤΑΞΑ	ΠΕΡΙΟΧΗ 0			ΠΕΡΙΟΧΗ 1		ΠΕΡΙΟΧΗ 2		
	0.1	0.2	0.3	1.1	1.2	2.1	2.2	2.3
<b>Phylum: NEMATODA</b>	18	0	3	0	0	1113	973	937
<b>Class CRUSTACEA</b>								
Subclass: Ostracoda	1	0	0	13	40	830	110	343
Subclass: Copepoda	0	1	0	0	0	1	0	0
Order: Cyclopoidae								
<b>Class: INSECTA; Order: Diptera</b>								
Psychodidae	5	3	3	0	0	0	0	0
Chironomidae;								
<i>Chironomus riparius</i>	7	13	2	21	14	108	3	27
Orthocladinae	19	19	11	4	5	27	3	3
Chironominae	12	48	12	6	16	6	0	30
ενήλικο Chironominae	0	0	1	0	0	0	0	0
Pupa Orthocladinae	0	0	0	0	0	1	0	0
Pupa Chironominae	1	0	0	0	2	2	0	0
Ceratopogonidae	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>Class: INSECTA; Order: Odonata</b>								
Zygoptera	0	0	0	0	1	1	0	0
Anisoptera	0	0	0	0	0	1	0	0
<b>Class: APTERYGOTA; Order: Collembola</b>								
Poduridae	1	0	1	0	0	0	0	7
Isotomidae	2	0	5	1	0	32	23	23

	ΠΕΡΙΟΧΗ 0			ΠΕΡΙΟΧΗ 1		ΠΕΡΙΟΧΗ 2		
Sminthuridae	0	0	0	0	0	1	0	0
<b>Phylum ANNELIDA; Class: OLIGOCHAETA</b>								
Tubificidae	1	2	0	0	0	2407	3300	1037
Naididae	0	0	0	0	0	1099	407	180
Echitridae	0	0	29	0	0	0	0	0
<b>Class: GASTROPODA; Order Pulmonata</b>								
Ancylidae	0	0	0	3	4	0	0	0
<b>Class: ARACHNIDA; Order: Acari</b>								
Hydracarina	0	0	0	0	0	13	0	0

**Πίνακας 3.18.** Συνολική αφθονία (N) σε κάθε δείγμα, μέσος όρος του N για κάθε περιοχή, δείκτης Shannon H και μέσος όρος του H για κάθε περιοχή.

Περιοχές	N	AVER(N)	H	AVER(H)
O.1	68		1,85	
O.2	86	73.66	1,20	1,57
O.3	67		1,67	
1.1	48		1,44	
1.2	82	65	1,43	1,43
2.1	5642		1,45	
2.2	4819	4349.33	0,91	1,24
2.3	2587		1,35	

Ο συνολικός αριθμός των τάξων στο ρυάκι (περιοχή 0), στην πρώτη (περιοχή 1) και στη δεύτερη (περιοχή 2) λεκάνη του βιολογικού καθαρισμού είναι 14, 8 και 16 αντίστοιχα. Για τις τιμές ποικιλότητας Shannon εφαρμόζουμε έναν έλεγχο τύπου *t test* (Poole, 1974) εξετάζοντας (ανά ζεύγη δειγμάτων) τη μηδενική υπόθεση της ομοιότητας των δεικτών. Ο έλεγχος εφαρμόστηκε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος PAST (v.1.4/2006; Ryan *et al.*, 1995). Για όλα τα ζεύγη δειγμάτων η μηδενική

υπόθεση απορρίφθηκε ( $p < 0,05$ ), οπότε η διαφορά μεταξύ των δεικτών ποικιλότητας είναι στατιστικώς σημαντική.

Το ρυάκι (περιοχή Ο) που χρησιμοποιείται ως “μάρτυρας” έχει τη μεγαλύτερη τιμή του δείκτη Shannon παρόλο που έχει μικρότερο αριθμό ειδών από την περιοχή 2.

### 3.2.2 Εκτίμηση μεγέθους του πληθυσμού

Για την εκτίμηση του μεγέθους του πληθυσμού του *M. rivulata* έγιναν τρεις δειγματοληψίες στον υγρότοπο της Πόμπιας. Ο αριθμός των ατόμων που συλλέχθηκαν συνολικά σε κάθε δειγματοληψία και ο αριθμός των ήδη σημαδεμένων ατόμων φαίνεται στον **πίνακα 3.19**.

**Πίνακας 3.19.** Ο αριθμός των ατόμων που συλλέχθηκαν συνολικά σε κάθε δειγματοληψία (Συλλήψεις) και ο αριθμός των ήδη σεσημασμένων ατόμων (Επανασυλλήψεις)

Δειγματοληψία	Συλλήψεις	Επανασυλλήψεις
1η	86	0
2η	5	1
3η	10	3

Σύμφωνα με τη μέθοδο Schnabel το εκτιμώμενο μέγεθος πληθυσμού είναι:

$\hat{N} = 333$  άτομα και τα 95% όρια εμπιστοσύνης μας δίνουν μια διακύμανση από 139 έως 974 άτομα.

Σύμφωνα με τη μέθοδο Schumacher το εκτιμώμενο μέγεθος πληθυσμού είναι:

$\hat{N} = 331$  άτομα και τα 95% όρια εμπιστοσύνης μας δίνουν μια διακύμανση από 112 έως 342 άτομα.

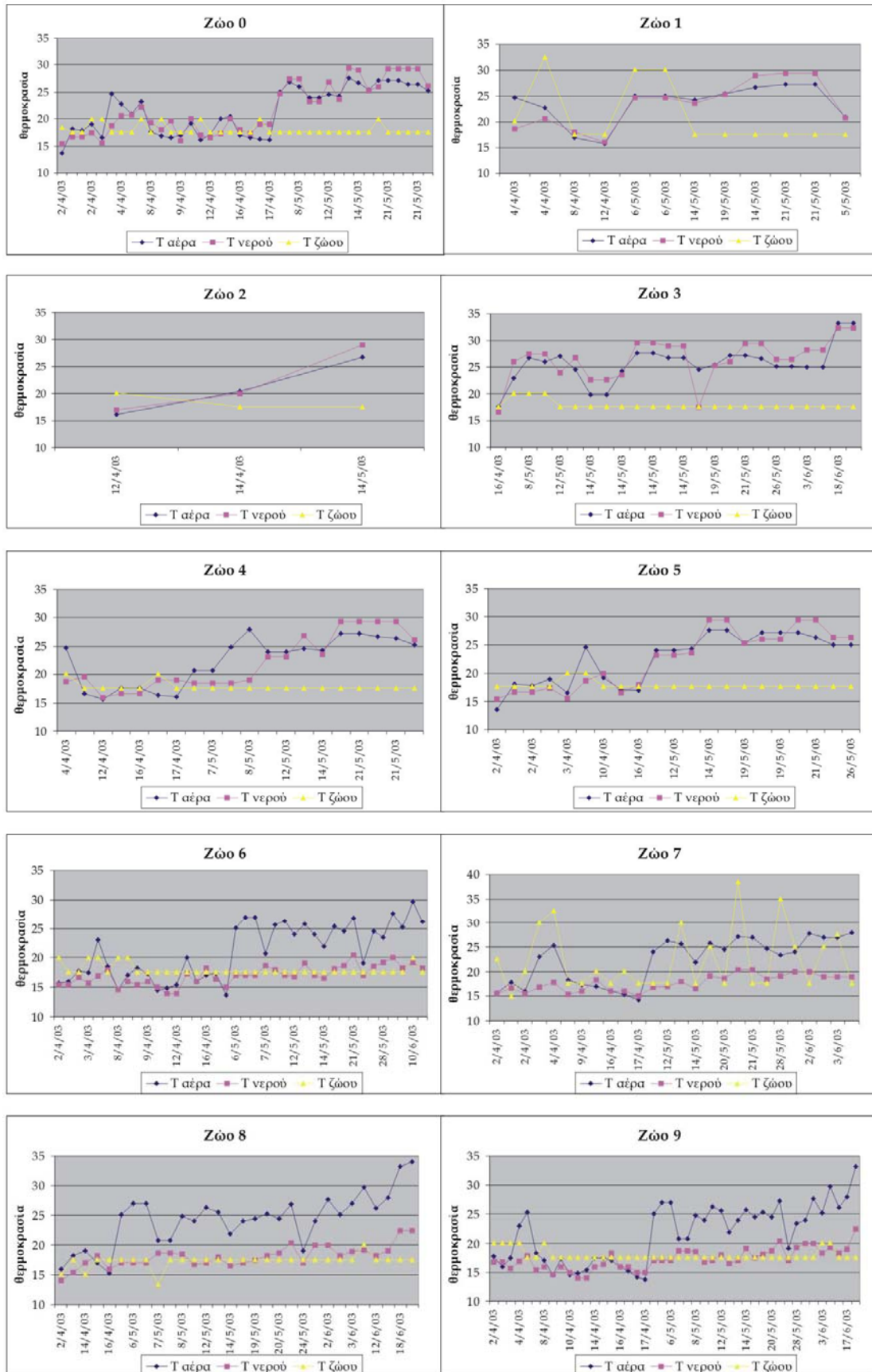
### 3.3 Μελέτη της δραστηριότητας της *M. rivulata* με χρήση ραδιοτηλεμετρίας

Η μελέτη της δραστηριότητας των χελωνών έγινε με 10 χελώνες (5 αρσενικές, 5 θηλυκές) από τον Αλμυρό ποταμό, που βρίσκεται περίπου 8 χιλιόμετρα δυτικά της πόλης του Ηρακλείου. Η καταγραφή στο πεδίο ξεκίνησε στις 2 Απρίλη 2003 και είχε διάρκεια 3 μήνες. Συνολικά έγιναν 39 επισκέψεις στον βιότοπο του Αλμυρού. Στις 39 επισκέψεις είχαμε 256 καταγραφές σημάτων. Ο συνολικός αριθμός των παρατηρήσεων για κάθε χελώνα ξεχωριστά παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα.

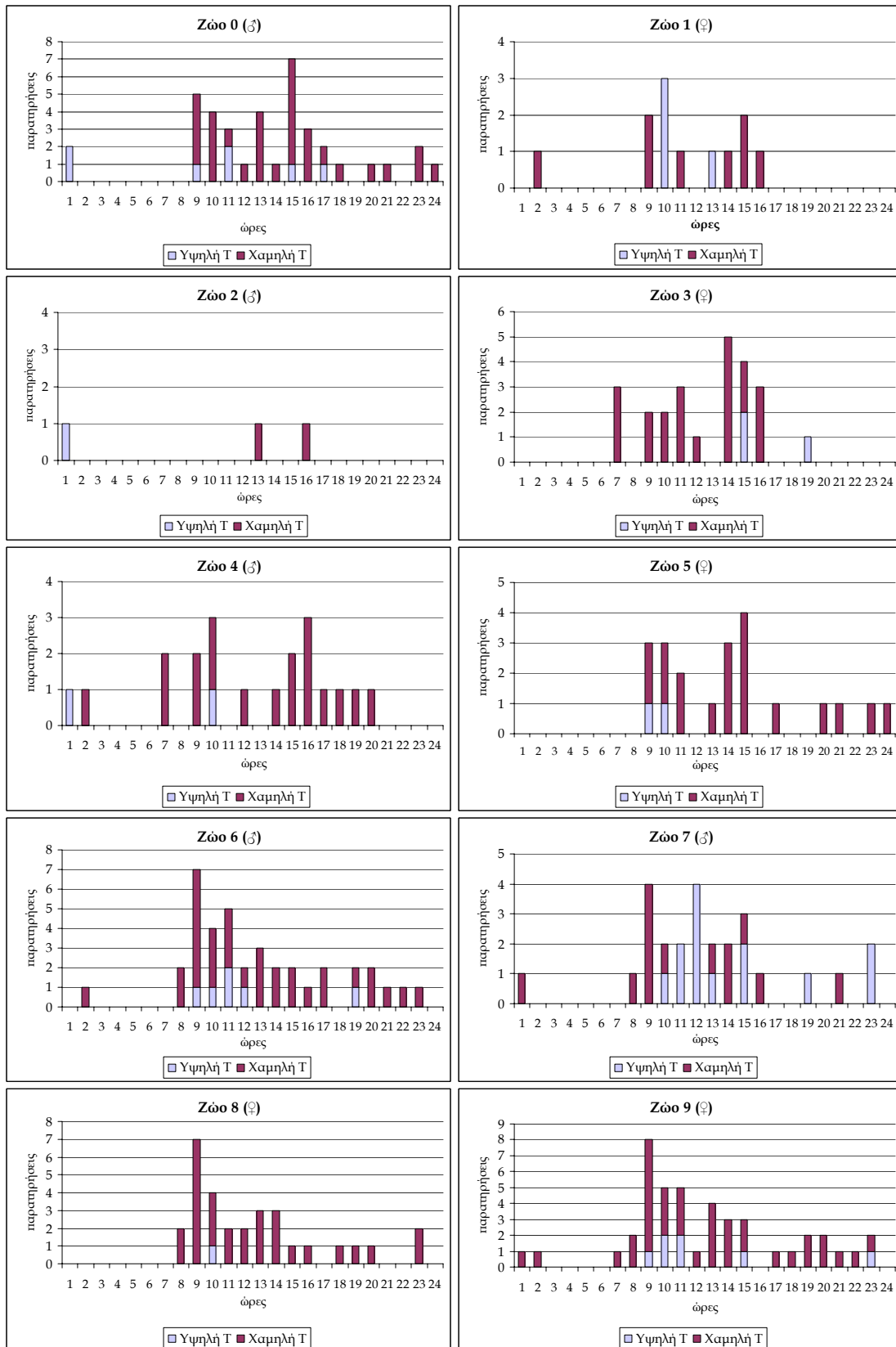
Πίνακας 3.20. Αριθμός παρατηρήσεων για κάθε μελετώμενο άτομο.

Ζώο	Παρατηρήσεις
0 (♂)	38
1 (♀)	12
2 (♂)	3
3 (♀)	24
4 (♂)	20
5 (♀)	21
6 (♂)	38
7 (♂)	26
8 (♀)	30
9 (♀)	44

Στην **εικόνα 3.16**, παρουσιάζεται η δραστηριότητα των χελωνών ανάλογα με τις θερμοκρασίες αέρα ( $T_{\text{αέρα}}$ ) και νερού ( $T_{\text{νερού}}$ ) την ίδια χρονική στιγμή. Ο αριθμός παλμών του κάθε πομπού έχει μετατραπεί σε θερμοκρασία σύμφωνα με την εξίσωση  $y=1,2x+5,9$  που περιγράφεται στην παράγραφο 2.5 στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι». Παρατηρούμε λοιπόν ότι, γενικά, κατά τον Απρίλιο τα ζώα περνούν μεγάλο διάστημα έξω από το νερό, ενώ όσο προχωράμε προς το καλοκαίρι τα ζώα περνούν περισσότερο χρόνο μέσα στο νερό.



Εικόνα 3.16. Δραστηριότητα του κάθε ατόμου όπως αυτή περιγράφεται από τη θερμοκρασία του σε σχέση με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος (νερού και αέρα).



Εικόνα 3.17. Δραστηριότητα του κάθε ατόμου σε σχέση με την ώρα της ημέρας. Χαμηλή θερμοκρασία= ίση ή χαμηλότερη από την  $T_{\text{νερού}}$  τη στιγμή της καταγραφής  
Υψηλή θερμοκρασία= υψηλότερη από την  $T_{\text{νερού}}$  τη στιγμή της καταγραφής



Στην **εικόνα 3.17** παρουσιάζεται η ημερήσια δραστηριότητα των ζώων καθ' όλο το εικοσιτετράωρο. Καταγράφεται αν το ζώο είχε χαμηλή θερμοκρασία (ίση ή χαμηλότερη από την  $T_{\text{νερού}}$  τη στιγμή της καταγραφής) ή υψηλή θερμοκρασία (υψηλότερη από την  $T_{\text{νερού}}$  τη στιγμή της καταγραφής. Οι χελώνες δραστηριοποιούνται από τις 07:00 - 08:00 το πρωί περίπου και σταματάνε γύρω στις 22:00 - 23:00 το βράδυ, με κορυφές δραστηριότητας από τις 10:00 έως τις 13:00 και μια μικρότερης έντασης από τις 19:00 έως τις 20:00.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 Φυλογενετικές σχέσεις και παλαιοντολογικά δεδομένα

Η περιοχή ελέγχου αντιγραφής του μιτοχονδρίου (D-loop) παρουσίασε μεγαλύτερη διαφοροποίηση από το κυτόχρωμα β (cyt *b*), όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο, αφού η D-loop είναι από τις πιο γρήγορα εξελισσόμενες περιοχές του μιτοχονδρίου. (Lamb *et al.*, 1994; McMillan & Palumbi, 1997; Laurent *et al.*, 1998; Avise, 2000). Με βάση το cyt *b* η διαειδική διαφοροποίηση κυμαίνεται από 2,4% (μεταξύ *M. rivulata* και *M. caspica*) έως 4,9% (μεταξύ *M. leprosa* και *M. caspica*), ενώ με βάση την D-loop από 6,3% (μεταξύ *M. rivulata* και *M. caspica*) έως 8,8% (μεταξύ *M. leprosa* και *M. rivulata*). Με βάση το cyt *b* τα συγγενικά είδη *Cuora serrata* και *C. mouhoti* που ανήκουν στην ίδια οικογένεια με το *Mauremys* (Geoemydidae) εμφανίζουν γενετική απόσταση 2,7% (Spinks *et al.*, 20004), ενώ στα είδη του γένους *Graptemys* (Emydidae) η γενετική απόσταση κυμαίνεται από 0% - 1,3% (Lamb *et al.*, 1994). Επίσης μεταξύ των πολύ συγγενικών γενών *Malaclemys* και *Graptemys*, η γενετική απόσταση κυμαίνεται από 1,5% - 3,1% (Lamb & Osentoski, 1997). Σύμφωνα με τους Lamb & Lydeard (1994) η γενετική απόσταση στα είδη του γένους *Gopherus* κυμαίνεται από 3,1%- 7,41%. Στα είδη του γένους *Clemmys* η γενετική απόσταση με βάση το cyt *b* κυμαίνεται από 5,7% έως 10,76% (Lenk *et al.*, 1999). Αντίστοιχα για την περιοχή ελέγχου (D-loop) η γενετική απόσταση μεταξύ των τεσσάρων αναγνωρισμένων υποειδών της *Chysemys picta* κυμαίνεται από 0,1% - 2,4% (Starkey *et al.*, 2003). Μεταξύ των κοντινών ειδών *Chelydra serpentina* και *Macrolemys temminckii* είναι 2,4% κατά τους Walker *et al.* (1998). Πολλές μελέτες με βάση την περιοχή ελέγχου δεν αναφέρουν γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ειδών (Bowen *et al.*, 1995; Schroth *et al.*, 1996; Laurent *et al.*, 1998; Roman *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2003) ή αναφέρουν γενετικές αποστάσεις από συνδυασμένα σύνολα δεδομένων παραδείγματος χάρι D-loop & cyt *b* (Lamb *et al.*, 1994) ή D-loop & 12S rRNA (Van der Kuyl *et al.*, 2005), οπότε δεν είναι εφικτή η σύγκριση με τα δικά μας αποτελέσματα. Ανάλογες μελέτες άλλων ζωικών ομάδων που έχουν πραγματοποιηθεί στην

αντίστοιχη γεωγραφική περιοχή (Αιγαίο ή ανατολική Μεσόγειο) χρησιμοποιούν το *cyt b* ως μοριακό σημαντή και έτσι μας επιτρέπεται η σύγκριση με μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής. Στους αγκαθοποντικούς του γένους *Acomys* και στα ποντίκια του γένους *Apodemus* οι γενετικές αποστάσεις με βάση το *cyt b* είναι της τάξης του 1,6% και <1% αντίστοιχα (Barome *et al.* 2001; Michaux *et al.* 2004). Όσον αφορά τις σαύρες του γένους *Podarcis* οι γενετικές αποστάσεις κυμαίνονται από 11,4% - 19% (Poulakakis *et al.*, 2005a) και στις σαύρες του γένους *Ablepharus*, η διαειδική διαφοροποίηση είναι της τάξης του 11%-19% (Poulakakis *et al.*, 2005b). Οι αποστάσεις που παρουσιάζουν τα μεσογειακά είδη του γένους *Mauremys* είναι μεγαλύτερες σε σχέση με τις αποστάσεις των ποντικών και αγκαθοποντικών αλλά είναι σαφώς μικρότερες από αντίστοιχες γενετικές αποστάσεις των σαυρών στην περιοχή της Μεσογείου. Το ότι οι χελώνες του γένους *Mauremys* παρουσιάζουν πολύ μικρότερες γενετικές αποστάσεις απ' ό,τι άλλα ερπετά στην ίδια περιοχή δεν πρέπει να μας προκαλεί έκπληξη αφού έρχεται σε συμφωνία με μελέτες που έχουν δείξει ότι ο εξελικτικός ρυθμός του mtDNA στα Χελώνια είναι σαφώς χαμηλότερος σε σχέση με άλλες ομάδες Σπονδυλωτών (Avisé *et al.*, 1992; Lamb *et al.*, 1994; Lenk *et al.*, 1999). Οι παράγοντες που έχουν κατά καιρούς προταθεί ως υπεύθυνοι για το χαμηλό εξελικτικό ρυθμό είναι οι εξής:

1) Οι χελώνες μπορεί να έχουν πολύ πιο αποτελεσματικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του mtDNA, με αποτέλεσμα μικρότερο ρυθμό εξέλιξης (Avisé *et al.*, 1992). Η ίδια υπόθεση έχει προταθεί και για τον αργότερο ρυθμό εξέλιξης των αλληλουχιών του mtDNA στα φυτά σε σχέση με ζωικές ομάδες (Palmer & Herbon 1988).

2) Ένας δεύτερος παράγοντας που έχει συσχετιστεί με τους εξελικτικούς ρυθμούς είναι ο χρόνος γενεάς και η ηλικία αναπαραγωγής (Avisé *et al.*, 1992). Οι χελώνες έχουν γενικά μεγάλο χρόνο γενεάς και η πρώτη αναπαραγωγή γίνεται πολύ αργότερα απ' ό,τι στα περισσότερα Σπονδυλωτά. Η ηλικία αναπαραγωγής σε πολλά είδη θαλάσσιων χελωνών φτάνει τα 20 - 30 χρόνια (Zug *et al.* 1986). Για το *Mauremys* εκτιμάται ότι ο μέγιστος χρόνος

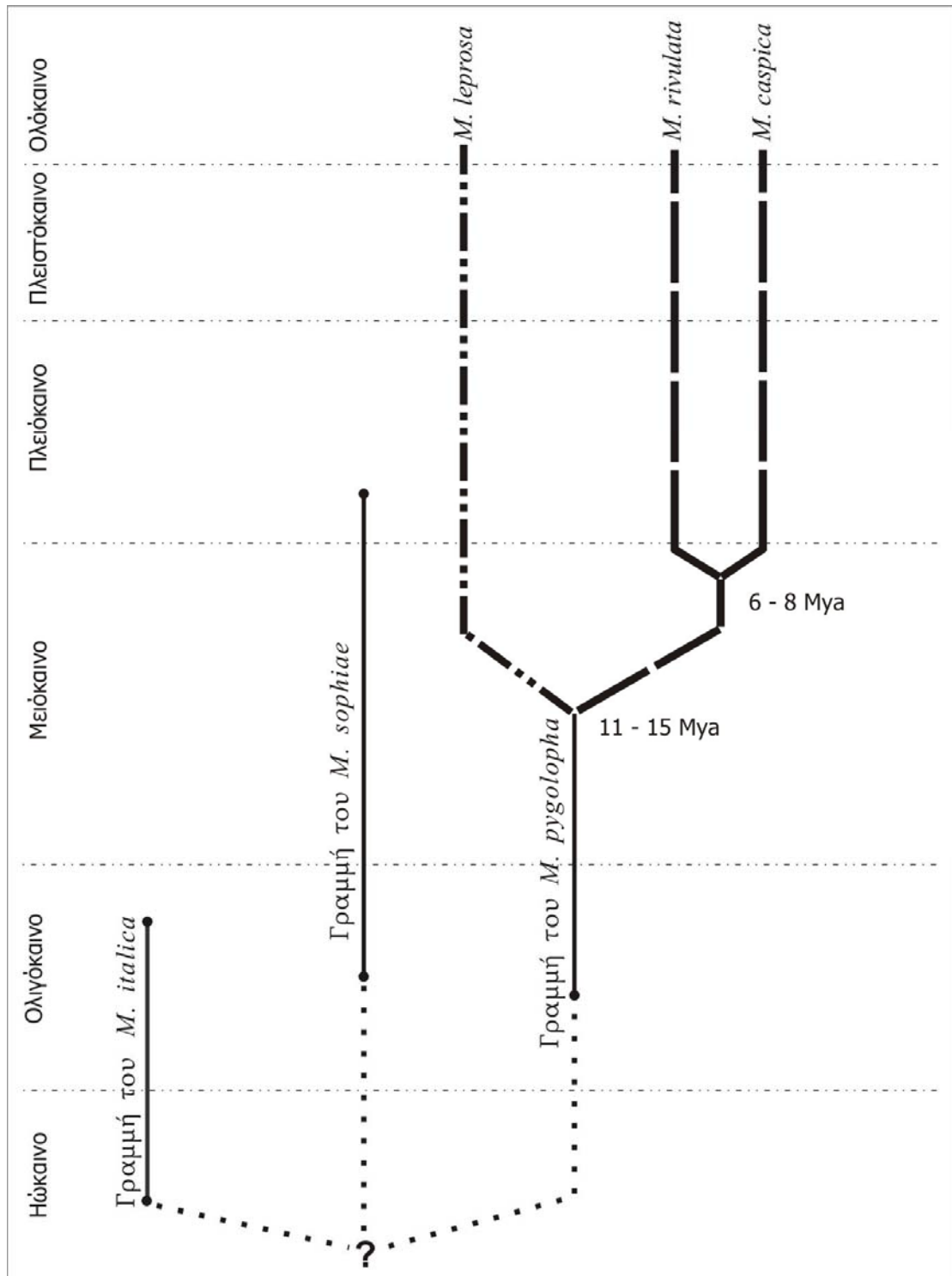
ζωής μπορεί να φτάσει τα 30 χρόνια (Meek, 1987) και η ηλικία αναπαραγωγής περίπου τα 4 - 6 χρόνια (Sidis & Gasith, 1988).

3) Οι χελώνες χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλό μεταβολικό ρυθμό (Avisé *et al.*, 1992). Οι Martin & Palumbi (1993) έδειξαν ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του μεταβολικού ρυθμού των Σπονδυλωτών και του ρυθμού υποκατάστασης τόσο στο πυρηνικό όσο και στο μιτοχονδριακό DNA. Τα αποτελέσματα έρχονται ίσως ως απόρροια της συσχέτισης μεταξύ της εκμετάλλευσης των επιπέδων του οξυγόνου και της συχνότητας της καταστροφής του DNA από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Martin & Palumbi, 1993).

Ο αργός ρυθμός εξέλιξης στις χελώνες δεν είναι χαρακτηριστικός μόνο για το μιτοχονδριακό DNA. Χρωμοσωματικοί χαρακτήρες (Bickham, 1981), αλλοένζυμα (Bickham, 1984) αλλά ακόμα και μορφολογικοί χαρακτήρες (Bonhomme *et al.*, 1987) είναι πολύ συντηρητικοί στα Χελώνια. Όμως, οι εξελικτικές δυνάμεις και οι μοριακοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την εξέλιξη τόσο διαφορετικών χαρακτηριστικών, όπως το mtDNA, οι καρύοτυποι, και η μορφολογία, είναι σχεδόν σίγουρο ότι διαφέρουν και δρουν ανεξάρτητα (Avisé *et al.*, 1992).

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας των Hillis & Huelsenbeck (1992) για τις αλληλουχίες του *cyt b*, της D-loop, αλλά και το συνδυασμένο σύνολο δεδομένων, δείχνουν ότι τα δεδομένα της παρούσας μελέτης θεωρητικά εμπεριέχουν αρκετή φυλογενετική πληροφορία για να μας αποκαλύψουν το φυλογενετικό σενάριο που κρύβεται πίσω από τα υπό μελέτη είδη του γένους *Mauremys* στο χώρο της Μεσογείου. Οι διάφορες φυλογενετικές αναλύσεις (NJ, MP, ML και BI) συγκλίνουν σε μία συγκεκριμένη τοπολογία του γονιδιακού δέντρου των 3 μεσογειακών ειδών του γένους. Βάσει των ειδών που χρησιμοποιήθηκαν ως εξωομάδες (*G. spengleri*, *T. marginata*) και ανεξάρτητα από το είδος της φυλογενετικής ανάλυσης και το σύνολο των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε, τα τρία μεσογειακά είδη του γένους *Mauremys* αποτελούν ένα μονοφυλετικό κλάδο. Όπως προέκυψε από τις φυλογενετικές αναλύσεις με βάση τα δυο μιτοχονδριακά γονίδια το *M.*

*rivulata* αποτελεί έναν καλά διαχωρισμένο μονοφυλετικό κλάδο με υψηλή στατιστική υποστήριξη (NJ: 100%, MP: 98%, ML/BI: 93%). Το ίδιο ισχύει και για τα άλλα δυο μεσογειακά είδη του γένους. Τα δεδομένα μας έρχονται σε συμφωνία με τις πρόσφατες μελέτες για το γένος *Mauremys* και την οικογένεια Geomydidae (Barth *et al.*, 2004; Feldman & Parham, 2004; Spinks *et al.*, 2004). Το *M. leprosa* αποκλίνει πρώτο μέσα στο μονοφυλετικό κλάδο. Λαμβάνοντας υπόψη τις τρεις παράλληλες εξελικτικές γραμμές που υπήρξαν κατά τον Bergounioux (1955) (βλέπε στο κεφάλαιο της Εισαγωγής παράγραφο 1.5) και το ότι τα απολιθώματα που είναι πιο συγγενικά με τα σύγχρονα μεσογειακά είδη του γένους *Mauremys* ανήκουν στην τρίτη εξελικτική γραμμή (Melentis, 1966; Kotsakis, 1980), μπορούμε να αναπαραστήσουμε την εξέλιξη των σύγχρονων ειδών της δυτικής Παλαιαρκτικής όπως στο διάγραμμα της **εικόνας 4.1**. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης με τα παλαιοντολογικά δεδομένα μας επιτρέπει την υποστήριξη μιας υπόθεσης για τις φυλογενετικές σχέσεις των τριών μεσογειακών ειδών του γένους. Ο κοινός πρόγονος των τριών ειδών τοποθετείται στη γενεαλογική γραμμή του *M. pygolopha*. Ο πρώτος κλάδος που αποχωρίστηκε από αυτόν τον κοινό πρόγονο είναι αυτός που οδήγησε στο σύγχρονο *M. leprosa* με τον ενδιάμεσο πρόγονο του *M. gaudri* (Broin, 1977; Kotsakis, 1980). Αν εφαρμόσουμε τον εξελικτικό ρυθμό για το κυτόχρωμα  $\beta$  (0,3-0,4% ανά εκ. χρ.), που έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί σε πολλά Χελώνια, συμπεριλαμβανομένου και του γένους *Mauremys* (Avisé *et al.* 1992; Caccone *et al.* 1999; Lenk *et al.* 1999; Mantziou *et al.*, 2004; Barth *et al.*, 2004), φαίνεται ότι το *M. leprosa* διασπάστηκε πρώτο από την κοινή εξελικτική γραμμή κατά το Μέσο Μειόκαινο (11-15 εκ. χρ. πριν από σήμερα) και στη συνέχεια στο Ανώτερο Μειόκαινο (6-8 εκ. χρ. πριν) έγινε η διάσπαση του *M. caspica* από το *M. rivulata*. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τον ισχυρισμό των Busack & Ernst (1980) ότι η απομόνωσή του *M. leprosa* ξεκίνησε κατά το Πλειόκαινο. Σύμφωνα με τους Lapparent de Broin & Van Dijk (1999), με βάση παλαιοντολογικά δεδομένα, ο διαχωρισμός αυτός έγινε τουλάχιστον στο Πλειόκαινο, αλλά πιθανότερα νωρίτερα.



**Εικόνα 4.1.** Τρεις γενεαλογικές γραμμές στη δυτική Παλαιαρκτική για τις χελώνες του γένους *Mauremys* και υπόθεση για τις φυλογενετικές σχέσεις των τριών σύγχρονων μεσογειακών ειδών, βασισμένη σε παλαιοντολογικά δεδομένα και αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Οι χρόνοι απόκλισης υπολογίστηκαν με βάση τις γενετικές αποστάσεις των αλληλουχιών του *cyt b* εφαρμόζοντας έναν εξελικτικό ρυθμό 0,3% - 0,4% ανά εκατομμύρια χρόνια.

Τα αποτελέσματά μας έρχονται σε συμφωνία με την υπόθεση των Feldman & Parham (2004), πως η απόκλιση μεταξύ των σύγχρονων *Mauremys* (συμπεριλαμβάνοντας τόσο τα μεσογειακά όσο και τα είδη της ανατολικής Ασίας) έλαβε χώρα πριν από την ανύψωση του οροπεδίου του Θιβέτ (50 -10 εκ. χρ. πριν από σήμερα). Η χρονολόγηση με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι αρκετά κοντά με τη μελέτη των Barth *et al.* (2004) οι οποίοι ισχυρίζονται ότι ο διαχωρισμός του *M. leprosa* από τον κοινό πρόγονο χρονολογείται στο Κατώτερο Μειόκαινο. Η χρονολόγηση αυτή συμφωνεί και με την ηλικία του παλιότερου γνωστού απολιθώματος *Mauremys* από τη Δυτική Παλαιαρκτική (Lapparent de Broin & Van Dijk, 1999; Lapparent de Broin, 2001).

Κατά το Μέσο-Ανώτερο Μειόκαινο το κλίμα έγινε πολύ πιο ξηρό και λίγο πιο κρύο και αυτό οδήγησε στην εξαφάνιση πολλών υδρόβιων χελωνών αρχικά από τη δυτική Ευρώπη και αργότερα και από την ανατολική (Lapparent de Broin, 2001). Επέστρεψαν σύντομα στη νότια Ευρώπη κατά το Κατώτερο- Μέσο Πλειόκαινο. Το Ανώτερο Μειόκαινο - Πλειόκαινο είναι η εποχή της εγκαθίδρυσης των σύγχρονων ευρωπαϊκών *Mauremys*. Όλη αυτή η εξέλιξη συνέβη κυρίως στην περιοχή της ανατολικής Μεσογείου. Κατά το ανώτερο Μειόκαινο έλαβαν χώρα ευρωπαϊκές μεταναστεύσεις από την ανατολική Μεσόγειο προς την Αφρική (Gasperetti *et al.*, 1993; Lapparent de Broin, 2001). Το *Mauremys* φαίνεται ότι αποσύρθηκε από τη Γαλλία και την Ιβηρική Χερσόνησο (και πιθανώς και από την Ιταλία και κάποιες ανατολικές χώρες) κατά την ψυχρή περίοδο στα τέλη του Πλειοκαίνου. Η ύπαρξη του *M. leprosa*, που ξεκίνησε και εξελίχθηκε στη Βόρεια Αφρική προερχόμενη από μια μορφή της ανατολικής Μεσογείου, επιβεβαιώνεται για πρώτη φορά κατά το Πλειόκαινο στην Αλγερία και έφτασε στην Ιβηρική χερσόνησο κατά το τέλος του Πλειοκαίνου έως τα μέσα του Πλειστοκαίνου (Lapparent de Broin, 2001). Στη γένεση του *M. leprosa* στην Αφρική συμφωνούν και πρόσφατες εργασίες στηριζόμενες σε μοριακούς δείκτες (Fritz *et al.*, 2005; Fritz *et al.*, 2006).

## 4.2 Ενδοειδικές σχέσεις

### 4.2.1 Μιτοχονδριακό DNA

Η ενδοειδική διαφοροποίηση που παρατηρείται με βάση το μιτοχονδριακό DNA είναι πολύ μικρή. Για το κυτόχρωμα β από την ανάλυση 73 αλληλουχιών προέκυψαν 13 διαφορετικοί απλότυποι. Από αυτούς 5 απλότυποι έχουν ευρεία κατανομή και σχετικά μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης. Οι πιο σπάνιοι απλότυποι που είτε έχουν περιορισμένη κατανομή ή πολύ μικρή συχνότητα εμφάνισης (όπως για παράδειγμα οι c2, c5, c10 και c11, **πίνακας 3.1**) διαφέρουν μόνο κατά μια βάση από άλλους πιο κοινούς απλότυπους. Στις περισσότερες περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκαν 2 ή και περισσότερα άτομα από μια περιοχή, τα άτομα εμφανίζουν τον ίδιο απλότυπο. Εξαιρέση αποτελούν: α) τα άτομα από την Κρύα Βρύση Κισσάμου (VRY), τον Άραξο Πελοποννήσου (PAX) και τη Χίο (CHI) που εμφανίζουν δυο διαφορετικούς κοινούς απλότυπους και β) τα άτομα από την Πλακιώτισσα (PLA), τη Γεωργιούπολη (GEO), το Σκινιά (SKI), το Θραψανό (THR), την Πόμπια (POM), τη Λέσβο (LES), το Άργος (PAG), και τη Νέα Μάκρη (MAK) που εμφανίζουν έναν πολύ κοινό απλότυπο και έναν πιο σπάνιο. Όσον αφορά τα άτομα της Κρήτης, όπου εστιάζεται το μεγαλύτερο μέρος των δειγματοληψιών, βλέπουμε ότι στο μεγαλύτερο μέρος τους εμφανίζουν απλότυπους με ευρεία κατανομή (c1, c3, c7) και μόνο τρεις απλότυποι είναι μοναδικοί για το νησί (c2, c5, c10) και αυτοί με πολύ μικρή συχνότητα. Τα 5 από τα 6 άτομα της Ιορδανίας εμφανίζουν έναν απλότυπο που είναι μοναδικός για την Ιορδανία. Το έκτο άτομο εμφανίζει τον απλότυπο με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης (c3). Στον c3 εντάσσεται επίσης και η αλληλουχία AJ564455 από τη Σμύρνη (Τουρκία), η οποία ανακτήθηκε από τη βάση γενετικών δεδομένων GenBank.

Όσον αφορά την περιοχή ελέγχου (D-loop) από την ανάλυση 73 αλληλουχιών προέκυψαν 18 διαφορετικοί απλότυποι. Εννέα από τους 18 απλότυπους εμφανίζονται μόνο μια φορά (σε ένα μόνο άτομο) και από αυτούς οι 7 διαφέρουν από άλλους πιο κοινούς απλότυπους μόνο κατά ένα νουκλεοτίδιο. Ο απλότυπος με τη μεγαλύτερη συχνότητα είναι ο D2 και έχει



ευρεία κατανομή που περιλαμβάνει την Κρήτη, τα περισσότερα νησιά του Αιγαίου και την ηπειρωτική Ελλάδα. Τέσσερις απλότυποι είναι μοναδικοί στην Κρήτη αλλά με πολύ μικρή συχνότητα εμφάνισης (1 -2 άτομα ανά απλότυπο). Η Ιορδανία και η Κύπρος δεν μοιράζονται τους απλότυπους τους με καμία άλλη περιοχή. Έτσι η Ιορδανία παρουσιάζει τους μοναδικούς απλότυπους D8, D9, D12 ενώ η Κύπρος τον απλότυπο D11. Η Κύπρος και η Ιορδανία μοιράζονται ωστόσο τον απλότυπο D10 (πίνακας 3.3, εικόνα 3.3). Το φαινόμενο λίγων πολύ κοινών απλοτύπων και αρκετών απλοτύπων που διαφέρουν μόνο κατά ένα μεταλλακτικό βήμα από τους πιο κοινούς, είναι συνηθισμένο στις ενδοειδικές μελέτες χελωνών (Kuy1 *et al.*, 2005; Fritz *et al.*, 2006).

Στην περίπτωση του *M. rivulata*, που αποτελεί τον κύριο οργανισμό μελέτης της παρούσας διατριβής, η ενδοειδική γενετική διαφοροποίηση κυμαίνεται από 0,1% έως 1,4% για τις αλληλουχίες του *cyt b* και 0,1% - 1,5% για την περιοχή ελέγχου. Παρόλο που έχουμε πάρα πολύ λίγα δείγματα στη διάθεσή μας για τα είδη *M. leprosa* και *M. caspica*, οι γενετικές αποστάσεις που παρουσιάζουν είναι συγκρίσιμες ή μεγαλύτερες από αυτές του *M. rivulata*. Έτσι για τις αλληλουχίες του *cyt b* η ενδοειδική γενετική διαφοροποίηση για το *M. caspica* είναι 1,2%, ενώ για το *M. leprosa* κυμαίνεται από 0,2% έως 2,1%. Για την περιοχή ελέγχου οι αντίστοιχες τιμές είναι 2,1% για το *M. caspica* και από 0,4%-2,8% για το *M. leprosa*.

Συγκρίνοντας με άλλες μελέτες βλέπουμε ότι η μικρή ενδοειδική γενετική διαφοροποίηση είναι πολύ συχνό φαινόμενο σε πολλά είδη χελωνών. Με βάση το *cyt b* η γενετική διαφοροποίηση στο είδος *Mauremys leprosa* κυμαίνεται από 0,1% έως 2,2% (Fritz *et al.*, 2006), στο είδος *M. mutica* 0,5% και στο είδος *M. caspica* 1,1% (Barth *et al.*, 2004). Στο είδος *Emys orbicularis* κυμαίνεται από 0,1% έως 1,7% (Lenk *et al.*, 1999), στο είδος *Caretta caretta* από 0,01% έως 1,2% (Laurent *et al.*, 1998), ενώ τέλος η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ 5 αναγνωρισμένων υποειδών του είδους *Malaclemys terrapin* κυμαίνεται από 0% έως 0,4% (Lamb & Osentoski, 1997). Και για την περιοχή ελέγχου, όμως, οι αποστάσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία

είναι ανάλογες με τις αποστάσεις της παρούσας μελέτης. Με βάση λοιπόν αλληλουχίες της D-loop οι γενετικές αποστάσεις στο είδος *Hydromedusa maximiliani* κυμαίνονται από 0,2% έως 3,2% (Souza *et al.*, 2003), στο είδος *Caretta caretta* είναι 4,61% (Laurent *et al.*, 1998), στο *Macrolemys temminckii* από 0,2% έως 3,4% (Roman *et al.*, 1999), στο *Chelydra serpentina* η μέγιστη γενετική απόσταση φτάνει το 0,5% (Walker *et al.*, 1998), ενώ τέλος μεταξύ των τεσσάρων αναγνωρισμένων υποειδών του *Chysemys picta* κυμαίνεται από 0,1% έως 2,4% (Starkey *et al.*, 2003).

Το φαινόμενο της αργής εξέλιξης των αλληλουχιών του mtDNA στις χελώνες γίνεται ακόμη πιο έντονα εμφανές όταν εξετάζουμε τις ενδοειδικές σχέσεις. Αν συγκρίνουμε τα αποτελέσματά μας με παρόμοιες μελέτες σε άλλα ερπετά από την περιοχή της ανατολικής Μεσογείου, παρατηρούμε ότι οι γενετικές αποστάσεις στο γένος *Mauremys* είναι πολύ μικρότερες. Για παράδειγμα με βάση αλληλουχίες του *cyt b* η μέση γενετική απόσταση στο είδος *Podarcis erhardii* είναι 10,5% (Πουλακάκης, 2005), στο είδος *P. taurica* 7,2% (Πουλακάκης, 2005), ενώ στο είδος *Ablepharus kitaibelii* κυμαίνεται από 0% έως 18% (Poulakakis *et al.*, 2005).

Οι μεγαλύτερες αποστάσεις σε απλότυπους του *M. rivulata* (1,4% για το *cyt b* και 1,5% για την D-loop) εμφανίζονται μεταξύ απλοτύπων της Ιορδανίας και της ηπειρωτικής ή νησιωτικής Ελλάδας. Αν και γενικά δεν μπορούμε να πούμε ότι έχουμε σαφώς γεωγραφικά δομημένους απλότυπους, η δοκιμασία του Mantel έδειξε ότι υπάρχει συσχέτιση της γενετικής απόστασης με τη γεωγραφική απόσταση των μελετώμενων ατόμων.

Το μιτοχονδριακό DNA δεν είναι σε θέση να μας δώσει ένα ξεκάθαρο φυλογεωγραφικό πρότυπο μέσα στο είδος *M. rivulata*. Υπάρχει μια ασάφεια στις σχέσεις των ατόμων και τα δέντρα έχουν τη μορφή «χτένας». Οι πολυτομίες αυτές οφείλονται σε αδυναμία επίλυσης των σχέσεων στο συγκεκριμένο κόμβο του δέντρου, λόγω χαμηλής διακριτικής ικανότητας περί των δεδομένων. Οι διαφοροποιήσεις που εμφανίζονται είναι παρά πολύ μικρές και πολλοί απλότυποι διαφέρουν μεταξύ τους μόνο κατά ένα νουκλεοτίδιο. Η κατάσταση αυτή είναι ενδεικτική του μικρού διαστήματος

που έχει μεσολαβήσει από την απομόνωση των πληθυσμών αυτών (Avise, 2000). Το *M. rivulata* πιθανώς ανήκει στην κατηγορία των ειδών [όπως περιγράφεται από τον Avise (2000)] που αποτελούνται από πολλούς τοπικούς πληθυσμούς που χαρακτηρίζονται από υψηλούς ρυθμούς εξαφάνισης και επανεποίκισης. Η απομόνωση λοιπόν είναι μικρής διάρκειας και όλοι οι πληθυσμοί συνδέονται ιστορικά έστω κι αν η γονιδιακή ροή στις περισσότερες γενεές είναι πολύ χαμηλή έως ανύπαρκτη. Οι εξαφανίσεις και επανεποίκιση παρεμποδίζουν τη γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών λόγω τυχαίας γενετικής παρέκκλισης. Συνήθως οι γενεαλογικές σχέσεις μεταξύ γεωγραφικά καθορισμένων πληθυσμών καθορίζονται από ένα μείγμα παραγόντων που περιλαμβάνουν ιστορικές συνδέσεις αλλά και σύγχρονη γονιδιακή ροή (Avise, 2000).

Το γενικό φυλογεωγραφικό πρότυπο που προκύπτει για το είδος *M. rivulata*, φαίνεται να αντιστοιχεί στην κατηγορία V των προτύπων που αναφέρει ο Avise (2000). Αυτό το πρότυπο χαρακτηρίζεται από κοινούς απλότυπους που έχουν ευρεία κατανομή και από κοντινούς σε αυτούς απλότυπους που είναι ενδημικοί σε μια περιοχή. Το πρότυπο αυτό υποδηλώνει χαμηλή έως μέτρια σύγχρονη γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών, οι οποίοι όμως ιστορικά είναι πολύ στενά συνδεδεμένοι. Οι κοινοί απλότυποι συνήθως είναι οι προγονικοί. Η ερμηνεία του προτύπου αυτού είναι πολύ συχνά προβληματική αφού δεν είναι εύκολη η διάκριση των αμφισβητούμενων σχέσεων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου έχουμε σπάνιους απλότυπους οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους, ή από έναν πιο κοινό, μόνο κατά ένα νουκλεοτίδιο (Avise, 2000). Αυτή ακριβώς η αδυναμία επίλυσης των ενδοειδικών σχέσεων αποτυπώνεται στο δίκτυο των απλοτύπων του *cyt b* του *M. rivulata* (εικόνα 3.8) όπου έχουμε πολλαπλές εναλλακτικές συνδέσεις μεταξύ απλοτύπων. Το πρότυπο της κατηγορίας V ή παραλλαγές αυτού (κατηγορία IV) έχει παρατηρηθεί ξανά σε χελώνες του γλυκού νερού (Walker *et al.*, 1998; Avise, 2000). Το πρότυπο αυτό καταγράφεται και από τους Fritz *et al* (2006) για το *M. leprosa* (στον κλάδο A, που κατανέμεται ευρέως βόρεια της οροσειράς του Άτλαντα).

Οι πληθυσμοί εξετάζοντας τους σε μια δεδομένη χρονική στιγμή είναι γεωγραφικά δομημένοι, αφού η συνήθης απόσταση διασποράς κάθε ατόμου είναι πολύ μικρότερη από τη γεωγραφική κατανομή του είδους. Απλώς κάποιες φορές η δομή αυτή δεν μπορεί να αποκαλυφθεί από μια γενετική μελέτη (Avisé, 2000).

#### 4.2.2 Μικροδορυφορικοί δείκτες

Οι μικροδορυφορικοί δείκτες που απομονώθηκαν και αναλύθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής αποδείχτηκαν πολύ σημαντικοί μοριακοί δείκτες για τη μελέτη των ενδοειδικών σχέσεων του *M. rivulata*. Η σημασία τους γίνεται ακόμα πιο εμφανής από τη στιγμή που το φυλογεωγραφικό πρότυπο που αναδείχτηκε με βάση το mtDNA δεν ήταν ικανό να διαλευκάνει την εξελικτική ιστορία των πληθυσμών του *M. rivulata* στην περιοχή της ανατολικής Μεσογείου.

Οι έξι μικροδορυφορικοί τόποι που απομονώθηκαν ήταν πολυμορφικοί με αριθμό αλληλομόρφων που κυμάνθηκε από 6 έως 25 ανά τόπο. Σε αντίστοιχες μελέτες ο αριθμός αλληλομόρφων κυμαίνεται στα ίδια ή και χαμηλότερα επίπεδα παρόλο που συχνά χρησιμοποιούνται πολύ μεγαλύτερα σύνολα δεδομένων. Για παράδειγμα ο αριθμός αλληλομόρφων κυμαίνεται από 10 έως 29 στο *Caretta caretta* για 5 μικροδορυφορικούς τόπους (Bowen *et al.*, 2005), από 3 έως 15 στο *Emydoidea blandingii* για 7 τόπους (Osentoski *et al.*, 2002), από 3 έως 11 στα *Chrysemys picta* και *Chelydra serpentina* για 7 τόπους (Libants *et al.*, 2004), από 8 έως 14 στο *Malaclemys terrapin* για 6 τόπους (Hauswaldt & Glenn, 2003), από 2 έως 15 στο *Gopherus polyphemus* για 9 τόπους (Schwartz *et al.*, 2003) και από 2 έως 8 στα είδη του γένους *Dipsochelys* για 8 μικροδορυφορικούς τόπους (Palkovacs *et al.*, 2003).

Οι πληθυσμοί με τα περισσότερα μοναδικά αλληλόμορφα είναι αυτοί που παρουσιάζονται και περισσότερο διαφοροποιημένοι στις περαιτέρω αναλύσεις. Συγκεκριμένα οι πληθυσμοί των Δωδεκανήσων (DOD), της Κύπρου (CYP) και της Ιορδανίας (JOR) είναι αυτοί που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο αριθμό μοναδικών αλληλομόρφων. Αξιοσημείωτο είναι το

γεγονός ότι η Κύπρος και η Ιορδανία μοιράζονται και κάποια αλληλόμορφα (4 αλληλόμορφα σε τρεις διαφορετικούς τόπους) τα οποία δεν εντοπίζονται σε κανέναν άλλο πληθυσμό. Αυτό είναι το πρώτο στοιχείο που μαρτυρά την εγγύτητα των πληθυσμών αυτών, που αποδείχτηκε και από τις υπόλοιπες αναλύσεις.

Από τους 17 πληθυσμούς (πληθυσμιακές ομάδες) που αναλύθηκαν οι εννέα παρουσίασαν έλλειμμα ετεροζυγωτίας. Όπως φάνηκε από τις αναλύσεις μας, σε επτά από αυτούς το έλλειμμα ετεροζυγωτίας μπορεί να οφείλεται σε ύπαρξη μηδενικών αλληλομόρφων. Άλλες πιθανές αιτίες είναι η ομομιξία ή η πληθυσμιακή υποδιαίρεση (Hoarau *et al.*, 2005; Dorak, 2006). Σε δυο λοιπόν μόνον από τους πληθυσμούς που παρουσιάζουν έλλειμμα ετεροζυγωτίας δεν έχουμε πιθανότητα ύπαρξης μηδενικών αλληλομόρφων. Αυτοί οι πληθυσμοί είναι της Αττικής (ATT) και της Πόμπιας (POM). Στην περίπτωση της Αττικής είναι πιθανό το έλλειμμα να οφείλεται σε πληθυσμιακή υποδιαίρεση καθώς η πληθυσμιακή ομάδα ATT αποτελεί συνένωση δυο πληθυσμών: της Νέας Μάκρης και του Μαραθώνα. Για την περίπτωση της Πόμπιας χρειάζονται παραπάνω στοιχεία για να καταλήξουμε σε συμπέρασμα. Για την εξακρίβωση της ακριβούς αιτίας απόκλισης από την ισορροπία HW χρειάζονται συνήθως επιπρόσθετα στοιχεία δημογραφίας.

Από την κατανομή των αλληλικών συχνοτήτων (εικόνα 3.9) παρατηρούμε ότι στον πληθυσμό της Κύπρου (CYP) και συχνά και της Ιορδανίας (JOR) έχουμε την εμφάνιση σχεδόν πάντα των μικρότερων σε μέγεθος (bp) αλληλομόρφων. Ο μικρός αριθμός αλληλομόρφων ανά τόπο για τους πληθυσμούς αυτούς (πίνακας 3.11) εξηγείται από το ότι έχουμε αναλύσει πολύ μικρό αριθμό ατόμων ανά πληθυσμό. Όμως, η μετατόπιση της κατανομής όλων των αλληλομόρφων προς τα αριστερά (μικρά σε μέγεθος αλληλόμορφα) δεν μπορεί να οφείλεται μόνο σε αυτόν το λόγο. Η έντονη διαφορά στα πρότυπα κατανομής των αλληλομόρφων στους δυο αυτούς πληθυσμούς δεν μπορεί να ελεγχθεί και να ερμηνευτεί με βάση τα δεδομένα που έχουμε. Απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός ατόμων ώστε να ελεγχθεί αν το

φαινόμενο αυτό είναι αποτέλεσμα μιας πρόσφατης πληθυσμιακής στενωπού ή όχι.

Συγκρίνοντας τους πληθυσμούς σε τεχνητούς και φυσικούς υγροτόπους δεν βλέπουμε εμφανή διαφορά στην κατανομή των αλληλικών συχνοτήτων και την ετεροζυγωτία. Παρατηρούμε, όμως, ότι πληθυσμοί υγροτόπων που χαρακτηρίζονται από ποικιλία ενδαιτημάτων και κατάλληλες συνθήκες για αναπαραγωγή και διατήρηση μεγάλων πληθυσμών του είδους (άσχετα από το αν είναι τεχνητοί ή φυσικοί), παρουσιάζουν μεγαλύτερο αριθμό αλληλομόρφων και υψηλότερες τιμές ετεροζυγωτίας. Υγρότοποι με τα παραπάνω χαρακτηριστικά είναι ο Αλμυρός ποταμός (ALM), τα Πάρτιρα (ANE), οι Αμουργέλλες και η Πλακιώτισσα (ANW) και η Γεωργιούπολη-Κουρνάς (GEK) (Δρετάκης *et al.*, 2004).

Τα τριοδιάστατα γραφήματα που προέκυψαν από την Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών (CA, **εικόνα 3.10**) αποτελούν μια καλή πρώτη εικόνα των σχέσεων των ατόμων που αναλύθηκαν με βάση τον γονότυπό τους. Η ομαδοποίηση των ατόμων στους προκαθορισμένους πληθυσμούς ήταν εμφανής για τους περισσότερους από αυτούς. Εξαιρέση αποτελούν τα άτομα της κεντρικής και ανατολικής Κρήτης. Τα άτομα αυτά τοποθετούνται σε ένα κοινό νέφος σημείων και δεν διαχωρίζονται σε περαιτέρω πληθυσμούς. Πολύ έντονη είναι η διαφοροποίηση των πληθυσμών της Κύπρου (CYP), της Ιορδανίας (JOR) και των Δωδεκανήσων (DOD). Στη συνέχεια, λιγότερο έντονη αλλά εμφανής είναι η ομαδοποίηση των ατόμων στους πληθυσμούς της Αττικής (ATT), της Κερκίνης (KER) και της Πελοποννήσου (PEL). Τα άτομα του πληθυσμού της Λέσβου (LES) εμφανίζονται στο νέφος μεταξύ των ατόμων της Αττικής και της Κερκίνης. Τέλος, από τους πληθυσμούς της Κρήτης οι μόνοι που παρουσιάζουν κάποια διαφοροποίηση από το κοινό νέφος σημείων της Κρήτης είναι οι πληθυσμοί της Γαύδου (GAV) και της Γεωργιούπολης-Κουρνά (GEK). Το πρότυπο ομαδοποίησης που διαφαιίνεται από την CA έρχεται σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα των υπόλοιπων αναλύσεων, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Για την εκτίμηση της γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές  $F_{st}$ . Ο δείκτης  $F_{st}$  είναι κατάλληλος και χρησιμοποιείται ευρύτατα για την εκτίμηση γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ πληθυσμών. Σε έναν «ιδανικό πληθυσμό» χωρίς μεταλλάξεις, μεταναστεύσεις ή επιλογή, οι τιμές  $F_{st}$  εύκολα ερμηνεύονται από την τυχαία γενετική παρέκκλιση (Hartl, 1988). Όμως, σε φυσικούς πληθυσμούς η ερμηνεία είναι δυσκολότερη, αφού οι παρατηρούμενες τιμές  $F_{st}$  επηρεάζονται από τη γενετική παρέκκλιση, τις μεταλλάξεις, τις μεταναστεύσεις και τη φυσική επιλογή (Hartl, 1988). Η βιολογική ερμηνεία των τιμών  $F_{st}$  είναι εύκολη μόνο όταν μιλάμε για τις δυο ακραίες περιπτώσεις. Όταν μεταξύ δυο πληθυσμών έχουμε τιμή  $F_{st}=0$  τότε ουσιαστικά έχουμε όχι δύο πληθυσμούς αλλά μια παμμικτική μονάδα. Όταν μεταξύ δυο πληθυσμών έχουμε τιμή  $F_{st}=1$  μιλάμε για πλήρη απομόνωση των δυο πληθυσμών (ανύπαρκτη γονιδιακή ροή μεταξύ τους). Τιμές μεταξύ των δυο άκρων απεικονίζουν διαφορετικά επίπεδα γενετικής δομής μεταξύ των πληθυσμών. Για την ερμηνεία αυτών των ενδιάμεσων τιμών έχει προταθεί ότι τιμές με εύρος 0-0,05 υποδεικνύουν μικρή γενετική διαφοροποίηση. Τιμές από 0,05 έως 0,15 υποδεικνύουν μέτρια διαφοροποίηση, ενώ τιμές από 0,15 έως 0,25 μεγάλη διαφοροποίηση. Τέλος, τιμές από 0,25 και πάνω υποδεικνύουν πολύ μεγάλη γενετική διαφοροποίηση (Wright, 1978). Τέτοιου είδους ερμηνείες μπορεί να αληθεύουν, υπάρχει ωστόσο η πιθανότητα να μην αντιπροσωπεύουν την πραγματική πληθυσμιακή διαφοροποίηση. Για παράδειγμα, η αναμενόμενη τιμή  $F_{st}$  υπό το καθεστώς ολοκληρωτικής απομόνωσης δεν είναι πάντα η μονάδα. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, μάλιστα, η τιμή  $F_{st}$  είναι διαφορετική της μονάδας γιατί η επίδραση του ομοπλαστικού πολυμορφισμού (λόγω μεταλλαγών) έχει ως αποτέλεσμα την υποεκτίμηση των τιμών  $F_{st}$  σε μεγάλο βαθμό (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Ο στατιστικός έλεγχος για τη σημαντικότητα των τιμών  $F_{st}$  είναι πολύ αποτελεσματικός σε περιπτώσεις μεγάλου πολυμορφισμού, όπως για παράδειγμα συμβαίνει στους μικροδορυφορικούς τόπους. Αυτό μας επιτρέπει να ξεχωρίζουμε την πολύ μικρή διαφοροποίηση από τη μηδενική.

Με εξαίρεση τους πληθυσμούς της Γαύδου και της Γεωργιούπολης-Κουρνά, οι κρητικοί πληθυσμοί μεταξύ τους παρουσιάζουν τιμές  $F_{st}$  ενδεικτικές μικρής (ή οριακά μέτριας) διαφοροποίησης (0,01 έως 0,07) (πίνακας 3.15). Ο πληθυσμός της Γαύδου παρουσιάζει μέτρια γενετική διαφοροποίηση από τους υπόλοιπους κρητικούς πληθυσμούς (0,08 – 0,13). Ο πληθυσμός Γεωργιούπολης-Κουρνά παρουσιάζει τιμές μέτριας διαφοροποίησης σε σχέση με τους κρητικούς πληθυσμούς και μηδενική διαφοροποίηση από τον πληθυσμό της Πελοποννήσου ( $F_{st}=0,02$  αλλά δεν είναι στατιστικώς διαφορετική από το μηδέν). Μεταξύ των κρητικών πληθυσμών και της υπόλοιπης περιοχής μελέτης οι τιμές κυμαίνονται από 0,13 έως 0,53, ενδεικτικές μέτριας έως πάρα πολύ υψηλής διαφοροποίησης. Από τις τιμές  $F_{st}$  παρατηρούμε ότι οι πληθυσμοί της Κρήτης (με εξαίρεση τον πληθυσμό Γεωργιούπολης-Κουρνά) σχετίζονται περισσότερο με τα Δωδεκάνησα και στη συνέχεια με τον πληθυσμό της Λέσβου παρά με τις υπόλοιπες περιοχές. Η μεγαλύτερη τιμή ( $F_{st}=0,55$ ) παρατηρείται μεταξύ των πληθυσμών Ιορδανίας και Κερκίνης. Γενικά, οι τιμές  $F_{st}$  που ανακτήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι από τις υψηλότερες που αναφέρονται σε παρόμοιες μελέτες (*Psammobates geometricus*: 0,018-0,042, Cunningham *et al.*, 2002; *Geochelone nigra*: 0,009-0,49, Ciofi *et al.*, 2002; *Geochelone nigra*: 0,15-0,32, Beheregaray *et al.*, 2003; *Terrapene ornata*: 0,098, Kuo & Janzen, 2004; *Caretta caretta*: 0-0,08, Bowen *et al.*, 2005; *Malaclemys terrapin*: 0,001-0,18, Hauswaldt & Glenn, 2005; *Podocnemis expansa*: 0-0,23, Pearse *et al.*, 2006). Με την εξαίρεση των πληθυσμών της Κρήτης, μεταξύ των οποίων φαίνεται να έχουμε μεγάλη γονιδιακή ροή (μικρή διαφοροποίηση), μεταξύ όλων των υπόλοιπων περιοχών φαίνεται να έχουμε έντονη πληθυσμιακή δομή που ανακλάται στις υψηλές τιμές  $F_{st}$ .

Εκτιμήτριες της γονιδιακής ροής, όπως οι τιμές  $F_{st}$ , αποτυγχάνουν στη διάκριση μεταξύ της σύγχρονης γονιδιακής ροής και των ιστορικών συνδέσεων μεταξύ των πληθυσμών (Avisé, 2000). Χαμηλές τιμές μπορεί να σημαίνουν υψηλή γονιδιακή ροή μεταξύ πληθυσμών στο παρόν ή πρόσφατη ιστορική συσχέτιση των πληθυσμών με μηδενική σύγχρονη γονιδιακή ροή, ή



συνήθως ένα ακαθόριστο μείγμα των δυο αυτών εναλλακτικών πιθανοτήτων (Avise, 2000).

Από τον έλεγχο της απομόνωσης λόγω απόστασης φαίνεται ότι οι τιμές  $F_{st}$  σχετίζονται με τη γεωγραφική απόσταση μεταξύ των μελετώμενων πληθυσμών, άρα η γενετική δομή που αποτυπώνεται δεν είναι τυχαία, αλλά ανακλά τη γεωγραφική κατανομή των πληθυσμών (Rousset, 1997).

Συμπληρωματικά με τις τιμές  $F_{st}$  χρησιμοποιήθηκαν και άλλες δυο γενετικές αποστάσεις ώστε να προσεγγιστούν οι σχέσεις των πληθυσμών. Όταν μια γενετική απόσταση χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του σχετικού χρόνου απόκλισης, είναι απαραίτητο η αναμενόμενη απόκλιση να αυξάνει γραμμικά με το χρόνο (Goldstein & Pollock, 1997). Στην πλειονότητά τους οι μεταλλαγές στους μικροδορυφορικούς τόπους γίνονται κατά βήματα (stepwise), αλλάζοντας μέγεθος αλληλομόρφων κατά μια επανάληψη (ή πολύ μικρό αριθμό επαναλήψεων). Για το λόγο αυτό συχνά χρησιμοποιούνται αποστάσεις που προϋποθέτουν το μοντέλο SMM (Stepwise Mutation Model) των Ohta & Kimura (1973) (βλ. Goldstein & Pollock, 1997). Όμως, ευρέως χρησιμοποιούμενες αποστάσεις που βασίζονται στο μοντέλο μεταλλαγής IAM (Infinite Alleles Model) των Kimura & Crow (1964), χρησιμοποιούνται κάποιες φορές για τους μικροδορυφορικούς τόπους. Τέτοιες γενετικές αποστάσεις, όμως, είναι ανακριβείς και μη γραμμικές για τους τόπους που εξελίσσονται σύμφωνα με το μοντέλο SMM. Επίσης, υπάρχει μια ομάδα γενετικών αποστάσεων, οι οποίες παρότι δεν βασίζονται στο SMM ή κάποιο άλλο εξελικτικό μοντέλο, ανταποκρίνονται πολύ καλά στην αναπαράσταση των φυλογενετικών σχέσεων όταν εξετάζονται πολύ κοντινά τάξα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν και οι αποστάσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα, οι αποστάσεις  $D_{AS}$  (Allele-Sharing Statistic, Stephens *et al.*, 1992) και  $D_C$  (Chord distance, Cavalli-Sforza & Edwards, 1967) βασίζονται στις αλληλικές συχνότητες των πληθυσμών και αναδομούν τις φυλογενετικές σχέσεις συγγενικών τάξων πολύ καλύτερα απ' ό,τι αποστάσεις που βασίζονται στο μοντέλο SMM (Goldstein *et al.* 1995; Takezaki & Nei 1996).

Η τοπολογία των δύο άρριζων ακτινωτών φυλογενετικών δέντρων είναι η ίδια ανεξάρτητα από την απόσταση που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή τους (εικόνα 3.11, 3.12). Παρατηρούμε δυο ομάδες κλάδων. Έναν που οδηγεί στους πληθυσμούς της Κύπρου και της Ιορδανίας, οι οποίοι αποκλίνουν έντονα από τους υπόλοιπους, και έναν άλλο κλάδο που περιέχει όλους τους υποκλάδους των πληθυσμών του ελλαδικού χώρου. Όλοι οι πληθυσμοί της Κρήτης ομαδοποιούνται σε έναν υποκλάδο με εξαίρεση τον πληθυσμό Γεωργιούπολης-Κουρνά, ο οποίος ομαδοποιείται μαζί με την Πελοπόννησο. Επίσης, ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ο πληθυσμός της Γαύδου ομαδοποιείται μεν μαζί με τους κρητικούς πληθυσμούς αλλά είναι εμφανώς περισσότερο διαφοροποιημένος. Η τοπολογία των δέντρων έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανάλυσης CA και με τις παρατηρούμενες τιμές Fst.

Με τα παραπάνω συμφωνούν και τα αποτελέσματα της Μπείεσιανής ανάλυσης. Τα Δωδεκάνησα (Ρόδος, Κως) αποτελούν μια χωριστή ομάδα, η Κύπρος ομαδοποιείται εξ ολοκλήρου με την Ιορδανία και η ηπειρωτική Ελλάδα (Αττική, Πελοπόννησος, Κερκίνη) με τη Λέσβο. Αξιοσημείωτη είναι η περίπτωση της Κρήτης, τα άτομα από τους πληθυσμούς της οποίας δημιουργούν δύο χωριστές ομάδες. Σε όλους αυτούς τους πληθυσμούς (με εξαίρεση τη Γαύδο και τη Γεωργιούπολη-Κουρνά, που θα αναλυθούν στη συνέχεια) κάποια άτομα κάθε πληθυσμού κατατάσσονται στη μια ομάδα και κάποια στην άλλη. Το γεγονός ότι οι παρατηρούμενες τιμές Fst μεταξύ των πληθυσμών της Κρήτης είναι πολύ χαμηλές, μπορεί να δικαιολογήσει το γεγονός ότι δεν γίνεται διαχωρισμός των κρητικών πληθυσμών σε χωριστές ομάδες. Οι μέθοδοι κατάταξης δεν αποδίδουν καλά όταν οι πληθυσμιακές ομάδες εμφανίζουν μικρές διαφορές στις αλληλικές συχνότητες (Pritchard *et al.*, 2000). Οι Latch *et al.* (2006) απέδειξαν ότι το πρόγραμμα Structure (που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη), παρότι αποδίδει το ίδιο ή και καλύτερα από άλλα προγράμματα που χρησιμοποιούν τη Μπείεσιανή προσέγγιση, αδυνατεί να αναγνωρίσει το σωστό αριθμό ομάδων όταν οι τιμές Fst είναι χαμηλές (γύρω στο 0,03). Όσον αφορά τα άτομα της Γαύδου, αυτά

κατατάσσονται εξ ολοκλήρου στη δεύτερη ομάδα της Κρήτης. Αυτό είναι ενδεικτικό της ιδιαίτερης γενετικής δομής του πληθυσμού αυτού, ο οποίος αποτελεί το νοτιότερο πληθυσμό του είδους στην Ευρώπη και χρήζει ιδιαίτερης προσοχής όσον αφορά τη διατήρησή του. Ο πληθυσμός Γεωργιούπολης-Κουρνά, όπως και σε όλες τις προηγούμενες αναλύσεις, δεν ομαδοποιείται με την υπόλοιπη Κρήτη. Η γενετική «ταυτότητα» των ατόμων του πληθυσμού αυτού προσομοιάζει κατά 46% στον πληθυσμό των Δωδεκανήσων και κατά 44% στον πληθυσμό της Πελοποννήσου. Το γεγονός αυτό μπορεί ίσως να αποδοθεί σε ανθρωπογενείς παράγοντες που έδρασαν κατά την αρχαιότητα (βλέπε παράγραφο 4.2.4).

#### 4.2.3 Οικολογικά στοιχεία

Η μελέτη του τεχνητού υγροτόπου στην Πόμπια του Δήμου Μοιρών και η ραδιοτηλεμετρική παρακολούθηση του *M. rivulata* στον Αλμυρό ποταμό Ηρακλείου μας έδωσαν πολύτιμα στοιχεία για την κατανόηση της αντοχής των ζώων αυτών σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, καθώς και των πιθανών τρόπων διασποράς τους. Επίσης, παράπλευρα μας έδωσαν στοιχεία για τη διαχείριση των τεχνητών υγροτόπων σε σχέση με την παρουσία του είδους *M. rivulata* σε αυτούς.

##### 4.2.3.1 Επίπεδα ρύπανσης, λειτουργία του βιολογικού καθαρισμού και κατάσταση του πληθυσμού του *M. rivulata*

Η μελέτη της κατάστασης του πληθυσμού σε έναν τεχνητό υγρότοπο που φτιάχτηκε πρόσφατα για τη βιολογική επεξεργασία αποβλήτων και εποικίστηκε άμεσα από τις χελώνες, υποδεικνύει ότι οι χελώνες του είδους *M. rivulata* μπορούν να επιβιώσουν σε τέτοιου είδους (υποβαθμισμένα) περιβάλλοντα.

Η περιοχή “μάρτυρας” (ρυσάκι, Ο) δίνει μεγαλύτερη τιμή του δείκτη του Shannon παρότι έχει μικρότερο αριθμό ειδών από την περιοχή 2 (δεύτερη δεξαμενή επεξεργασίας). Αυτό συμβαίνει λόγω της μεγάλης αφθονίας που παρουσιάζει η περιοχή 2 σε ορισμένα “οπορτουνιστικά” είδη, όπως κάποια

είδη Νηματωδών και Ολιγόχαιτων. Η τιμή του Shannon μπορεί να είναι υψηλή ακόμα και σε περιοχές έντονα ρυπασμένες (Kovalak, 1981). Η οργανική ρύπανση προκαλεί αύξηση στην αφθονία κάποιων ανθεκτικών οργανισμών αλλά μείωση στην ποικιλότητα, αφού εκλείπουν οι ευαίσθητοι οργανισμοί (Kovalak, 1981). Όσον αφορά την ανάλυση των μακροασπονδύλων, από σύγκριση με άλλα παρόμοια υδατικά συστήματα της Κρήτης (Πρινοπόταμος, Αποσελέμης) (Βορεάδου, 1993; Βορεάδου, αδημοσίευτα στοιχεία), φαίνεται ότι όλες οι δειγματοληπτικές περιοχές παρουσιάζουν μικρό αριθμό τάξων και χαμηλή τιμή του δείκτη του Shannon, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι έχουν υποβαθμιστεί. Η δεξαμενή 2 εμφανίζει χαμηλή τιμή Shannon (1,237). Η πανίδα των μη υποβαθμισμένων υδατικών οικοσυστημάτων, που χαρακτηρίζεται με τον όρο “Clean Water Fauna”, περιλαμβάνει όλα τα υπόλοιπα τάξα εκτός από τους Χειρονόμους (Chironomidae), τους Νηματώδεις (Nematoda), τους Ολιγόχαιτους (Oligochaeta) και τα Καρκινοειδή (Crustacea). Τα είδη που χαρακτηρίζουν την πανίδα των μη ρυπασμένων και ευτροφικών νερών (Clean Water Fauna) (Hynes, 1960) μόλις αρχίζουν να αναπτύσσονται στη δεξαμενή 2. Τα Καρκινοειδή, τα οποία χαρακτηρίζουν περιοχές σε μεταβατικό στάδιο, αποκτούν εκεί σημαντικό πληθυσμό. Επομένως στη δεξαμενή 2 έχει πραγματοποιηθεί αναβάθμιση της ποιότητας του νερού, όμως λόγω της έντονης παρουσίας ομάδων οργανισμών που είναι γνωστοί στη βιβλιογραφία για την ανθεκτικότητά τους στη ρύπανση, όπως Νηματωδών, Ολιγόχαιτων και Δίπερων *Chironomus riparius* (Βορεάδου, 1993), δεν μπορούμε να θεωρήσουμε ότι το νερό της δεξαμενής 2 είναι αντίστοιχης καθαρότητας με ένα φυσικό υδατικό οικοσύστημα που δεν δέχεται λύματα. Ίσως στο μελλοντικό σχεδιασμό αντίστοιχων υγροτόπων-βιολογικών καθαρισμών θα ήταν καλό να προβλεφθεί μία επιπλέον δεξαμενή επεξεργασίας, ώστε να μιλάμε για πλήρως αναβαθμισμένη ποιότητα υδάτων. Η περιοχή Ο που εξετάστηκε ως “μάρτυρας” είναι η λιγότερο υποβαθμισμένη, έχει την υψηλότερη τιμή του δείκτη Shannon, όμως και αυτή είναι σε ένα βαθμό υποβαθμισμένη αφού οι τιμές που παρουσιάζει είναι ανάλογες με άλλα

παρόμοια υδατικά ρυπασμένα συστήματα (Βορεάδου, 1993; Βορεάδου, αδημοσίευτα στοιχεία). Στην επί τόπου παρατήρηση και δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε διαπιστώθηκαν υπολείμματα κασιγάρου από ελαιοτριβεία και μάλλον αυτός είναι και ο λόγος της υποβάθμισης του χειμάρρου. Θα πρέπει να εξασφαλιστεί ότι λύματα ελαιουργείων δεν θα εισέρχονται μέσα στο βιολογικό καθαρισμό ώστε να εξασφαλιστεί η καλή λειτουργία του.

Παρόλο που μιλάμε για ένα σαφώς υποβαθμισμένο σύστημα, η παρουσία του *M. rivulata* που εποίκισε τον υγρότοπο αυτό από τις γύρω περιοχές μαρτυρά την ανθεκτικότητα των ζώων αυτών. Η διατήρηση ενός πολύ μεγάλου (σε σχέση με την έκταση του υγροτόπου) πληθυσμού δείχνει ότι τα ζώα αυτά δεν ενοχλούνται από τη μεγάλη πυκνότητα πληθυσμού. Οι χελώνες δεν δείχνουν ιδιαίτερη προτίμηση σε κάποια δεξαμενή, αλλά παρατηρούνται εξίσου και στις δύο, παρόλο που η πρώτη είναι πιο υποβαθμισμένη. Η αντοχή τους σε ρυπασμένα ενδιαίτηματα έρχεται σε συμφωνία με αναφορές για την ανθεκτικότητα των χελωνών του γένους *Mauremys* (Gasith & Sidis, 1983; Sidis & Gasith, 1985; Engelmann, 1993; Highfield, 1996; Clark, 1996).

Η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία ( $H_o$ ) στον πληθυσμό της Πόμπιας είναι στα ίδια επίπεδα με τις τιμές  $H_o$  πολλών άλλων πληθυσμών σε φυσικούς και τεχνητούς υγροτόπους. Βέβαια, ο πληθυσμός της Πόμπιας παρουσιάζει έλλειμμα ετεροζυγωτίας, το οποίο δε φαίνεται να οφείλεται στην ύπαρξη μηδενικών αλληλομόρφων. Η πιο πιθανή αιτία είναι η ομομιξία μιας και μιλάμε για ένα σχετικά μικρό πληθυσμό (Hoarau, 2005). Ο αριθμός αλληλομόρφων ανά μικροδορυφορικό τόπο στον πληθυσμό της Πόμπιας κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με αυτά άλλων πληθυσμών σε φυσικούς και τεχνητούς υγροτόπους. Όμως, όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη που ζουν πολλά χρόνια (χελώνες *Terrapene ornate*, Kuo & Janzen 2004; ουραγκοτάγκος *Pongo pygmaeus*, Goossens *et al.* 2005; ψάρια *Moxostoma hubbsi*, Lippe *et al.*, 2006), είναι πολύ πιθανό να μην είναι δυνατή η αναγνώριση της απώλειας της γενετικής ποικιλότητας με μοριακές αναλύσεις.

Το φαινόμενο αυτό ενισχύεται στην περίπτωση που οι αιτίες της απώλειας είναι πολύ πρόσφατες (τελευταία 30 - 50 χρόνια) (Lippe *et al.*, 2006). Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματά μας όσον αφορά τον πληθυσμό του βιολογικού καθαρισμού της Πόμπιας θα πρέπει να ερμηνευτούν με ιδιαίτερη προσοχή, αφού δεν δείχνουν αναγκαστικά ότι ο πληθυσμός είναι σε καλή κατάσταση ή ότι θα εξακολουθεί να είναι έτσι και στο εγγύς μέλλον. Η μακροχρόνια παρακολούθηση είναι απαραίτητη ώστε να φανεί αν πραγματικά επέρχεται μείωση της γενετικής ποικιλότητας.

Η μελέτη της διαφοροποίησης των πληθυσμών προσφέρει πολύτιμα στοιχεία για την επιλογή πληθυσμών κατάλληλων για εισαγωγή σε νέους τεχνητούς υγρότοπους. Αναμφισβήτητα, η ζεύξη του βιολογικού καθαρισμού με σύστημα δεξαμενών που λειτουργούν ως βιότοποι υπερέχει συστημάτων που απλώς παροχετεύουν το νερό (ασχέτως της τελικής καθαρότητας) σε παρακείμενα υδάτινα συστήματα.

#### 4.2.3.2 Ραδιοτηλεμετρική παρακολούθηση

Από τα αποτελέσματα της ραδιοτηλεμετρικής παρακολούθησης του πληθυσμού του *Mauremys rivulata* στον Αλμυρό ποταμό, προέκυψε ότι οι χελώνες δεν μετακινήθηκαν μακριά από τις περιοχές απελευθέρωσής τους κατά τη διάρκεια των τριών μηνών που διήρκεσε το πείραμα. Το αποτέλεσμα αυτό είναι μεν σημαντικό, αφού η περίοδος διεξαγωγής του πειράματος συμπίπτει με την περίοδο ωοτοκίας του είδους (Gasperetti *et al.*, 1993; Μάντζιου, 2000; Rifai & Mantziou, 2005) και θα αναμέναμε μετακίνηση τουλάχιστον των θηλυκών ατόμων. Βέβαια ο μικρός αριθμός ατόμων που συμπεριλήφθησαν στο πείραμα (5 θηλυκά άτομα) μπορεί να ευθύνεται για το αποτέλεσμα αυτό και δεν μπορούμε να βγάλουμε απόλυτα συμπεράσματα όσον αφορά τις μετακινήσεις των ζώων. Άλλωστε τα ζώα αυτά μετακινούνται όταν βρεθούν σε καταστάσεις περιβαλλοντικής πίεσης όπως για παράδειγμα η αποξήρανση του υπάρχοντος ενδιαιτήματος (Rifai & Mantziou, 2005). Ο Αλμυρός ποταμός, παρ' όλες τις ανθρώπινες παρεμβάσεις, αποτελεί ακόμη ένα μεγάλο και μόνιμο υγρότοπο, στον οποίο οι χελώνες δεν έχουν δεχτεί

αρκετά μεγάλη πίεση ώστε να χρειαστεί να μετακινηθούν. Αξιοσημείωτο, βέβαια, είναι το γεγονός ότι το τέλμα, αλλά και σε μεγάλο βαθμό όλο το παραποτάμιο σύστημα, έχει μειωθεί δραματικά σε έκταση μέσα στην τελευταία δεκαετία λόγω ανθρωπογενών παρεμβάσεων (επιχωματώσεις και ρίψη φερτών υλικών/μπάζων). Αποτέλεσμα αυτού είναι η απώλεια ενός μοναδικού υγρότοπου για την Κρήτη, η οποία γενικά χαρακτηρίζεται από πολύ περιορισμένο αριθμό επιφανειακών νερών και από ποτάμια διαλείπουσας ροής (Βορεάδου, 1993). Η σημαντικότητα του συγκεκριμένου υγρότοπου συνίσταται στη μεγάλη ποικιλία βιοτόπων σε μια μικρή σχετικά έκταση, στην παρουσία ενδημικών και σπάνιων ειδών της χλωρίδας, όπως ο φοίνικας του Θεόφραστου (*Phoenix theophrastii*), και στη σπουδαιότητα της περιοχής για την υδρόβια χελώνα αλλά και για τα μεταναστευτικά πουλιά και την αναπαραγωγή των παρυδάτιων πουλιών (Μυλωνάς, 1997).

Όσον αφορά το εποχικό πρότυπο δραστηριότητας των ζώων, βλέπουμε ότι τα ζώα αρχίζουν να βρίσκονται όλο και πιο συχνά μέσα στο νερό όσο πλησιάζουμε προς το καλοκαίρι. Αντίθετα, τον πρώτο μήνα διεξαγωγής του πειράματος (Απρίλιος), τα ζώα περνούσαν μεγάλο διάστημα έξω και λιάζονταν προσπαθώντας να ανεβάσουν τη θερμοκρασία τους. Η παραμονή τους στον ήλιο συντελεί, εκτός από την άνοδο της θερμοκρασίας του σώματος, και στις παρακάτω λειτουργίες (Meek, 1983; Meek & Avery, 1988; Janzen *et al.*, 1992): διευκόλυνση της πέψης και αύξηση της αφομοίωσης της τροφής, αύξηση του μεταβολικού ρυθμού ώστε να επιτευχθούν οι καθημερινές δραστηριότητες, απομάκρυνση εξωπαρασίτων, σύνθεση βιταμίνης D, επιτάχυνση του ρυθμού ανάπτυξης των αυγών στα θηλυκά όταν εγκυμονούν, απομάκρυνση φυκών και βδελλών που προσκολλούνται στο καβούκι. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διάρκεια και τη συχνότητα της έκθεσης στον ήλιο είναι: η θερμοκρασία του νερού, η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, η ένταση του ανέμου, το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται, η εποχή, η ώρα της ημέρας, η διατροφική κατάσταση του ζώου, το φύλο και το μέγεθος του σώματος (Meek, 1983; Meek & Avery, 1988; Pages *et al.*, 1991; Janzen *et al.*, 1992). Η δραστηριότητα των χελωνών συνήθως εντοπίζεται από τις 07:00 –

08:00 το πρωί μέχρι τις 22:00 - 23:00 το βράδυ. Το πρότυπο αυτό παρουσιάζει δύο κορυφές δραστηριότητας: η πρώτη από τις 10:00 έως τις 13:00 και η δεύτερη, μικρότερης έντασης, γύρω στις 19:00 έως τις 20:00. Τέλος δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα πρότυπα δραστηριότητας μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων.

#### 4.2.4 Φυλογεωγραφικό σενάριο για τους πληθυσμούς του είδους *M. rivulata*

Ποιοι, όμως, είναι τελικά οι παράγοντες και πώς έδρασαν στην κατανομή και την εξάπλωση των οργανισμών αυτών ώστε να καταλήξουμε στη σύγχρονη φυλογεωγραφία του είδους;

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματά μας από το mtDNA και τις μικροδορυφορικές αλληλουχίες, τα διαθέσιμα παλαιοντολογικά στοιχεία, την παλαιογεωγραφία και την παλαιοκλιματολογία της ανατολικής Μεσογείου, καθώς και τα στοιχεία της οικολογίας και ηθολογίας του *M. rivulata*, μπορούμε να διατυπώσουμε την παρακάτω πιθανή εξελικτική υπόθεση.

Όπως έχει ήδη διατυπωθεί και για τα άλλα είδη υδρόβιων χελωνών που κατανέμονται στον ευρωπαϊκό χώρο (Lenk *et al.*, 1999; Fritz *et al.*, 2006), η σημερινή κατανομή του *M. rivulata* έχει επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό από τις κλιματικές αλλαγές που επικράτησαν κατά το Πλειστόκαινο. Οι ψυχρές περιόδους είχαν ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση των πληθυσμών του *M. rivulata* προς τα νότια και ανατολικά. Οι πληθυσμοί βρήκαν καταφύγιο στα νησιά του Αιγαίου, στην Κρήτη και πιθανώς στις ακτές της Μικράς Ασίας. Η ανάμιξη των πληθυσμών διευκολύνθηκε από τους εύκολα προσπελάσιμους θαλάσσιους διαδρόμους που εμφανίστηκαν επανειλημμένα κατά το Πλειόκαινο και Πλειστόκαινο και από τη μεγάλη ικανότητα διασποράς του είδους. Οι θαλάσσιοι διάδρομοι δεν αποτελούν φράγμα για τη διασπορά του *M. rivulata* (Mantziou *et al.*, 2004). Γενικά η διασπορά μέσω θάλασσας έχει υποεκτιμηθεί πάρα πολύ όσον αφορά την ερμηνεία των σύγχρονων κατανομών πολλών ζωικών ομάδων (Carranza & Arnold, 2003; Vences *et al.*, 2003; de Queiroz, 2005). Ιδιαίτερα για τις χελώνες η θάλασσα δεν αποτελεί απροσπέλαστο φράγμα, αφού σε πολλά είδη, ακόμη και χερσαίων χελωνών,



που δεν έχουν καλή ικανότητα ενεργητικής κολύμβησης, έχουν παρατηρηθεί πολλές περιπτώσεις διασποράς μέσω θάλασσας (Carr, 1952; Neill, 1958; Simpson, 1943; Meylan & Sterrer, 2000; Parham *et al.*, 2006). Για όλα τα είδη υδρόβιων χελωνών της Δυτικής Παλαιαρκτικής έχει διατυπωθεί η θεωρία ότι οι θαλάσσιοι διάδρομοι δεν αποτελούν εξελικτικά μεγάλης διάρκειας φράγματα (Lenk *et al.*, 1999; Mantziou, 2004; Fritz *et al.*, 2005; Fritz *et al.*, 2006). Για το *M. leprosa* οι Fritz *et al.* (2005 & 2006) έδειξαν ότι οι ορεινοί όγκοι, και όχι η θάλασσα, συνιστούν σημαντικό φράγμα στη διασπορά του. Επίσης, μελέτη βασισμένη στην οσμωτική πίεση του αίματος, φάνηκε ότι το *M. leprosa* αντέχει και μπορεί να προσαρμοστεί στο θαλασσινό νερό προσωρινά για κάποιο χρονικό διάστημα (Schoffeniels & Tercafs, 1966). Το *M. rivulata* έχει επανειλημμένα παρατηρηθεί να κολυμπά σε θαλασσινό νερό, σε κοντινή απόσταση από την παραλία, όταν έχουμε εκροή κάποιου ποταμού στη γύρω περιοχή (προσωπικές παρατηρήσεις). Άλλωστε, οι αποστάσεις των νησιών του Αιγαίου μεταξύ τους αλλά και με τις γειτονικές ηπειρωτικές περιοχές ήταν πολύ μικρότερες από τις σημερινές κατά το Μειόκαινο, το Πλειόκαινο και το Πλειστόκαινο (Meulenkamp *et al.*, 1994, Kreemer & Chamot-Rooke, 2004; Hausdorf & Hennig, 2005)

Έτσι, λοιπόν, κατά τις θερμές περιόδους στο Πλειόκαινο και το Πλειστόκαινο είχαμε διασπορά και επέκταση της κατανομής των πληθυσμών του *M. rivulata* σε πιο βόρειες περιοχές. Η μετατόπιση και η ανακατάταξη οδήγησαν σε μίξη των πληθυσμών και πιθανώς και εγκατάσταση πληθυσμών σε νέες περιοχές. Η μίξη αυτή, όμως, δεν σταμάτησε το Πλειστόκαινο. Αντιθέτως, άλλοι παράγοντες επέδρασαν, ίσως ακόμα πιο δραστικά, ώστε να πάρουμε το φυλογεωγραφικό πρότυπο που καταγράφεται στους σύγχρονους πληθυσμούς. Οι παράγοντες αυτοί είναι οι έντονες κλιματικές αλλαγές κατά το Πλειστόκαινο και κατά το Ολόκαινο, καθώς και η επίδραση του ανθρώπου.

Από το πρότυπο που διαφαίνεται από τις αλληλουχίες του mtDNA φαίνεται ότι η στρωματοποίηση των νερών της Μεσογείου, η οποία έλαβε χώρα αρκετές φορές κατά το Πλειστόκαινο αλλά και κατά το Ολόκαινο, έπαιξε σημαντικό ρόλο στη διασπορά και τη μίξη των πληθυσμών του *M.*

*rioulata*. Υπήρξαν περίοδοι κατά τις οποίες υπήρχε στην Ανατολική Μεσόγειο ένα επιφανειακό στρώμα γλυκού νερού (Por, 1989; Rossignol-Strick, 1985; Smith *et al.*, 1986; Cramp & O'Sullivan, 1999; Geraga *et al.*, 2005) που προκλήθηκε από τη μεγάλης τάξης μεγέθους εισροή γλυκού νερού στη Μεσόγειο είτε εξαιτίας του λιώσιματος των πάγων κατά τις μεσοπαγετώδεις περιόδους (Por, 1989; Cramp & O'Sullivan, 1999; Nijenhuis, 1999; Kallel *et al.*, 2000; Geraga *et al.*, 2005), είτε λόγω υπερβολικής ροής του Νείλου την εποχή των Μουσώνων (Por, 1989; Rossignol-Strick, 1983; Rossignol-Strick, 1985; Cramp & O'Sullivan, 1999; Nijenhuis, 1999; Kallel *et al.*, 2000; Krom *et al.*, 2002; Geraga *et al.*, 2005). Ο Por (1989) αναφέρει ότι οι πλημμύρες του Νείλου παρέσυραν και μετέφεραν ζώα που ήταν ικανά να επιβιώσουν σε υφάλμυρα νερά. Η πιο πρόσφατη στρωματοποίηση έλαβε χώρα από 6000 έως 9000 χρόνια πριν από σήμερα (Smith *et al.*, 1986; Cramp & O'Sullivan, 1999; Krom *et al.*, 2002) και είναι πολύ πιθανό οι χελώνες να μετακινήθηκαν μέσω του γλυκού ή υφάλμυρου αυτού στρώματος προς γειτονικές περιοχές. Μ' αυτόν τον τρόπο μπορεί ίσως να εξηγηθεί και η ομοιότητα των ατόμων Ιορδανίας και Κύπρου. Άλλωστε, κατά την περίοδο αυτή, το ποτάμιο σύστημα της Ιορδανίας ερχόταν σε επαφή με τον ποταμό Litani στο Λίβανο (ο οποίος εκβάλλει στη Μεσόγειο) με το σύστημα των παραλιακών ποταμών στο Ισραήλ και με τη λεκάνη της Δαμασκού (Por, 1989). Όλες αυτές οι συνδέσεις είχαν ως συνέπεια την ανταλλαγή και τη διασπορά πολλών υδρόβιων ζωικών οργανισμών (Por, 1989). Από τα αποτελέσματα των μικροδορυφορικών τόπων φαίνεται ότι οι μετακινήσεις των ζώων γίνονταν σε σχετικά κοντινές περιοχές. Οι παρατηρούμενες τιμές Fst, τα φυλογενετικά δέντρα και οι πέντε ομάδες (clusters) που προέκυψαν από τη Μπείεσιανή ανάλυση, αναδεικνύουν τα διαφορετικά κέντρα διασποράς και μίξης των χελωνών. Έτσι, η Κύπρος ομαδοποιείται με την Ιορδανία ενώ τα Δωδεκάνησα παραμένουν διαφοροποιημένα και δεν επηρεάζονται από τις μετακινήσεις των ζώων της απώτερης νοτιοανατολικής Μεσογείου. Η Πελοπόννησος, η Αττική, η Κερκίνη και η Λέσβος, βάσει των τιμών Fst, φαίνεται ότι παρουσιάζουν μέτρια έως μεγάλη διαφοροποίηση και οι κλάδοι στα φυλογενετικά δέντρα

είναι σαφώς διαχωρισμένοι, αλλά η Μπείεσιανή ανάλυση δεν κατάφερε να διακρίνει διαφορετικές ομάδες πληθυσμών. Το γεγονός ότι η Λέσβος ομαδοποιείται με την ηπειρωτική Ελλάδα έχει αναφερθεί ξανά και σε άλλες ζωικές ομάδες, όπως για παράδειγμα στους σκορπιούς του είδους *Mesobuthus gibbosus* (Parmakelis *et al.*, 2006b). Είναι πιθανό, λοιπόν, να είχαμε μίξη πληθυσμών σε όλη την περιοχή αυτή λόγω της στρωματοποίησης των νερών, η οποία προς τα βόρεια ενισχύεται και από την εισροή νερών από τη Μαύρη Θάλασσα (Por, 1989).

Υπάρχει ένα πληροφοριακό κενό λόγω έλλειψης στοιχείων από τα παράλια της Τουρκίας και από τα Ιόνια νησιά όπου κατανέμεται το είδος. Μπορεί η ανάλυση δειγμάτων από τις περιοχές αυτές να μας δώσει νέα στοιχεία και να τροποποιήσει το σενάριο που μόλις παρατέθηκε. Κάτι τέτοιο, όμως, δεν αναμένεται αφού δεν υπάρχουν ενδείξεις για εξελικτικά ισχυρά φράγματα στη διασπορά του *M. rivulata* μεταξύ των προαναφερόμενων περιοχών και των περιοχών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

Η περίπτωση του πληθυσμού Γεωργιούπολης-Κουρνά, ο οποίος ομαδοποιείται με την Πελοπόννησο και με τα Δωδεκάνησα, δεν μπορεί να εξηγηθεί με το σενάριο της στρωματοποίησης και μόνο. Αν ήταν αυτή η περίπτωση, τότε θα αναμέναμε και άλλοι πληθυσμοί της Κρήτης να ομαδοποιούνταν με τις προαναφερόμενες περιοχές. Μια πιθανή λογική εξήγηση στην περίπτωση αυτή είναι η ανθρωπογενής επίδραση. Η λίμνη του Κουρνά είναι η μόνη φυσική λίμνη της Κρήτης και χρονολογείται από το Πλειστόκαινο (Bonnefont, 1972; Παπαπέτρου-Ζαμάνη, 1973), και στην οποία καταγράφεται έντονη ανθρώπινη δραστηριότητα κατά την αρχαιότητα (Βασιλάκης, 2000). Το όνομα της λίμνης κατά την αρχαιότητα ήταν Κορησία και ονομάστηκε έτσι από την ύπαρξη ναού αφιερωμένου στην Κορησία Αθηνά (Βασιλάκης, 2000). Είναι γνωστό ότι ο Μινωικός πολιτισμός είναι στενά συνδεδεμένος με το Μυκηναϊκό (Λοΐζος, 2001). Ο Μινωικός πολιτισμός, που είναι ο πρώτος πολιτισμός που άνθησε στον ελλαδικό και τον ευρωπαϊκό χώρο, άρχισε να αναπτύσσεται μετά το 3000π.Χ. και έφτασε στην ακμή του κατά την περίοδο 1700 - 1450 π.Χ. (Λοΐζος, 2001). Την περίοδο αυτή, οι

Μινωίτες έλεγχαν τις θάλασσες και συχνά ταξίδευαν σε Πελοπόννησο και Ρόδο για εμπορικούς σκοπούς. Ο Μυκηναϊκός πολιτισμός ανέτειλε λίγο μετά το 1600 π.Χ. και αναμφισβήτητα επηρεάστηκε από το Μινωικό, ενώ πολλοί είναι αυτοί που πιστεύουν ότι ήταν αποτέλεσμα της Μινωικής αποικιοκρατίας (Λοΐζος, 2001). Έτσι δεν είναι απίθανο χελώνες να μεταφέρθηκαν από την Πελοπόννησο ή και τα Δωδεκάνησα και να ελευθερώθηκαν στη λίμνη του Κουρνά. Οι χελώνες έπαιζαν κάποιο ρόλο στη ζωή των αρχαίων αφού υπάρχουν σχετικές αναφορές σε αρχαία κείμενα και στην ελληνική μυθολογία όπως για παράδειγμα η κατασκευή της πρώτης λύρας από το όστρακο μιας χελώνας (Απολλόδωρος, Γ' 10-2). Χελώνες απεικονίζονται σε πολλές παραστάσεις, καθώς επίσης και σε κεραμικά και μπρούτζινα ομοιώματα. Επίσης, χελώνες (αρχικά θαλάσσιες και αργότερα χερσαίες) απεικονίζονται στα νομίσματα της Αίγινας (700 - 404 π.Χ.) (Βενιζέλου, 1990). Τέλος, οι χελώνες θεωρούνταν στην αρχαία Ελλάδα ιερό ζώο του Ποσειδώνα και της Αφροδίτης και σύμβολο μακροζωίας, γονιμότητας και δύναμης (Medasset, 2006). Επίσης, σε αρχαιολογική ανασκαφή έχει βρεθεί όστρακο χελώνας (*M. rivulata*) στους πρόποδες του Ψηλορείτη στο νομό Ρεθύμνου. Το εύρημα χρονολογείται από την Εποχή του Χαλκού (περίπου 3000 π.Χ.) και φυλάσσεται στις συλλογές του αρχαιολογικού μουσείου στο Ρέθυμνο (Δήμητρα Μυλωνά, προσωπική επικοινωνία).

Συμπερασματικά, η παρατηρούμενη διαφοροποίηση του πληθυσμού της Γεωργιούπολης-Κουρνά ίσως οφείλεται σε ιστορικούς παράγοντες που έχουν να κάνουν με τις δραστηριότητες του ανθρώπου στη λίμνη. Το ότι δεν υπήρξε διασπορά του συγκεκριμένου πληθυσμού στην υπόλοιπη Κρήτη είναι μεν αξιοπερίεργο αλλά μπορεί να ερμηνευτεί εν μέρει από την ηθολογία των ζώων: όπως είδαμε από τη ραδιοτηλεμετρία για την περίπτωση του Αλμυρού ποταμού, τα ζώα δεν φαίνεται να μετακινούνται όταν βρίσκονται σε υγροτόπους που δεν δέχονται μεγάλη πίεση. Διερεύνηση του συγκεκριμένου πληθυσμού σε μεγαλύτερο βάθος είναι απαραίτητη και ίσως δώσει περισσότερα στοιχεία για το μη αναμενόμενο αυτό αποτέλεσμα.

Όσον αφορά τους πληθυσμούς της υπόλοιπης Κρήτης, η μίξη τους είναι τόσο πρόσφατη που δεν είναι δυνατή η διάκρισή τους με τα μικροδορυφορικά δεδομένα. Κι εδώ είναι πιθανή η περαιτέρω ανθρωπογενής επίδραση.

Τα νησιά της Μεσογείου είχαν υποστεί την εισβολή των ανθρώπων και την επίδρασή τους πριν από τη Νεολιθική εποχή (6500 π.Χ.) (Schüle, 2000; Perissoratis & Conispoliatis, 2003). Είναι πολύ πιθανό οι χελώνες να ήταν μια εύκολη πηγή τροφής για τους ανθρώπους αυτούς. Οι υδρόβιες χελώνες ακόμη και σήμερα καταναλώνονται σε πάρα πολλά μέρη του κόσμου. Για παράδειγμα το *Macrolemys temminckii* παίζει σημαντικό ρόλο στη λαϊκή παράδοση και στην κουζίνα των νοτιο-ανατολικών ΗΠΑ. Σε πολλές πολιτείες των ΗΠΑ παγιδεύονται και καταναλώνονται χιλιάδες χελώνες του είδους (Roman *et al.*, 1999). Το ίδιο ισχύει και για το είδος *Malaclemys terrapin* (Hauswaldt & Glenn, 2005). Αναφορές υπάρχουν και για την κατανάλωση θαλάσσιων χελωνών στην περιοχή της ανατολικής Μεσογείου (Nada, 2001; Aguirre *et al.*, 2006). Επίσης, στις αγορές της Συρίας και της Ιορδανίας πωλούνται προς κατανάλωση τόσο υδρόβιες όσο και χερσαίες χελώνες, αλλά και καβούκια των ζώων αυτών για διακοσμητικούς σκοπούς (προσωπικές παρατηρήσεις). Πολλά είδη της οικογένειας Geomydidae, αλλά και συγκεκριμένα του γένους *Mauremys*, κινδυνεύουν με εξαφάνιση λόγω της υπερβολικής τους κατανάλωσης ή χρήσης σε ιατρικές πρακτικές σε Ασιατικές χώρες (Feldman & Parham, 2004; Spinks *et al.*, 2004; Stuart & Parham, 2004). Οι Gasperetti *et al.* (1993) αναφέρουν για το *M. caspica* ότι η μεταφορά των ζώων από ανθρώπους σε νέες περιοχές έχει μεγάλη ιστορία και συχνά οι περίεργες κατανομές μπορούν να εξηγηθούν με αυτόν τον τρόπο.

Πέραν της ενεργητικής μεταφοράς των ζώων από περιοχή σε περιοχή, η παρουσία του ανθρώπου μπορεί να επέδρασε και διαφορετικά. Όπως είδαμε από την ανάλυση των οικολογικών στοιχείων, τα ζώα αυτά είναι πολύ ανθεκτικά και μπορούν να επιβιώσουν σε λύματα. Είναι πιθανό πολλές μετακινήσεις ζώων να διευκολύνθηκαν από τα κανάλια απορροής λυμάτων κάθε χωριού κατά την αρχαιότητα, τα οποία γνωρίζουμε ότι σε πολλές

περιοχές ήταν πολύ ανεπτυγμένα (Λοΐζος, 2001). Ιδιαίτερα κατά τους καλοκαιρινούς μήνες που τα επιφανειακά νερά στην Κρήτη είναι πολύ πιο περιορισμένα, δεν είναι απίθανο οι χελώνες να χρησιμοποιούσαν τα κανάλια απορροής ώστε να μετακινηθούν προς κάποιο πιο μεγάλο ποταμό. Έτσι, η μίξη των πληθυσμών ίσως να συνεχίστηκε και να εντάθηκε από την ύπαρξη των καναλιών απορροής λυμάτων. Ειδικά κατά τις περιόδους ξηρασίας που εμφανίστηκαν επανειλημμένα κατά το δέκατο έκτο και το δέκατο έβδομο αιώνα (Grove & Conterio, 1995; Grove, 1996; Rackham & Moody, 1997) είναι πολύ πιθανό οι μετακινήσεις αυτές να ήταν πολύ έντονες. Συγκεκριμένα, από το 1547 έως το 1645 υπήρξαν 12 χρόνια που δεν έβρεξε καθόλου όλο το χειμώνα και 22 χρόνια που δεν έβρεξε καθόλου όλη την άνοιξη (Grove & Conterio, 1995). Υπάρχουν αναφορές για το ότι το επιφανειακό νερό στην Κρήτη είχε σχεδόν εξαφανιστεί παντελώς και ότι ζώα, αλλά και άνθρωποι, πέθαιναν από τη δίψα (Grove & Conterio, 1995).

Άλλωστε, ακόμη και σήμερα, όπως στην περίπτωση του βιολογικού καθαρισμού της Πόμπιας αλλά και της κατασκευής άλλων τεχνητών υγροτόπων, παρατηρείται άμεση εποίκιση των υγροτόπων αυτών από χελώνες. Οι χελώνες φτάνουν εκεί είτε μέσω μικρών χειμάρρων οι οποίοι έχουν νερό μόνο το χειμώνα είτε μέσω της ξηράς.

Μέχρι τώρα, οι μελέτες που έχουμε στη διάθεση μας για την περιοχή του Αιγαίου συγκλίνουν στο ότι η πανιδική σύσταση της περιοχής έχει επηρεαστεί έντονα από τα γεωλογικά συμβάντα κατά το Μειόκαινο, το Πλειόκαινο και το Πλειστόκαινο (Hausdorf & Hennig, 2005). Η διαφοροποίηση των πληθυσμών πολλών ειδών είναι αποτέλεσμα βικαριανιστικών γεγονότων (χερσαία ισόποδα, Sfenthourakis, 1996; σαύρες, Roulakakis *et al.*, 2005a & b; χερσαία σαλιγκάρια, Parmakelis *et al.*, 2005; σκορπιοί, Parmakelis *et al.*, 2006a & b). Η περίπτωση του *M. rivulata* είναι λοιπόν αξιοσημείωτη καθώς για πρώτη φορά βλέπουμε ότι η διασπορά, και όχι ο βικαριανισμός είναι ο παράγοντας που καθόρισε το φυλογεωγραφικό πρότυπο του είδους. Το γεγονός ότι το φυλογεωγραφικό πρότυπο που αναδεικνύεται από τη μελέτη του *M. rivulata* δεν συμφωνεί με τα

φυλογεωγραφικά πρότυπα άλλων οργανισμών στην περιοχή του Αιγαίου (Sfenthourakis, 1996; Poulakakis *et al.*, 2005a & b; Parmakelis *et al.*, 2005; Parmakelis *et al.*, 2006a & b) δεν πρέπει να μας προκαλεί έκπληξη. Συνήθως, ιστορικοί, κλιματικοί και γεωλογικοί παράγοντες δεν επηρεάζουν με τον ίδιο τρόπο διαφορετικούς οργανισμούς, έστω κι αν αρχικά θα αναμέναμε κάτι τέτοιο. Αυτό εξαρτάται κυρίως από την οικολογία και την ηθολογία των οργανισμών αλλά συχνά είναι και απόρροια τυχαίων συγκυριών (Avisé, 2000).

#### 4.2.5 Επιπτώσεις στη διαχείριση πληθυσμών

Τα διαχειριστικά προγράμματα μέχρι πρόσφατα στηρίζονταν κυρίως σε μορφολογικά και οικολογικά δεδομένα, λόγω της απουσίας γενετικής πληροφορίας (Frankham *et al.* 2002). Η γνώση της γενετικής ποικιλότητας έχει μεγάλη σημασία για τη διαχείριση των ειδών (Funk & Fa, 2006). Η μείωση της γενετικής ποικιλότητας μειώνει δραστικά την πιθανότητα μακροχρόνιας επιβίωσης ενός πληθυσμού (Avisé, 1995; Kuo & Janzen, 2004).

Οι επιστήμονες, στην προσπάθειά τους να διασώσουν είδη που διατρέχουν κίνδυνο, αναζητούν μεθόδους που να μπορούν να διακρίνουν διαχειριστικές μονάδες (Funk & Fa, 2006).

Στη γενετική ανάλυση, η λογική πίσω από τον όρο «διαχειριστική μονάδα» (conservation/management unit) ή «εξελικτικώς σημαντική μονάδα» (evolutionary significant unit) είναι η εξής: κάθε πληθυσμός που ανταλλάσει τόσο λίγους μετανάστες με άλλους πληθυσμούς ώστε να είναι γενετικά διακριτός από αυτούς θα πρέπει να θεωρείται δημογραφικά ανεξάρτητος για το δεδομένο παρόντα χρόνο (Moritz, 1994; Avisé, 2000; Funk & Fa, 2006; Pearse *et al.*, 2006). Σύμφωνα με τον Ryder (1986), μια εξελικτικώς σημαντική μονάδα είναι μια ομάδα πληθυσμών με διακριτή εξελικτική ιστορία και η διαχείρισή της θα πρέπει να γίνεται ξεχωριστά.

Η κατανόηση της δομής των πληθυσμών είναι σημαντική για τον καθορισμό κατάλληλων μονάδων για τις διαχειριστικές πρακτικές (Moritz, 1999). Όταν η διαφοροποίηση των πληθυσμών είναι σχετικά πρόσφατη, για

να καθοριστούν οι διαχειριστικές μονάδες θα πρέπει να μελετηθούν μοριακοί δείκτες που να αναδεικνύουν γενετικές διαφορές σε μικρό βάθος χρόνου. Τέτοιοι είναι οι μικροδορυφορικοί δείκτες (Beheregaray, 2003; Kuo & Janzen, 2004). Οι διαχειριστικές μονάδες θα πρέπει να προσδιορίζονται με βάση σημαντικές αποκλίσεις σε αλληλικές συχνότητες ανεξάρτητα από το πόσο βαθιές είναι οι σχέσεις σε ένα γονιδιακό δέντρο (Avise, 2000).

Το είδος *M. rivulata* περιλαμβάνεται στον κόκκινο κατάλογο της IUCN ως «ελάχιστου ενδιαφέροντος» και αναφέρεται ότι δεν κινδυνεύει άμεσα με εξαφάνιση (Cox *et al.*, 2006). Όμως, πολύ σωστά δίνεται έμφαση στη διατήρηση και την προστασία των περιφερειακών και των νησιωτικών πληθυσμών του είδους, γεγονός που εν μέρει οφείλεται και σε δεδομένα της παρούσας μελέτης (Global Reptile Assessment Workshop, 2006). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των μικροδορυφορικών τόπων υποστηρίζουν την οδηγία αυτή, αφού πολλοί πληθυσμοί είναι γενετικά διακριτοί (Ιορδανία, Κύπρος, Δωδεκάνησα, Κρήτη, ηπειρωτική Ελλάδα, βλέπε εικόνες 3.10, 3.11, 3.12) παρόλο που χαρακτηρίζονται από «ρηχές» σχέσεις με βάση το mtDNA [φυλογεωγραφικό πρότυπο της κατηγορίας V κατά Avise (2000)].

Επίσης, γενετικά διαφοροποιημένοι φάνηκε να είναι και οι περιφερειακοί πληθυσμοί, όπως αυτός της Γαύδου. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη διαχειριστική προσοχή, αφού πρόκειται για έναν πολύ μικρό πληθυσμό (περίπου 50 άτομα) που παρουσιάζει γενετική και μορφολογική διαφοροποίηση (άτομα πολύ μικρότερα σε μέγεθος) από τους πληθυσμούς της Κρήτης (Μάντζιου, αδημοσίευτα δεδομένα). Κατά τους καλοκαιρινούς μήνες υπάρχει νερό μόνο στις πηγές σε δύο νερόλακκους με επιφάνεια λίγων τετραγωνικών μέτρων ο καθένας, όπου και εντοπίζεται ο πληθυσμός αυτός. Τα τελευταία χρόνια το νερό μειώνεται όλο και πιο πολύ κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, λόγω δέσμευσής του από τους κατοίκους του νησιού. Ο πληθυσμός αυτός παρουσιάζει πολύ χαμηλή τιμή παρατηρούμενης και αναμενόμενης ετεροζυγωτίας. Επίσης, από τις αναλύσεις φάνηκε ότι παρουσιάζει έλλειμμα ετεροζυγωτίας το οποίο μπορεί να οφείλεται σε ύπαρξη μηδενικών αλληλομόρφων και πιθανά και σε



ομομιξία μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού. Η κατάσταση μπορεί να είναι ακόμη πιο κρίσιμη από αυτή που κατάφεραν να αναδείξουν οι αναλύσεις μας. Τα ζώα αυτά ζουν πολλά χρόνια (περίπου 30, Meek, 1987; Foufopoulos & Ives, 1999) και ο πληθυσμός τους πρέπει να έχει μειωθεί τα τελευταία 10 - 20 χρόνια που το νησί έχει αρχίσει να αναπτύσσεται τουριστικά και δεσμεύεται το μεγαλύτερο μέρος των τρεχούμενων επιφανειακών νερών. Έχει παρατηρηθεί ότι σε μακρόβια είδη οι μοριακές αναλύσεις πολλές φορές αποτυγχάνουν να αναγνωρίσουν την κρίση από την οποία περνάνε οι πληθυσμοί, όταν η μείωση των πληθυσμών (αν και δραματική) έχει συμβεί τα τελευταία 30-50 χρόνια (Lipre *et al.*, 2006). Αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι οι αναλύσεις βασίστηκαν κυρίως σε ενήλικα άτομα, τα οποία αντικατοπτρίζουν τη γενετική ποικιλότητα πριν από τη μείωση (Lipre *et al.*, 2006). Η μακροζωία και η σταδιακή μείωση των πληθυσμών μπορεί να συγκαλύψουν τον αυξανόμενο ρυθμό γενετικής παρέκκλισης που εντοπίζεται σε μικρούς πληθυσμούς (Kuo & Janzen 2004), γι' αυτό χρειάζεται παρακολούθηση ώστε να ελέγχεται η εξέλιξη της γενετικής ποικιλότητας σε μακρόβια είδη. Η απώλεια της γενετικής ποικιλότητας μειώνει την ικανότητα των πληθυσμών να αντεπεξέρχονται σε περιβαλλοντικές αλλαγές (Frankham *et al.* 2002).

Προσέγγιση των αποτελεσμάτων που θα καταλήγει στο συμπέρασμα ότι οι πληθυσμοί του *M. rivulata* δεν χρήζουν διαχείρισης θα ήταν παραπλανητική και σε κάποιες περιπτώσεις καταστροφική και μη αναστρέψιμη. Άλλωστε, έχουν ήδη παρατηρηθεί εξαφανίσεις τοπικών πληθυσμών στον ελλαδικό χώρο (Μάντζιου, 2000; Rifai & Mantziou, 2005; Global Reptile Assessment Workshop, 2006). Ιδιαίτερα οι νησιωτικοί πληθυσμοί είναι οι πιο ευαίσθητοι, αφού τα επιφανειακά νερά των νησιών είναι περιορισμένα. Η κατάσταση στους υγρότοπους της Κρήτης είναι κρίσιμη, αν αναλογιστούμε ότι εκτός των πρόσφατα κατασκευασμένων τεχνητών υγροτόπων, η Κρήτη χαρακτηρίζεται από ποτάμια διαλείπουσας ροής (Μυλωνάς, 2003). Η εμφάνιση του νερού στην κοίτη τους ακολουθεί περιοδικό ρυθμό. Κυρίαρχη λοιπόν θέση στο υδάτινο σύστημα της Κρήτης

κατέχουν οι χειμάρροι που το καλοκαίρι αποξηραίνονται (Βορεάδου, 1993; Δρετάκης, 1996). Είναι συνηθισμένο φαινόμενο κατά μήκος της κοίτης ενός ποταμού, ένα ή περισσότερα τμήματά του να εμφανίζουν χαρακτηριστικά του χειμάρρου ενώ άλλα να εμφανίζουν χαρακτηριστικά ποταμού μόνιμης ροής. Οι εκβολές πολλών χειμάρρων στην Κρήτη διατηρούν σημαντικές ποσότητες νερού καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου με αποτέλεσμα να δημιουργούνται σημαντικά εκβολικά τέλματα (Δρετάκης, 1996). Εκεί βρίσκουν καταφύγιο πληθυσμοί του *Mauremys rivulata* αλλά και πολλά είδη ορνιθοπανίδας (Δρετάκης, 1996; Μάντζιου, 2000). Τα εκβολικά αυτά συστήματα χρήζουν διαχείρισης όσο μικρά και ασήμαντα και αν φαίνονται στο μη ειδικό (Οικονομίδου & συνεργάτες, 1988; Malakou & Catsadorakis, 1992; Δρετάκης, 1996; Μυλωνάς, 2003).

Οι πληθυσμοί σε ηπειρωτικά τμήματα της χώρας μπορεί να είναι πυκνοί και υγιείς, αλλά πρέπει να δοθεί ξεχωριστή σημασία στη διατήρηση των μικρών νησιωτικών υγροτόπων, ώστε να αποφευχθεί η απώλεια της γενετικής ποικιλότητας και η μείωση του μεγέθους σε αυτούς τους ήδη ευαίσθητους πληθυσμούς. Οι τεχνητοί υγρότοποι είναι ζωτικής σημασίας ειδικά για τους νησιωτικούς πληθυσμούς. Άλλωστε, όπως είδαμε, οι πληθυσμοί των τεχνητών υγροτόπων δεν παρουσιάζουν μειωμένη γενετική ποικιλότητα σε σχέση με πληθυσμούς σε φυσικούς υγρότοπους. Η μελέτη αυτή μας προσφέρει πολύτιμα στοιχεία για τη σωστή επιλογή ατόμων για εισαγωγή του είδους *M. rivulata* σε νέους τεχνητούς υγρότοπους. Στους τεχνητούς υγροτόπους, όμως, συνήθως υπάρχει μειωμένη ποικιλότητα ενδιαιτημάτων για πολλά είδη που ζουν εντός τους ή στην παράκτια ζώνη (Δημαλέξης, 2004). Στα διαχειριστικά σχέδια τεχνητών υγροτόπων ή αναβάθμισης φυσικών υγροτόπων θα πρέπει να περιλαμβάνονται δράσεις που θα διασφαλίζουν τη διατήρηση των πληθυσμών του είδους *M. rivulata*. Τέτοιες δράσεις είναι η κατασκευή νησίδων όπου τα ζώα θα λιάζονται χωρίς παρενόχληση, η διαμόρφωση της όχθης ώστε τα ζώα να μπορούν να εξέρχονται προς τις περιοχές ωοαπόθεσης, η διατήρηση γύρω από τους υγροτόπους χώρων κατάλληλων για ωοαπόθεση και η διαμόρφωση κατάλληλης παράκτιας

υγροτοπικής ζώνης, όπου θα βρίσκουν καταφύγιο οι νεοσσοί (Δρετάκης *et al.*, 2003; Δημαλέξης, 2004). Οποιοδήποτε διαχειριστικό σχέδιο θα πρέπει να διασφαλίζει τη μακροχρόνια επιβίωση των διαχειριστικών μονάδων.

**BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

**Aguirre, A.A., Gardner, S.C., Marsh, J.C., Delgado, S.G., Limpus, C.J., Nichols, W.J., 2006.** Hazards Associated with the Consumption of Sea Turtle Meat and Eggs: A Review for Health Care Workers and the General Public EcoHealth, DOI: 10.1007/s10393-006-0032-x.

**Anastasakis, G.C., Dermitzakis, M., 1990.** Post-Middle-Miocene paleogeographic evolution of the Central Aegean Sea and detailed Quaternary reconstruction of the region Its possible influence on the distribution of the Quaternary mammals of the Cyclades Islands. N. jb. Geol. Palaeont. Mh., H.1: 1-16.

**Arnold, E.N., Burton, J.A., 1985.** A field Guide to the Reptiles and Amphibians of Britain and Europe. Collins, Grafton Street, London, pp. 272.

**Avise, J.C., 1994.** Molecular Markers. Natural History and Evolution. Chapman & Hall, New York. .

**Avise, J.C., 1995.** Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. Conserv. Biol., 9: 686-690.

**Avise, J.C., 2000.** Phylogeography. The History and Formation of Species. Harvard University Press.

**Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987.** Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst., 18:489-522.

**Avise, J.C., Bowen, B.W., Lamb, T., Meylan, A.B., Bermingham, E., 1992.** Mitochondrial DNA Evolution at a Turtle's Pace: Evidence for Low Genetic Variability and Reduced Microevolutionary Rate in the Testudines. Mol. Biol. Evol., 9(3): 457-473.

**Balloux, F., Lugon-Moulin, N., 2002.** The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology, 11: 155-165.

**Barome, P.O., Lymberakis, P., Monnerot, M., Gatung, J.C., 2001.** Cytochrome *b* Sequences reveal *Acomys minous* (Roddentina, Muridae) paraphyly and answer the question about the ancestral karyotype of *Acomys dimidiatus*. *Mol. Phyl. Evol.*, 18(1): 37-46.

**Barth, D., Bernhard, D., Fritzschn G., Fritz, U., 2004.** The freshwater turtle genus

*Mauremys* - a textbook example of an east-west disjunction or a taxonomic misconception? *Zoologica Scripta*, 33:v213-221.

**Barth, D., Bernhard, D., Guicking, D., Stock, M., Fritz, U., 2003.** Is *Chinemys megalcephala* Fang, 1934 a valid species? New insights based on mitochondrial DNA sequence data. *Salamandra*, 38: 233-244.

**Barzilay, S., 1980.** Aggressive behavior in the wood turtle, *Clemmys insculpta*. *J. Herpet.* 14(1):89-91.

**Βασιλάκης, Α.Θ., 2000.** Οι 147 πόλεις της Αρχαίας Κρήτης. Εκδόσεις Καίρατος, Ηράκλειο Κρήτης.

**Beerli, P., Hotz, H., Uzzell, T., 1996.** Geologically dated sea barriers calibrate a protein clock for Aegean water frogs. *Evolution*, 50(4): 1676-1687.

**Beheregaray, L.B., Ciofi, C., Caccone, A., Gibbs, J.P., Powell, J.R., 2003.** Genetic divergence, phylogeography and conservation units of giant tortoises from Santa Cruz and Pinzon, Galapagos Islands. *Conservation Genetics*, 4: 31-46.

**Belkhir, K., Borsa, P., Goudet, J., Chikli, L., Bonhomme, F., 2000.** GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la genetique des populations, version 4.01. University of Montpellier II, Montpellier, p. 957.

**Benzecri, J., 1973.** L' Analyse des Donnees: T.2, L' analyse des correspondances. Paris: Dunod. .

**Βενιζέλου, Α.Ε., 1990.** Αρχαιολογία, 35:63.

**Bergounioux, F.M., 1955.** Chelonia In: Piveteau J. (Ed.), *Traite de paleontologie* 5: 487- 544.

**Bickham, J.W., 1975.** A cytosystematic study of turtles in the genera *Clemmys*, *Mauremys* and *Sacalia*. *Herpetologica*, 31:198-204.

**Bickham, J.W., 1981.** Two-Hundred-Million-Year-Old Chromosomes: Deceleration of the rate of karyotypic Evolution in Turtles. *Science*, 212: 1291-1293.

**Bickham, J.W., 1984.** Patterns and modes of chromosomal evolution in reptiles. In: *Chromosome evolution in eucaryotic groups* (Sharma A.K. & Sharma A, eds.). CRC, New York. pp. 13-40.

**Bodie, J.R. & Semlitsch, R.D., 2000.** Spatial and temporal use of foodplain habitats by lentic and lotic species of aquatic turtles. *Oecologia*, 122:138-146.

**Bonhomme, F., Salvidio, S., Lebeau, A., Pasteur, G., 1987.** Comparaison genetique des tortues vertes (*Chelonia mydas*) des oceans Atlantique, Indien et Pacifique. *Genetica*, 74: 89-94.

**Bonnefont, J.Cl., 1972.** La Crete. Etude Morphologique. Ph.D. Thesis, L' Universite de Paris IV. .

**Βορεάδου, Α., 1993.** Επιπτώσεις των υγρών αποβλήτων των Ελαιουργείων στα Οικοσυστήματα των τρεχούμενων νερών της Κρήτης. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

**Bowcock, A.M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J.R., Cavalli-Sforza, L.L., 1994.** High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368: 455-457.

**Bowen, B.W., Abreu-Grobois F.A., Balazs, G.H., Kamezaki, N., Limpusi, C.J., Ferl, R.J., 1995.** Trans-Pacific migrations of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) demonstrated with mitochondrial DNA markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 3731-3734.

**Bowen, B.W., Bass, A.L., Soares, L., Toonen, R.J., 2005.** Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Molecular Ecology*, 14: 2389-2402.

**Bramble, D.M., 1974.** Emydid shell kinesis: Biomechanics and evolution. *Copeia*, 1974: 707-727.

**Bray, J.R., Curtis, J.T., 1957.** An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.*, 27: 325-349.

- Briggs, J.C., 1974.** Marine Zoogeography. New York: McGraw-Hill. .
- Broin, F., de, 1977.** Contribution a l'etude des cheloniens continentaux de Cretace et du Tertiaire de France. Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle, 38: 1-366.
- Brown, G.P., Brooks, R.J., 1991.** Thermal and behavioral responses to feeding in free-ranging turtles, *Chelydra serpentina*. J. Herpet. 25(3):273-278.
- Bull, J.J., Huelsenbeck, J.P., Cunningham, C.W., Swofford, D.L., Waddell, P.J., 1993.** Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. Systematic Biology, 42: 384-397.
- Busack, S.D., Ernst, C.H., 1980.** Variation in Mediterranean populations of *Mauremys* (Gray, 1869) (Reptilia: Testudines: Emydidae). Ann. Carnegie Mus. Hist. , 49(17):251-264.
- Caccone, A., Amato, G., Gratry, O.C., Behler, J., Powell, J.R., 1999.** A molecular phylogeny of four endangered Madagascar tortoises based on mtDNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, 12: 1-9.
- Carr, A.F., 1952.** Handbook of turtles. The turtles of the United States, Canada, and Baja California. Ithaca, NY: Cornell University Press. .
- Carr, J.L., Bickham, J.W., 1986.** Phylogenetic implications of karyotype variation in the Batagurinae (Testudines: Emydidae). Genetica, 70: 89-106.
- Carranza, S., Arnold, E.N., 2003.** Investigating the origin of transoceanic distributions: mtDNA shows *Mabuya* lizards (Reptilia, Scincidae) crossed the Atlantic twice. Systematics and Biodiversity, 1(2): 275-282.
- Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A., 1967.** Phylogenetic analysis models and estimation procedures. American Journal of Human Genetics, 19: 233-257.
- Ciofi, C., Milinkovitch, M.C., Gibbs, P., Caccone, A., Powell, J.R., 2002.** Microsatellite analysis of genetic divergence among populations of giant Galapagos tortoises. Molecular Ecology, 11: 2265-2283.
- Clark, R., 1996.** Some notes on the reptile fauna of Fournoi, Ikaria, and Schoinoussa, Aegean Sea, Greece. Br. herpet. Soc. Bull. 56:35-39.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology, 9(10): 1657-1660.

**Collins, T.M., Kraus, F., Estabrook, G., 1994.** Compositional effects and weighting of nucleotide sequences for phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 43: 449-459.

**Cox, N., Chanson, J., Stuart, S., (compilers), 2006.** The Status and Distribution of Reptiles and Amphibians of the Mediterranean Basin. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. .

**Cramp, A., O'Sullivan, G., 1999.** Neogene sapropels in the Mediterranean: a review. *Marine Geology*, 153: 11 - 28.

**Creutzburg, N., 1963.** The paleogeographic evolution of Kriti island since Miocene (in greek). *Kritika Chronika*, 15: 336-342.

**Croizat, L., Nelson, G., Rosen, D.E., 1974.** Centers of origin and related concepts. *Systematic Zoology*, 23: 265-287.

**Cunningham, J., Baard, E.H.W., Harley, E.H., O'Ryan, C., 2002.** Investigation of genetic diversity in fragmented geometric tortoise (*Psammobates geometricus*) populations. *Conservation Genetics*, 3: 215-223.

**Daams, R., Van de Weerd, A., 1980.** Early Pliocene small mammals from the Aegean Island of Karpathos (Greece) and their Paleogeographic Significance. *Geologie en Mijnbouw*, 59(4): 327-331.

**Dallman, P.R., 1988.** Plant life in the world's Mediterranean climates. Oxford University Press.

**de Queiroz, A., 2005.** The resurrection of oceanic dispersal in historical biogeography. *Trends in Ecology and Evolution*, 20: 51-76.

**Denny, P., 1997.** Implementation of constructed wetlands in developing countries. *Water Science and Technology*, 35(5): 27-34.

**Dermitzakis, M.D., 1989.** The colonisation of Aegean islands in relation with the paleogeographic evolution. *Biologia Gallo-Hellenica* 14: 99-121.

**Dermitzakis, M.D., 1990.** The colonisation of Aegean islands in relation with the paleogeographic evolution. Part II. *Biologia Gallo-Hellenica* 17: 99-130.



**Dermitzakis, M.D., DeVos, J., 1987.** Faunal Succession and the Evolution of Mammals in Crete during the Pleistocene. *N. jb. Geol. Palaeont. Mh.*, 173(3): 377-408.

**Dermitzakis, M.D., Papanikolaou, D.J., 1981.** Paleogeography and geodynamics of the Aegean region during the Neogene. *Proceedings of the VIIth International Congress on Mediterranean Neogene*, 4: 245-289.

**Dermitzakis, M.D., Sondaar, P.Y., 1985.** Quaternary insular fossil mammals and their paleogeographical implications. *Biologia Gallo-Hellenica*, 10: 369-386.

**Δημαλέξης, Α. (συντάκτης), 2004.** Γενικές Κατευθύνσεις Διαχείρισης Υδατοσυλλογών για την Επίτευξη Πολλαπλών Λειτουργιών με Έμφαση στην Υποστήριξη της Βιοποικιλότητας. Έκθεση στα πλαίσια του προγράμματος Life (LIFE00ENV/GR/000685) με τίτλο: "Μεσογειακοί Υγρότοποι και Λιμνοδεξαμενές: Επίδειξη Πολυλειτουργικής Διαχείρισης στο Νησί της Κρήτης". <http://www.nhmc.uoc.gr/wetlands/News/Greek/Newssetgr.htm>

**Dorak, T., 2006.** Basic Population Genetics. <http://www.dorak.info/genetics/popgen.html>.

**Δρετάκης, Μ., 1996.** Τα υδρόβια και παρυδάτια πουλιά σε τέσσερις υγροτόπους της Κρήτης. Πληθυσμιακά και οικολογικά στοιχεία. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

**Δρετάκης, Μ., Σημαιάκης, Σ., Μάντζιου, Γ., Πρινιωτάκης, Ν., Αβραμάκης, Μ., Νικολακάκης, Μ. (συντάκτες), 2003.** Υγρότοποι Κρήτης. Παρακολούθηση πληθυσμών απειλούμενων ειδών χλωρίδας και πανίδας με έμφαση στην ορνιθοπανίδα. Αποτύπωση σε γεωγραφικό σύστημα πληροφοριών των σημαντικότερων ενδιατημάτων και των απειλών που αντιμετωπίζουν. Πρώτη Ενδιάμεση Αναφορά, Μουσείο Φυσικής Ιστορίας Κρήτης. ΥΠΕΧΩΔΕ, Πρόγραμμα Προστασίας Περιβάλλοντος και Βιώσιμης Ανάπτυξης.

**Δρετάκης, Μ., Δημαλέξης, Τ., Φουρναράκη, Χ. (συντάκτες), 2004.** Οικολογική αποτίμηση των τεχνητών υδατοσυλλογών της Κρήτης. Έκθεση στα πλαίσια του προγράμματος Life (LIFE00ENV/GR/000685) με τίτλο:

"Μεσογειακοί Υγρότοποι και Λιμνοδεξαμενές: Επίδειξη Πολυλειτουργικής Διαχείρισης στο Νησί της Κρήτης".

**Encalada, S.E., Lahanas, P.N., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B, Miyamoto, M.M., Bowen, B.W., 1996.** Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. *Mol. Ecol.*, 5: 473–484.

**Engelmann, W.E., Fritzsche, J., Gunther, R., Obst, F.J., 1993.** Lurche und Kriechtiere Europas. Neumann Verlag Radebeul, pp.440.

**Ernst, C.H., Barbour R.W., 1989.** Turtles of the World. Smithsonian Institution Press, Washington DC.

**Ernst, C.H., Hershey, M.F. & Barbour, R.W., 1974.** A new coding system for hard-shelled turtles. *Trans. Kentucky Acad. Sci.* 35(1-2):27-28.

**Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2003.** Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567-1587.

**Farris, J.S., Kaellersjo, M., Kluge, A.G., Bults C., 1995.** Testing significance of incongruence. *Cladistics*, 10: 315-319.

**Feldman, C.R., Parham, J.F., 2004.** Molecular Systematics of the Old World Stripe - Necked Turtles (Testudines: *Mauremys*). *Asiatic Herpetological Research*, 10:28-37.

**Felsenstein, J., 1981.** Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, 17: 368-376.

**Felsenstein, J., 1988.** Phylogenies and Quantitative Characters. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 19: 445-471.

**Felsenstein, J., 2004.** Inferring Phylogenies. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. .

**FitzSimmons, N.N., Moritz, C., Moore, S.S., 1995.** Conservation and Dynamics of Microsatellite Loci over 300 Million Years of Marine Turtle Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 12(3): 432-440.

**Foufopoulos, J., Ives, A.R., 1999.** Reptile Extinctions on Land- Bridge Islands: Life- History Attributes and Vulnerability to Extinction The American Naturalist, 153(1):1-25.

**Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., 2002.** Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, New York. .

**Fritz, U., 2001.** *Mauremys* Gray, 1870 – Bachschildkroeten. In: Fritz, U. (ed.): Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Schildkroeten (Testudines) I. pp. 35-41.

**Fritz, U., Barata, M., Busack, S. D., Fritsch, G., Castilho, R., 2006.** Impact of mountain chains, sea straits and peripheral populations on genetic and taxonomic structure of a freshwater turtle, *Mauremys leprosa* (Reptilia, Testudines, Geoemydidae). Zoologica Scripta, 35(1): 97-108.

**Fritz, U., Fritsch, G., Lehr, E., Ducotterd, J-M., Muller, A., 2005.** The Atlas Mountains, not the Strait of Gibraltar, as biogeographic barrier for *Mauremys leprosa* (Reptilia: Testudines). Salamandra, 41(3): 97-106.

**Fritz, U., Wischuf, T., 1997.** Zur Systematik westasiatisch-sudosteuropaischer Bachschildkroeten (Gattung *Mauremys*) (Reptilia: Testudines: Bataguridae). -On the taxonomy of stripe-necked terrapins (genus *Mauremys*) in southeast Europe and west Asia (Reptilia: Testudines: Bataguridae). Zool. Abh. Mus. Tierk., Dresden, 49(13):223-260.

**Funk, S.M., Fa, J.E., 2006.** Phylogeography of the endemic St. Lucia whiptail lizard *Cnemidophorus vanzoi*: Conservation genetics at the species boundary. Conservation Genetics, 7: 651-663.

**Futuyma, D.J., 1991.** Εξελικτική Βιολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

**Gaffney, E.S., Meylan, P.A., 1988.** A phylogeny of turtles. In: Benton, M.J. (Ed.) The Phylogeny and Classification of Tetrapods. Clarendon Press, Oxford, England, 157-219.

**Gasith, A., Sidis, I., 1983.** The distribution and nature of the habitat of the Caspian terrapin *Mauremys caspica rivulata* (Testudines: Emydinae) in Israel. Israel J. Zool., Jerusalem, 32:91-102.

**Gasith, A., Sidis, I., 1985.** Sexual activity in the terrapin, *Mauremys caspica rivulata*, in Israel, in relation to the testicula cycle and climatic factors. *J. Herpet.* 19(2):254-260.

**Gasperetti, J., Stimson, A.F., Miller, J.D., Ross, J.P., Gasperetti, P.R., 1993.** Turtles of Saudi Arabia. *Fauna Saudi Arabia*, 13: 170-367.

**Gatesy, J., Hayashi, C., DeSalle, R., Vrba, E., 1994.** Rate limits for mispairing and compensatory change: the mitochondrial ribosomal DNA of antelopes. *Evolution*, 48: 188-196.

**Geraga, M., Tsaila-Monopolis, S., Ioakim, C., Papatheodorou, G., Ferentinos, G., 2005.** Short-term climatic changes in the southern Aegean Sea over the last 48,000 years. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 220: 311 - 332.

**Global Reptile Assessment Workshop, 2006.** Ag. Pelagia, Crete. "Draft Red List Assessment" currently being compiled in consultation with the IUCN/ SSC TFTSG. .

**Goldman, N., 1993.** Simple diagnostic statistical tests of models of DNA substitution. *J. Mol. Evol.*, 37: 650-651.

**Goldstein, D.B., Pollock, D.D., 1997.** Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *J. Hered.*, 88: 335-342.

**Goldstein, D.B., Ruiz Linares, A., Cavalli-Sforza, L.L., Feldman, M.W., 1995.** An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, 139: 463-471.

**Goossens B., Chikhi, L., Jalil, M., 2005.** Patterns of genetic diversity and migration in increasingly fragmented and declining orang-utan (*Pongo pygmaeus*) populations from Sabah, Malaysia. *Molecular Ecology*, 14: 441-456.

**Graur, D., Li, W-H., 2000.** *Fundamentals of Molecular Evolution.* Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. .

**Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M., 1999.** *An Introduction to Genetic Analysis.* Seventh Edition. W. H. Freeman, New York. .

**Grove, A.T., 1996.** The Historical Context: Before 1850. In: Mediterranean Desertification and Land Use. (CJ Brandt & JB Thornes, eds.). John Wiley & Sons. .

**Grove, J.M., Conterio, A., 1995.** The climate of Crete in the sixteenth and seventeenth centuries. *Climatic Change*, 30: 223-247.

**Hagelberg, E., 1994.** Mitochondrial DNA from Ancient Bones. In: Ancient DNA. B. Hermann & S. Hummel (eds. ). NY Springer-Verlag, 195-204.

**Hamilton, M.B., Pincus, E.L., Di Fiore, A., Fleischer, R.C., 1999.** Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques*, 27: 500-507.

**Hartl, D.L., 1988.** A Primer of Population Genetics. Second Edition. Sinauer Associates. .

**Hartl, D.L., 2000.** A Primer of Population Genetics. Third Edition. Sinauer Associates. .

**Hartl, D.L., Clark, A.G., 1997.** Principles of Population Genetics. Third Edition. Sinauer Associates. .

**Hartl, D.L., Jones, E.W., 1998.** Genetics: Principles and Analysis. Fourth Edition. Jones and Bartlett Publishers. .

**Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T., 1985.** Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 22: 160-174.

**Hausdorf, B., Hennig, C., 2005.** The influence of recent geography, palaeogeography and climate on the composition of the fauna of the central Aegean Islands. *Biological Journal of the Linnean Society*, 84: 785-795.

**Hausdorf, B., Hennig, C., 2005.** The influence of recent geography, palaeogeography and climate on the composition of the fauna of the central Aegean Islands. *Biological Journal of the Linnean Society*, 84: 785-795.

**Hauswaldt, J.S., Glenn, T.C., 2003.** Microsatellite DNA loci from the Diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*). *Molecular Ecology Notes*, 3: 174-176.

**Hauswaldt, J.S., Glenn, T.C., 2005.** Population genetics of the diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*). *Molecular Ecology*, 14: 723-732.

**Highfield, A.C., 1996.** An Introduction to the *Mauremys* turtles of the Mediterranean. *Reptile and Amphibian Magazine*, (Jan/Feb):22-26.

**Hillis, D.M., Huelsenbeck, J.P., 1992.** Signal, Noise, and Reliability in Molecular Phylogenetic Analyses. *Journal of Heredity*, 83: 189-195.

**Hillis, D.M., Mable, B.K., Moritz, C., 1996.** Applications of molecular systematics: The state of the field and a look to the future. In: *Molecular Systematics* (DM Hillis, C Moritz & BK Mable, eds.), Sinauer, Sunderland, MA. pp. 515-543.

**Hillis, D.M., Wiens, J.J., 2000.** Molecules versus morphology in systematics: Conflicts, Artifacts, and Misconceptions. In: *Phylogenetic Analysis of Morphological Data* (ed. J.J. Wiens). Smithsonian Institution Press.

**Hirayama, R., 1984.** Cladistic analysis of batagurine turtles (Batagurinae: Emydidae: Testudinoidea): A preliminary result. *Studia Geologica Salmanticensia*, Vol. Especial 1. *Studia Palaeocheloniologica*. 1:141-157.

**Hoarau, G., Boon, E., Jongma, D.N., Ferber, S. Palsson, J., Van der Veer, H.W., Rijnsdorp, A.D., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2005.** Low effective population size and evidence for inbreeding in an overexploited flatfish, plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Proc. R. Soc. B*, 272: 497-503.

**Holmes, D.S., Bonner, J., 1973.** Preparation, molecular- weight, base composition and secondary structure of giant nuclear ribonucleic acid. *Biochemistry*, 12 (12): 2330-2338.

**Honda, M., Yasukawa, Y., Hirayama, R., Ota, H., 2002.** Phylogenetic relationships of the Asian box turtles of the genus *Cuora sensu lato* (Reptilia: Bataguridae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Zool. Sci.*, 19, 1305-1312.

**Honda, M., Yasukawa, Y., Ota, H., 2002.** Phylogeny of the Eurasian freshwater turtles of the genus *Mauremys* Gray 1869 (Testudines), with special

reference to a close affinity of *Mauremys japonica* with *Chinemys reevesii*. J. Zool. Syst. Evol. Res., 40: 195–200.

**Hsu, K.J., 1972.** Origin of saline giants: a critical review after the discovery of the Mediterranean evaporates. Earth-Sci. Rev., 8: 371-396.

**Hsu, K.J., Montadert, L., Bernoulli, D., Cita, M.B., Erickson, A., Garrison, R.E., Kidd, R.B., Melieres, F., C., 1977.** History of the Mediterranean salinity crisis. Nature, 267: 399-403.

**Huelsenbeck, J.P., 1991.** Tree-length distribution skewness: an indicator of phylogenetic information. Systematic Zoology, 40(3): 257-270.

**Hurst, G.D.D., Jiggins, F.M., 2005.** Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. Proc. R. Soc. B, 272: 1525–1534.

**Hynes, H.B.N., 1960.** The Biology of Polluted Waters. Liverpool University Press, Cambridge. .

**Hynes, H.B.N., 1964.** The use of biology in the study of water pollution. Chemistry and Industry, 435-446.

**Irwin, D.M., Kocher, T.D., Wilson, A.C., 1991.** Evolution of the cytochrome b gene of Mammals. J.Mol.Evol., 32: 128-144.

**Iverson, J.B., 1992.** A Revised Checklist with Distribution Maps of the Turtles of the World. Earlham College. Green Nature Books. Florida, USA pp363.

**Iverson, J.B., McCord, W.P., 1994.** Variation in East Asian turtles of the genus *Mauremys* (Bataguridae; Testudines). Journal of Herpetology, 28(2):178-187.

**Janzen, F.J., Paukstis, G.L., Brodie, E.D., 1992.** Observations on basking behavior of hutchling turtles in the wild. J. Herpet., 26(2): 217-219.

**Jarne, P., Lagoda, P.J., 1996.** Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends Ecol. Evol., 11: 424–429.

**Jayakar, S.D., Loeschcke, V., De Jong, G., 1984.** Models in Population Genetics. In: "Population Biology and Evolution" (K. Woehrmann & V. Loeschcke, eds.). Springer-Verlag. .

**Kallel, N., Duplessy, J.-C., Labeyrie, L., Fontugne, M., Paterne, M., Montacer, M., 2000.** Mediterranean pluvial periods and sapropel formation over the last 200000 years. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 157: 45 - 58.

**Κασσιδης, Π., 2001.** Μελέτη της Φυλογεωγραφίας του *Mediodactylus kotschyi* (Sauria: Gekkonidae) στο αρχιπέλαγος του Αιγαίου και τις γειτονικές περιοχές. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας.

**Kaufmann, J.H., 1992.** Habitat use by wood turtles in Central Pennsylvania. *J. Herpet.* 26(3):315-321.

**Keller, C., Busack, S.D., 2001.** *Mauremys leprosa* (Schweigger, 1812) - Maurische Bachschildkroete. In: Fritz, U. (ed.): *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Schildkroeten (Testudines) I.* pp. 57-88.

**Kijas, J.M.H., Fowler, J.C.S., Garbett, C.A., Thomas, M.R., 1994.** Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *BioTechniques*, 16: 656-662.

**Kimura, M., 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111-120.

**Kimura, M., Crow, J.F., 1964.** The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49: 725-738.

**King, T.L., Julian, S.E., 2004.** Conservation of microsatellite DNA flanking sequence across 13 Emydid genera assayed with novel bog turtle (*Glyptemys muhlenbergii*) loci. *Conservation Genetics*, 5: 719-725.

**Kluge, A.G., 1983.** Cladistics and the classification of the great apes. In: "New Interpretations of Ape and Human Ancestry" (RL Ciochan & RS Corruccini, eds.), New York: Plenum. .

**Kluge, A.G., 1989.** A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among Epicrates (Boidae, Serpentes). *Systematic Zoology*, 38: 7-25.



**Knowles, L.L., 2004.** The burgeoning field of statistical phylogeography. *J. Evol. Biol.*, 17: 1-10.

**Knowles, L.L., Maddison, W.P., 2002.** Statistical phylogeography. *Mol. Ecol.*, 11: 2623-2635.

**Kohne, D.E., 1970.** Evolution of higher organism DNA. *Q. Rev. Biophys.*, 33: 327-375.

**Kotsakis, T., 1980.** Revision des tortues (Emydidae, Testudinidae, Trionychidae) du Plio-Pleistocene de Valdarno superieur (Toscane, Italie). *Quaternaria*, 22: 11-37.

**Kovalak, W.P., 1981.** Assessment and prediction of impacts of effluents on communities of benthic stream macroinvertebrates. In: Bates JM, Weber CI (eds). *Ecological Assessments of Effluent Impacts on Communities of Indigenous Aquatic Organisms*, pp.255-63. American Society for Testing and Materials. Philadelphia. .

**Krebs, C.J., 1999.** *Ecological Methodology (Second Edition)*. Addison, Wesley, Longman, Inc.

**Krebs, C.J., 2002.** *Programs for ecological methodology*, 2nd edition. Version 6.1.

**Kreemer, C., Chamot-Rooke, N., 2004.** Contemporary kinematics of the southern Aegean and the Mediterranean Ridge. *Geophys. J. Int.*, 157: 1377-1392.

**Krijgsman, W., 2002.** The Mediterranean: Mare Nostrum of Earth sciences. *Earth and Planetary Science Letters*, 205: 1-12.

**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: 652-655.

**Krom, M.D., Stanley, J.D., Cliff, R.A., Woodward, J.C., 2002.** Nile River sediment fluctuations over the past 7000 yr and their key role in sapropel development. *Geology*, 30: 71 - 74.

**Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M., 2001.** MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics*, 17: 1244-1245.

**Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 1993.** MEGA: Molecular Evolutionary Genetic Analysis, version 1.01. The Pennsylvania State University, University Park. .

**Kuo C-H, Janzen, F.J., 2004.** Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural population of ornate box turtles (*Terrapene ornata*). *Conservation Genetics*, 5: 425-437.

**Kuss, S.E., 1975.** Hippopotamus *Creutzburgi parvus* n.spp., ein pleistozaenes Zwergflusspferd von der Insel Kreta. *Ber. Naturf. Ges. Freiburg i. Br.*, 65: 5-23.

**Ladoukakis, E.D., Zouros, E., 2001a.** Recombination in Animal Mitochondrial DNA: Evidence from Published Sequences *Mol. Biol. Evol.* 18(11):2127-2131.

**Ladoukakis, E.D., Zouros, E., 2001b.** Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.*, 18: 1168-1175.

**Laird, C.D., McConaughy, B.L., McCarthy, B.J., 1969.** Rate of fixation of nucleotide substitution in evolution. *Nature*, 224: 149-154.

**Lamb, T. & Lydeard, C., 1994.** A molecular phylogeny of the gopher tortoises, with comments on familial relationships within Testudinoidea. *Molec. Phylogenet. Evol.* , 3(4): 283-291.

**Lamb, T., Osentoski, M.F., 1997.** On the paraphyly of *Malaclemys*: A molecular genetic assessment. *J. Herpet.* 31(2):258-265.

**Lamb, T., Lydeard, C., Walker, R.B., Gibbons, J.W., 1994.** Molecular Systematics of Map Turtles (*Graptemys*): A comparison of mitochondrial restriction site versus sequence data. *Syst. Biol.*, 43(4): 543- 559.

**Langella, O., 1999.** Populations, version 1.2.28. CNRS UPR9034. Universite de Montpellier II, Montpellier, France. .

**Lapparent de Broin, F. de, 2001.** The European turtle fauna from the Triassic to the present. *Dumerilia*, 4(3):155-217.

**Lapparent de Broin, F. de, Dijk, P. P. van, 1999.** Chelonia from the Late Miocene Baynunah Formation, Emirate of Abu Dhabi, United Arab Emirates; palaeogeographic implications. In: *Fossil Vertebrates of Arabia*, (ed. P. J. Whybrow and A. Hill). Yale University Press, New Haven. pp. 136-162.

**Latch, E.K., Dharmarajan, G., Glaubitz, J.C., Rhodes, O.E., 2006.** Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conserv. Genet.*, DOI10.1007/s10592-005-9098-1.

**Latch, E.K., Rhodes, O.E., 2006.** Evidence for bias in estimates of local genetic structure due to sampling scheme. *Animal Conservation*, 9(3): 308-315.

**Laurent, L., Casale, P., Bradai M.N., Godley, B.J., Gerosa, G., Broderick, A.C., Schroth, W., Schierwater, B., Levy, A.M., Freggi, D., Abd El-Mawla, EM, Hadoud, DA., Gomati, HE, Domingo, M, Hadjichristophorou, M, Kornaraky, L, Demirayak, F, Gautier, Ch., 1998.** Molecular resolution of marine turtle stock composition in fishery bycatch: a case study in the Mediterranean. *Molecular Ecology*, 7: 1529-1542.

**Lee, W-J., Conroy, J.A., Howell, W.H., Kocher, T.D., 1995.** Structure and evolution of the teleost mitochondrial control-regions. *J. Mol. Evol*, 41:54-66.

**Lenk, P., Fritz, U, Joger, U., Wink, M., 1999.** Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758). *Molecular Ecology* 8:1911-1922.

**Lenk, P., Joger, U., Fritz, U., Heidrich, P., Wink, M., 1998.** Phylogenetic patterns in the mitochondrial cytochrome b gene of the European pond turtle (*Emys orbicularis*): first results. *Proceedings of the EMYS Symposium Dresden 96. Mertensiella*, 10:159-175.

**Lenk, P., Kalyabina, S., Wink, M., Joger, U., 2001.** Evolutionary Relationships among the True Vipers (Reptilia: Viperidae) Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Mol. Phyl. Evol.*, 19(1):94-104.

**Libants, S., Kamarainen, A.M., Scribner, K.T., Congdon J.D., 2004.** Isolation and cross-species amplification of seven microsatellite loci from *Emydoidea blandingii*. *Molecular Ecology Notes*, 4(2): 300-302.

**Liedloff, A., 1999.** Mantel 2.0-Mantel nonparametric test calculator. Version 2.0. Brisbane, Australia: School of Natural Resource Sciences, Queensland University of Technology. .

**Lippe, C., Dumont, P., Bernatchez, L., 2006.** High genetic diversity and no inbreeding in the endangered copper redhorse, *Moxostoma hubbsi* (Catostomidae, Pisces): the positive sides of a long generation time. *Molecular Ecology*, 15: 1769–1780.

**Litzgus, J.D., Brooks, R.J., 1998.** Reproduction in a Northern population of *Clemmys guttata*. *J. Herpet.* 32(2):252-259.

**Λοΐζος, Δ.Ι., 2001.** Η Αρχαία Ελλάδα και οι Ανατολικοί Λαοί. Από τους Σουμερίους στον Μέγα Αλέξανδρο (3000 - 323 π.χ.). Ηλεκτρονικό Βιβλίο, ISBN 960-91873-0-7. <http://users.hol.gr/~dilos/ellada/ellada.htm>

**Malakou, M., Catsadorakis, G., 1992.** Past and present situation of the wetlands of Crete with special reference to their birds. *Biologia Gallo-Hellenica*, 19(2): 59-72.

**Mantel, N., 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.

**Mantziou G., Antoniou A., Poulakakis N., Goulielmos G., Tsigenopoulos C.S., Pinou T., Mylonas M., 2005.** Isolation and characterization of six polymorphic microsatellite markers in the freshwater turtle *Mauremys rivulata* (Testudines; Geoemydidae). *Molecular Ecology Notes*, 5(4): 727-729.

**Mantziou G., Poulakakis N., Lymberakis P., Valakos E., Mylonas M., 2004.** The inter-and Intraspecific status of Aegean *Mauremys rivulata*

(Chelonia, Bataguridae) as inferred by mitochondrial DNA sequences. *Herpetological Journal*, 14: 35-45.

**Μάντζιου, Γ., 2000.** Οικολογία, Κατανομή και Διαφοροποίηση της *Mauremys caspica* (Testudines: Bataguridae) στην Κρήτη. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, pp. 125.

**Martin, A.P., Palumbi, S.R., 1993.** Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90: 4087-4091.

**Martin, A.P., Palumbi, S.R., 1993.** Protein Evolution in Different Cellular Environments : Cytochrome *b* in Sharks and Mammals. *Mol. Biol. Evol.*, 10(4): 873-891.

**McCord, W.P., 1997.** *Mauremys pritchardi*, a new Batagurid turtle from Myanmar and Yunnan, China. *Chelonian Conservation and Biology*, 2(4):555-562.

**McDowell, S.B., 1964.** Partition of the genus *Clemmys* and related problems in the taxonomy of the aquatic testudinidae. *Proc. Zool. Soc. London*, 143:239-279.

**McMillan, W.O., Palumbi, S.R., 1997.** Rapid Rate of Control-Region Evolution in Pacific Butterflyfishes (Chaetodontidae). *J. Mol. Evol*, 45:473-484.

**Mech, L.D., Barber, S.M., 2002.** A critique of wildlife radio-tracking and its use in national parks: a report to the U.S. National Park Service. U.S. Geological Survey, Northern Prairie Wildlife Research Center, Jamestown, N.D.: <http://www.npwrc.usgs.gov/resource/wildlife/radiotrkr/radiotrkr.htm>

**Medasset, 2006.** Μεσογειακός σύνδεσμος για τη σωτηρία των θαλάσσιων χελωνών. <http://www.medasset.gr>

**Meek, R., 1983.** Body temperature of a desert population of the stripe-necked terrapin, *Mauremys caspica*. *British Journal of Herpetology*, 6: 335-337.

**Meek, R., 1987.** Aspects of the population ecology of *Mauremys caspica* in North West Africa. *Herpet. J.* 1:130-136.

**Meek, R., Avery, R.A., 1988.** Mini- Review: Thermoregulation in Chelonians. *Herpetological Journal*, 1: 253-259.

**Melentis, J.K., 1966.** Studien uber fossile vertebraten Griechenlands. 10. *Clemmys caspica* aus dem Pleistozan des beckens von Megalopolis im peloponnes (Griechenland). Ann. Geol. Pays Hellen., XVII, 169-181.

**Menotti-Reymond, M., O'Brien, S.J., 1995.** Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of Felidae. J. Hered., 86: 319-322.

**Meulenkamp, J.E., van der Zwaan, G.J., van Wamel, W.A., 1994.** On Late Miocene to Recent vertical motions in the Cretan segment of the Hellenic arc. Tectonophysics, 234: 53-72.

**Meylan, P.A., Sterrer, W., 2000.** *Hesperotestudo* (Testudines: Testudinidae) from the Pleistocene of Bermuda, with comments on the phylogenetic position of the genus. Zoological Journal of the Linnean Society, 128:51-76.

**Michaux, J.R., Libois, R., Paradis, E., Filippucci, M-G., 2004.** Phylogeographic history of the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) in Europe and in the Near and Middle East. Mol. Phyl. Evol., 32: 788-798.

**Michel-Salzat, A., Bouchon, D., 2000.** Phylogenetic analysis of mitochondrial LSU rRNA in oniscids. Comptes Rendus de L' Academie des Sciences, 323(9): 827-837.

**Miyamoto, M.M., Fitch, W.M., 1995.** Testing species phylogenies and phylogenetic methods with congruence. Systematic Biology, 44(1): 64-76.

**Morin, P.A., Mahboubi, P., Wedel, S., Rogers, J., 1998.** Rapid screening and comparison of human microsatellite markers in baboons: Allele size is conserved, but allele number is not. Genomics, 53(1): 12-20.

**Moritz, C., 1994.** Defining evolutionarily significant units for conservation. Trends Ecol. Evol., 9: 373-375.

**Moritz, C., 1999.** Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. Hereditas, 130: 217-228.

**Moritz, C., Dowling, T.E., Brown, W.M., 1987.** Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst., 18: 269-292.

**Murie, A., 1941.** The Wolves of Mt. McKinley. U.S. Dept. of the Interior, National Park Service Fauna Ser. No.5. Government Printing Office, Washington, D.C., pp.238.

**Myers, A.A., Giller, P.S., 1988.** Analytical Biogeography. London: Chapman & Hall.

**Mylonas, M., 1999.** The waves of evolution. 8th International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and Adjacent regions. Kavala, May 1999.

**Μυλωνάς, Μ., Παραγκαμιάν, Κ., Τριχάς, Α., Τσιουρλής, Γ., Δρεττάκης, Μ., Χατζηχαραλάμπους, Ε., Κοππαρίσης, Σ., Garchia, P., 1997.** Ερευνητικό πρόγραμμα - Μελέτη για την προστασία και την διαχείριση του υγροτόπου Αλμυρού Ηρακλείου. Τελική έκθεση. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, Εργαστήριο Χερσαίας Οικολογίας.

**Μυλωνάς, Μ. (επιστημονικός υπεύθυνος), 2003.** Οικοτουριστικός Οδηγός Κυρίων Υγροτόπων Κρήτης Έκθεση στα πλαίσια του προγράμματος Life (LIFE00ENV/GR/000685) με τίτλο: "Μεσογειακοί Υγρότοποι και Λιμνοδεξαμενές: Επίδειξη Πολυλειτουργικής Διαχείρισης στο Νησί της Κρήτης". <http://www.nhmc.uoc.gr/wetlands/News/Greek/Newssetgr.htm>

**Nada, M.A., 2001.** Status of the sea turtle trade in Alexandrias fish market. Marine Turtle Newsletter, 95: 5-8.

**Nei, M., 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583- 590.

**Nei, M., Kumar, S., 2000.** Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. .

**Neill, W.T., 1958.** The occurrence of Amphibians and reptiles in saltwater areas, and a bibliography. Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean, 8: 1-97.

**Nelson, G., Platnick, N., 1981.** Systematics and Biogeography. Cladistics and Vicariance. New York: Columbia University Press. .

**Nielsen, R., Wakeley, J., 2001.** Distinguishing Migration From Isolation: A Markov Chain Monte Carlo Approach. Genetics, 158: 885-896.

**Nijenhuis, I.A., 1999.** Geochemistry of eastern Mediterranean sedimentary cycles. On the origin of Miocene to Pleistocene sapropels, laminites and diatomites. Ph.D. Thesis. Department of Geochemistry, Utrecht University, The Netherlands.

**Norman, J.A., Moritz, C., Limpus, C.J., 1994.** Mitochondrial DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies for marine turtles. *Mol. Ecol.*, 3: 363-373.

**Ohta, T., Kimura, M., 1973.** The model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a genetic population. *Genet. Res.*, 22: 201-204.

**Οικονομίδου και συνεργάτες, 1988** Εντοπισμός και μελέτη των υγροβιοτόπων και άλλων σημαντικών για την ορνιθοπανίδα βιοτόπων της Κρήτης. Τελική Έκθεση τεύχος 1. Πανεπιστήμιο Πάτρας. Υπουργείο Περιβάλλοντος Χωροταξίας και Δημοσίων Έργων.

**Olmo, E., Capriglione, T., Odierna, G., 2002.** Different genomic evolutionary rates in the various reptile lineages. *Gene*, 295: 317-321.

**Osentoski, M.F., Mockford, S., Wright, J.M., Snyder, M., Herman, T.B., Hughes, C.R., 2002.** Isolation and characterization of microsatellite loci from the Blanding's turtle, *Emydoidea blandingii*. *Molecular Ecology Notes*, 2(2): 147-149.

**Ozesmi, S.L., Ozesmi, U., 1998.** An artificial neural network approach to spatial habitat modelling with interspecific interaction. *Ecological Modelling*, 116: 1:15-31.

**Page, R.D.M., Holmes, E.C., 1998.** *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science, Oxford. .

**Pages, T., Fuster, J.F. & Palacios, L., 1991.** Thermal responses of the fresh water turtle *Mauremys caspica* to step - function changes in the ambient temperature. *J. Therm. Biol.* , 16(6): 337-343.

**Palkovacs, E.P., Marschner, M., Ciofi C., Gerlach, J., Caccone, A., 2003.** Are the native giant tortoises from the Seychelles really extinct? A



genetic perspective based on mtDNA and microsatellite data. *Molecular Ecology*, 12: 1403-1413.

**Palmer, J.D., Herbon, L.A., 1988.** Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure but slowly in sequence. *J. Mol. Evol.*, 28: 87-97.

**Palumbi, S.R., 1996.** Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. In: *Molecular Systematics* (DM Hillis, C Moritz & BK Mable, eds.), Sinauer, Sunderland, MA. pp. 205- 248.

**Παπαπέτρου - Ζαμάνη, Α., 1973.** Φυσικογεωγραφικά Μελέται επί της Νήσου Κρήτης. Διατριβή επί Υφηγεσία, Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Parham, J.F., Macey, J.R., Papenfuss, T.J., Feldman, C.R., Turkozan, O., Polymeni, R., Boore, J., 2006.** The phylogeny of Mediterranean tortoises and their close relatives based on complete mitochondrial genome sequences from museum specimens. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 38 (1): 50-64.

**Parham, J.F., Simison, W.B., Kozak, K.H. , Feldman, C.R., Shi, H, 2001.** New Chinese turtles: Endangered or invalid? A reassessment of two species using mitochondrial DNA, allozyme electrophoresis and known-locality specimens. *Animal Conservation*, 4 (4): 357-367.

**Parmakelis, A., Pfenninger, M., Spanos, L., Papagiannakis, G., Louis, C., Mylonas, M., 2005.** Inference of a radiation in *Mastus* (Gastropoda, Pulmonata, Enidae) on the island of Crete. *Evolution*, 59: 991-1005.

**Parmakelis, A., Stathi, I., Spanos, L., Louis, C., Mylonas, M., 2006a.** Phylogeography of *Iurus dufourei* (Brulle, 1832) (Scorpiones, Iuridae). *Journal of Biogeography*, 33: 251-260.

**Parmakelis, A., Stathi, I., Chatzaki, M., Simaiakis, S., Spanos, L., Louis, C., Mylonas, M., 2006b.** Evolution of *Mesobuthus gibbosus* (Brulle, 1832) (Scorpiones: Buthidae) in the northeastern Mediterranean region. *Molecular Ecology*, (in press).

**Patterson, C., Williams, D.M., Humphries, J.C., 1993.** Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 24: 153-188.

**Pearse, D.E., Arndt, A.D., Valenzuela, N., Miller, B.A., Cantarelli, V., Sites J.W.JR., 2006.** Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). *Molecular Ecology*, 15: 985–1006.

**Perissoratis, C., Conispoliatis, N., 2003.** The impacts of sea-level changes during latest Pleistocene and Holocene times on the morphology of the Ionian and Aegean seas (SE Alpine Europe). *Marine Geology*, 196: 145-156.

**Poole, R.W., 1974.** An introduction to quantitative ecology. McGraw-Hill, New York.

**Por, F.D., 1989.** The Legacy of Tethys. An Aquatic Biogeography of the Levant. Kluwer Academic Publishers. pp. 214.

**Posada, D., Crandall, K.A., 1998.** MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.

**Pough, F.H., Heiser, J.B., McFarland, W.N., 1989.** Vertebrate Life. Cornell University. Macmillan Publishing Company. pp904.

**Poulakakis, N., Lymberakis, P., Valakos, E., Zouros, E., Mylonas, M., 2005a.** Phylogenetic relationships and biogeography of *Podarcis* species from the Balkan Peninsula, by bayesian and maximum likelihood analyses of mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.*, 37: 845–857.

**Poulakakis, N., Lymberakis, P., Tsigenopoulos, C.S., Magoulas, A., Mylonas, M., 2005b.** Phylogenetic relationships and evolutionary history of snake-eyed skink *Ablepharus kitaibelii* (Sauria: Scincidae). *Mol. Phyl. Evol.*, 34(2): 245-256.

**Πουλακάκης, Ν., 2005.** Διερεύνηση των φυλογενετικών διεργασιών στις σαύρες του γένους *Podarcis* (Sauria: Lacertidae) του ελληνικού χώρου. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, Διδακτορική Διατριβή.

**Powell, J.R., 1983.** Measuring Genetic Variation in Natural Populations: Where Are We? In: Population Biology. Retrospect and Prospect, (CE King & PS Dawson, eds.). Columbia University Press. .

**Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000.** Inference of population structure from multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.

**Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.

**Pritchard, P.C.H., McCord, W.P., 1991.** A new emydid turtle from China. *Herpetologica*, 47: 139-147.

**Quinn, N.W.S., Tate, D.P., 1991.** Seasonal movements and habitat of wood turtles (*Clemmys insculpta*) in Algonquin Park, Canada. *J. Herpet.* 25(2):217-220.

**Rackham, O., Moody, J., 1997.** The Making of the Cretan Landscape. Manchester University Press. .

**Raymond, M., Rousset, F., 1995.** GENEPOP: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86: 248-249.

**Raymond, M., Rousset, F., 2004.** GENEPOP on the Web. <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>

**Rico, C., Rico, I., Hewitt, G., 1996.** 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings of Royal Society of London B: Biological Sciences*, 263: 549-557.

**Rifai L., Mantziou G., 2005.** L'Emyde caspienne de l'ouest, *Mauremys rivulata*. *Manouria*, 29: 33-36.

**Rifai, L.B., Amr, Z.S., 2004.** Morphometrics and biology of the stripe-necked Terrapin, *Mauremys rivulata* (Valenciennes, 1833), in Jordan (Reptilia: Testudines: Geoemydidae). *Zoologische Abhandlungen (Dresden)*, 54: 177-197.

**Rifai, L.B., Amr, Z.S., 2006.** The diet of the Stripe-Necked Terrapin, *Mauremys rivulata* in Jordan. *Russian Journal of Herpetology*, 13(1).

**Roberts, N., 1989.** The Holocene. An Environmental History. Blackwell Publishers.

**Roman, J., Santhuff, S.D., Moler, P.A., Bowens, B.W., 1999.** Population structure and cryptic evolutionary units in the alligator snapping turtle. *Conserv. Biol.*, 13(1): 135-142.

**Ronquist, F., Huelsenbeck, J P., 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.

**Rosenbaum, H.C., Deinard, A.S., 1998.** Caution before claim: an overview of microsatellite analysis in ecology and evolutionary biology. In: *Molecular Approaches to Ecology and Evolution* (R. DeSalle & B. Schierwater, eds.). Birkhauser Verlag. .

**Rosenberg, N.A., Nordborg, M., 2002.** Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Rev. Genet.*, 3: 380-390.

**Ross, D.A., Anderson, R.K., 1990.** Habitat use, Movements, and nesting of *Emydoidea blandingi* in central Wisconsin. *J. Herpet.* 24(1):6-12.

**Rossignol-Strick, M., 1983.** African monsoons: an immediate climate response to orbital insolation. *Nature*, 304: 46-49.

**Rossignol-Strick, M., 1985.** Mediterranean Quaternary sapropels, an immediate response of the African Monsoon to variation of insolation. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 49: 237-263.

**Roughgarden, J., 1996.** *Theory of Population Genetics and Evolutionary Ecology: An Introduction.* Prentice-Hall, Inc. .

**Rousset, F., 1997.** Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-Statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145: 1219-1228.

**Rowe, J.W., Moll, E.O., 1991.** A radiotelemetric study of activity and movements of the Blanding's turtle (*Emydoidea blandingi*) in Northeastern Illinois. *J. Herpet.* 25(2):178-185.

**Rubinsztein, D.C., Amos, B., Cooper, G., 1999.** Microsatellite and trinucleotide-repeat evolution: Evidence for mutational bias and different rates of evolution in different lineages. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 354: 1095-1099.

**Rubinsztein, D.C., Amos, W., Leggo, J., Goodburn, S., Jain, S., Li, S.-H., Margolis, R.L., Ross, C.A., Ferguson-Smith, M.A., 1995.** Microsatellite evolution - Evidence for directionality and variation in rate between species. *Nature Genetics*, 10(3): 337-343.

**Russell, P.J., 1998.** Genetics. Fifth Edition. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc. .

**Ryan, P.D., Harper, D.A.T., Whalley, J.S., 1995.** PALSTAT, Statistics for palaeontologists. Kluwer Academic Publishers. .

**Ryder, O.A., 1986.** Species conservation and the dilemma of the subspecies. Trends Ecol. Evol., 1: 9-10.

**Salmon, C., Crabos, J. L., Sambuco, J. P., Bessiere, J. M., Basseres, A., Caumette, P., Baccou, J. C., 1998.** Artificial Wetland Performances in the Purification Efficiency of Hydrocarbon Wastewater. Water, Air, and Soil Pollution, 104(3/4): 313-329.

**Schlotterer, C., Pemberton, J., 1998.** The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations - a review. In: Molecular Approaches to Ecology and Evolution (R. DeSalle & B. Schierwater, eds.). Birkhauser Verlag. .

**Schlug, M.D., Mackay, T.F.C., Aquadro, C.F., 1997.** Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster* populations. Genetics, 146: 309-320.

**Schoffeniels, E., Tercafs, R.R., 1966.** Adaptation d' un reptile marin, *Caretta caretta* L. a l' eau douce et d' un reptile d' eau douce, *Clemmys leprosa* L. a l' eau de mer. Ann. Soc. R. Zool. Belgique, 96: 1-8.

**Schroth, W., Streit, B., Schierwater, B., 1996.** Evolutionary handicap for turtles. Nature, 384:521-522.

**Schule, W., 1993.** Mammals, vegetation and the initial human settlement of the Mediterranean islands: a paleoecological approach. Journal of Biogeography, 20: 399-412.

**Schule, W., 2000.** Preneolithic Navigation in the Mediterranean: a palaeoecological approach. Mediterranean Prehistory Online, Issue 2. <http://www.history-journals.de/articles/hjg-eartic-j00023.html>. .

**Schwartz, T.S., Osentoski, M., Lamb, T., Karl, S.A., 2003.** Microsatellite loci for the North American tortoises (genus *Gopherus*) and their applicability to other turtle species. Molecular Ecology Notes, 3(2): 283-286.

**Sfenthourakis, S., 1996.** A biogeographical analysis of terrestrial isopods (Isopoda, Oniscidea) from the central Aegean islands (Greece). *Journal of Biogeography*, 23: 687-698.

**Shannon, C.E., Weaver, W., 1949.** The mathematical theory of communication. Urbana: University of Illinois Press. .

**She, J.X., Autem, M., Kotoulas, G., Pasteur, N., Bonhomme, F., 1987.** Multivariate analysis of genetic exchanges between *Solea aegyptiaca* and *Solea senegalensis* (Teleosts: Soleidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 32: 357-371.

**Shipley, P., 2003.** Micro-Checker, version 2.2.3. Department of Biological Sciences, Department of Computer Sciences. The University of Hull. .

**Shutes, R.B.E., 2001.** Artificial wetlands and water quality improvement. *Environment International*, 26: 441-447.

**Sidis, I., Gasith, A., 1985.** Food habits of the caspian terrapin (*Mauremys caspica rivulata*) in unpolluted and polluted habitats in Israel. *J. Herpetol.* , 19(4):108-115.

**Sidis, I., Gasith, A., 1988.** Sexual behavior of the Caspian terrapin, *Mauremys caspica rivulata*. *Herpet. Rev.* 19(1):7-8.

**Simpson, G.G., 1943.** Turtles and the origin of the fauna of Latin America. *American Journal of Science*, 241: 413-429.

**Sites, J.W., Bickham, J.W., Pytel, B.A., Greenbaum, I.F., Bates, B.B., 1984.** Biochemical characters and the reconstruction of turtle phylogenies: relationships among batagurine genera. *Systematic Zoology*, 33: 137-158.

**Smith, D.J., Eglinton, G., Morris, R.J., 1986.** The lipid geochemistry of a recent sapropel and associated sediments from the Hellenic outer range, eastern mediterranean sea. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, 319: 375-415.

**Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995.** Biometry. New York: Freeman.

**Sondaar, P.Y., DeVos, J., Dermitzakis, M.D., 1986.** Late Cenozoic faunal evolution and Palaeogeography of the south Aegean island arc. *Modern Geology*, 10: 249-259.

**Souza, F.L., Cunha, A.F., Oliveira, M.A., Pareira G.A.G., Dos Reis, S.F., 2003.** Preliminary Phylogeographic Analysis of the Neotropical Freshwater Turtle *Hydromedusa maximiliani* (Chelidae). *Journal of Herpetology*, 37(2): 427-433.

**Spinks, P.Q., Shaffer, H.B., Iverson J.B., McCord, W.P., 2004.** Phylogenetic hypotheses for the turtle family Geoemydidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 164-182.

**Starkey, D.E., Shaffer, H.B., Burke, R.L., Forstner, M.R.J., Iverson, J.B., Janzen, F.J., Rhodin, A.G.J., Ultsch, G.R., 2003.** Molecular systematics, phylogeography, and the effects of pleistocene glaciation in the painted turtle (*Chrysemys picta*) complex. *Evolution*, 57(1): 119-128.

**Steininger, F.F., Roegl, F., 1984.** Paleogeography and palinspastic reconstruction of the Neogene of the Mediterranean and Paratethys. In: *The Geological Evolution of the Eastern Mediterranean*, (J.E. Dixon & A.H.F. Robertson eds.). Blackwell Scientific Publications, pp.659-668.

**Stephens, J.C., Billbert, D.A., Yuh, N., O'Brien, S.J., 1992.** Estimation of heterozygosity for single-probe multilocus DNA fingerprints. *Mol. Biol. Evol.*, 9: 729-743.

**Storer, T.I., Usinger, R.L., Stebbins, R.C., Nybacken, J.W., 1979.** *General Zoology*. Sixth edition. McGraw-Hill Book Company. .

**Stuart, B.L., Parham, J.F., 2004.** Molecular phylogeny of the critically endangered Indochinese box turtle (*Cuora galbinifrons*) *Molec. Phylogenet. Evol.*, 31(1):164-177.

**Sullivan, J., Abdo, Z., Joyce, P., Swofford, D.L., 2005.** Evaluating the performance of a successive-approximation approach to parameter optimization in Maximum-Likelihood phylogeny estimation. *Mol. Biol. Evol.*, 22(6): 1386-1392.

**Surget-Groba, Y., Heulin, B., Guillaume, C.-P., Thorpe, R.S., Kuproyanova, L., Vorgin, N., Maslak, R., Mazzotti, S., Venczel, M., Ghira, I., Odierna, G., Leontyeva, O., Monney, J.C., Smith, N., 2001.** Intraspecific

Phylogeography of *Lacerta vivipara* and the Evolution of Viviparity. *Mol. Phyl. Evol.*, 18(3): 449-459.

**Swofford, D.L., 2003.** PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0b 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

**Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddel, P.J., Hillis, D.M., 1996.** Phylogenetic inference. In: *Molecular Systematics* (DM Hillis, C Moritz & BK Mable, eds.). Sinauer, Sunderland, MA. pp. 407-514.

**Takezaki, N., Nei, M., 1996.** Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 144: 389-399.

**Taylor, A.C., Sherwin, W.B., Wayne, R.K., 1994.** Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiornhinus krefftii*. *Molecular Ecology*, 3: 277-290.

**Templeton, A.R., 1998.** Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.*, 7: 381-397.

**Templeton, A.R., Crandall, K.A., Sing, C.F., 1992.** A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132: 619-633.

**Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997.** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.

**Tok, C.V., 1999.** The taxonomy and ecology of *Mauremys caspica rivulata* Valenciennes, 1833 (Testudinata: Bataguridae) and *Testudo graeca iberica* Pallas, 1811 (Testudinata: Testudinidae) on Resadiye (Datca) Peninsula. *Turkish Journal of Zoology*, 23(1):17-21.

**Tsigenopoulos, C.S., Durand, J.-D., Unglu, E., Berrebi, P., 2003.** Rapid radiation of the Mediterranean *Luciobarbus* species (Cyprinidae) after the Messinian salinity crisis of the Mediterranean Sea, inferred from



mitochondrial phylogenetic analysis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 80: 207–222.

**Urbanc-Bercic, O., 1996.** Constructed wetlands for the treatment of landfill leachates: the Slovenian experience. *Wetlands Ecology and Management*, 4(3): 189-197.

**Van Andel, T.H., 1994.** *New views on an Old Planet. A history of global change.* Cambridge University Press. .

**Van Andel, T.H., Shackleton, J.C., 1982.** Late paleolithic and mesolithic coastlines of Greece and the Aegean. *J. Field Arch.*, 9: 445-454.

**Van der Kuyl, A.C., Ballasina, D.L.P., Zorgdrager, F., 2005.** Mitochondrial haplotype diversity in the tortoise species *Testudo graeca* from North Africa and the Middle East. *BMC Evolutionary Biology*, 5:29. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/5/29>.

**Velitzelos, E., Gregor, H.J., 1990.** Some Aspects of the Neogene Floral History in Greece. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 62: 291-307.

**Vences, M., Vieites, D.R., Glaw, F., Brinkmann, H., Kosuch, J., Veith, M., Meyer, A., 2003.** Multiple overseas dispersal in amphibians. *Proc. R. Soc. Lond. B*, DOI 10.1098/rspb.2003.2516.

**Verdonschot, P.F.M., 1989.** The role of Oligochaetes in the management of waters. *Hydrobiologia*, 180: 213-227.

**Wahlund, S., 1928.** Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas*, 11: 65-106.

**Walker, D., Avise, J.C., 1998.** Principles of phylogeography as illustrated by freshwater and terrestrial turtles in southeastern United States. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 29:23-58.

**Walker, D., Moler, P.E., Buhlmann, K.A., Avise, J.C., 1998.** Phylogeographic uniformity in mitochondrial DNA of the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Animal Conservation*, 1: 55–60.

**Wallace, B., 1981.** *Basic Population Genetics.* Columbia University Press. .

**Weber, J.L., Wong, C., 1993.** Mutation of human short tandem repeats. Hum. Mol. Genet., 2: 1123-1128.

**Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution, 38: 1358-1370.

**Weldeab, S., Emeis, K-C., Hemleben, C., Schmiedl, G., Schulz, H., 2003.** Spatial productivity variations during formation of sapropels S5 and S6 in the Mediterranean Sea: evidence from Ba contents. Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology, 191: 169 - 190.

**Wink, M., Guicking, D., Fritz, U., 2001.** Molecular evidence for hybrid origin of *Mauremys iversoni* PRITCHARD et McCORD, 1991, and *Mauremys pritchardi* McCORD, 1997 (Reptilia: Testudines: Bataguridae). Zool. Abh. Mus. Tierk. Dresden, 51(5): 41- 50.

**Winner, R.W., Boesel, M.W., Farrell, M.P., 1980.** Insect community structure as an index of heavy metal pollution in lotic ecosystems. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 37: 647-655.

**Wischuf, T., Busack, S.D., 2001.** *Mauremys rivulata* (Valenciennes in Bori de Saint-Vincent *et al.*, 1833) - Ostmediterrane Bachschildkroete. In: Fritz, U. (ed.): Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Schildkroeten (Testudines) I. pp. 89-110.

**Wischuf, T., Fritz, U., 2001.** *Mauremys capsica* (Gmelin, 1774) - Kaspische Bachschildkroete. In: Fritz, U. (ed.): Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Schildkroeten (Testudines) I. pp. 43-56.

**Wright, S., 1978.** Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations. The University of Chicago Press, Chicago. .

**Χατζηγιάννη, Ε., 2003.** Οικολογική μελέτη των τριματοφόρων ως βασική συνιστώσα του μειοβένθους, στη βαθύαλη και αβυσσική ζώνη της Μεσογείου. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

**Yasukawa, Y., Hirayama, R., Hikida, T., 2001.** Phylogenetic relationships of Geoemydine turtles (Reptilia: Bataguridae). Curr. Herpetol, 20: 105-133.

---

**Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T., 2002.** Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.

**Zouros, E., Ball, A.M., Saavedra, C., Freeman, K.R., 1994.** An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 7463-7467.

**Zug, G.A., Wynn, A.H., Ruckdeschel, C., 1986.** Age determination of loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, by incremental growth marks in the skeleton. *Smithsonian Contrib. Zool.*, 427: 1-34.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι**

**Πίνακας 1**

Κατάλογος των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, όπου φαίνεται ο κωδικός αριθμός με τον οποίο το κάθε άτομο είναι καταγεγραμμένο στις συλλογές του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης (NHMC\_code), η τοποθεσία και ημερομηνία συλλογής του κάθε ατόμου και αν το άτομο αυτό συμπεριλήφθηκε στην ανάλυση mtDNA ή/και μικροδορυφορικών δεικτών.

NHMC_code	Περιφέρεια	Νομός	Τοποθεσία	Ημερομηνία	mtDNA	microsat
<i>Mauremys rivulata</i>						
NHMC80.3.15.90	Αιγαίο	Δωδεκάνησα	Κως, Λίμνη	22/6/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.130	Αιγαίο	Δωδεκάνησα	Κως, Υγρότοπος Ψαλίδι	28/6/2001	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.132	Αιγαίο	Δωδεκάνησα	Κως, Υγρότοπος Ψαλίδι	28/6/2001	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.131	Αιγαίο	Δωδεκάνησα	Κως, Υγρότοπος Ψαλίδι	28/6/2001	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.133	Αιγαίο	Δωδεκάνησα	Κως, Υγρότοπος Ψαλίδι	28/6/2001	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.941	Αιγαίο	Δωδεκάνησα	Ρόδος, αεροδρόμιο	3/5/2005	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.87	Αιγαίο	Δωδεκάνησα	Ρόδος, Γέφυρα Κρεμαστής	8/6/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.86	Αιγαίο	Δωδεκάνησα	Ρόδος, Εφτά Πηγές	7/6/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.83	Αιγαίο	Δωδεκάνησα	Ρόδος, Εφτά Πηγές	7/6/2000	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.84	Αιγαίο	Δωδεκάνησα	Ρόδος, Εφτά Πηγές	7/6/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.85	Αιγαίο	Δωδεκάνησα	Ρόδος, Εφτά Πηγές	7/6/2000	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.199	Αιγαίο	Εύβοιας	Σκύρος, Αχερούνες	11/5/2002	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.200	Αιγαίο	Εύβοιας	Σκύρος, Αχερούνες	11/5/2002	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.100	Αιγαίο	Ικαρία	Κάμποι	27/8/2000	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.53	Αιγαίο	Κυκλάδες	Νάξος, αεροδρόμιο	15/4/2000	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.51	Αιγαίο	Κυκλάδες	Νάξος, Εγγαρές	15/4/2000	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.514	Αιγαίο	Λέσβος	Κόλπος Γέρας, Ντίπι	31/5/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.99	Αιγαίο	Λέσβος	Μυτιλήνη	5/7/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.96	Αιγαίο	Λέσβος	Μυτιλήνη	5/7/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.97	Αιγαίο	Λέσβος	Μυτιλήνη	5/7/2000	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.98	Αιγαίο	Λέσβος	Μυτιλήνη	5/7/2000	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.890	Αιγαίο	Λέσβος	Παραλία Βατερά		Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.891	Αιγαίο	Λέσβος	Παραλία Βατερά		Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.104	Αιγαίο	Σάμος	Ηραίο	31/8/2000	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.103	Αιγαίο	Σάμος	Ηραίο	31/8/2000	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.128	Αιγαίο	Χίος	Βολισσός	26/5/2001	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.127	Αιγαίο	Χίος	Βολισσός	26/5/2001	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.135	Θεσσαλία	Λάρισα	Πλατύκαμπος	1/8/2001	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.136	Θεσσαλία	Λάρισα	Πλατύκαμπος	1/8/2001	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.60	Ιορδανία		Amman	2/5/2000	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.59	Ιορδανία		Amman	2/5/2000	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.61	Ιορδανία		Amman	2/5/2000	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.56	Ιορδανία		Jerash	27/4/2000	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.57	Ιορδανία		Jerash	27/4/2000	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.58	Ιορδανία		Wadi Zarqa, Sihan	29/4/2000	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.125	Κρήτη	Ρέθυμνο	Λίμνη Πρέβελη	10/3/2001	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.126	Κρήτη	Ρέθυμνο	Λίμνη Πρέβελη	10/3/2001	Όχι	Ναι

NHMC_code	Περιφέρεια	Νομός	Τοποθεσία	Ημερομηνία	mtDNA	microsat
NHMC80.3.15.122	Κρήτη	Ρέθυμνο	Λίμνη Πρέβελη	10/3/2001	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.123	Κρήτη	Ρέθυμνο	Λίμνη Πρέβελη	10/3/2001	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.124	Κρήτη	Ρέθυμνο	Λίμνη Πρέβελη	10/3/2001	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.494	Κρήτη	Ρέθυμνο	Πλακιάς	20/4/2002	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.64	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	17/5/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.65	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	17/5/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.30	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	10/3/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.39	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	21/3/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.31	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	10/3/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.27	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	10/3/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.28	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	10/3/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.23	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	10/3/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.24	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	10/3/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.21	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	10/3/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.19	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	10/3/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.36	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	17/3/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.40	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	21/3/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.41	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	21/3/2000	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.35	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	17/3/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.16	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	2/3/2000	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.32	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	10/3/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.29	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	10/3/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.12	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	16/2/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.851	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	9/10/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.861	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	9/10/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.625	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	12/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.626	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	12/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.607	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	12/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.844	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	9/10/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.756	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	19/8/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.846	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	9/10/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.859	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	9/10/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.855	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	9/10/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.856	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	9/10/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.857	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	9/10/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.849	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	9/10/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.850	Κρήτη	Ηράκλειο	Αλμυρός Ποταμός	9/10/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.238	Κρήτη	Ηράκλειο	Αμουργέλλες	31/5/2002	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.236	Κρήτη	Ηράκλειο	Αμουργέλλες	31/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.247	Κρήτη	Ηράκλειο	Αμουργέλλες	31/5/2002	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.241	Κρήτη	Ηράκλειο	Αμουργέλλες	31/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.243	Κρήτη	Ηράκλειο	Αμουργέλλες	31/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.252	Κρήτη	Ηράκλειο	Αμουργέλλες	31/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.253	Κρήτη	Ηράκλειο	Αμουργέλλες	31/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.254	Κρήτη	Ηράκλειο	Αμουργέλλες	31/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.249	Κρήτη	Ηράκλειο	Αμουργέλλες	31/5/2002	Όχι	Ναι



NHMC_code	Περιφέρεια	Νομός	Τοποθεσία	Ημερομηνία	mtDNA	microsat
NHMC80.3.15.255	Κρήτη	Ηράκλειο	Γέργερη, λίμνη Διγενή	4/6/2002	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.396	Κρήτη	Ηράκλειο	Γέργερη, λίμνη Διγενή	19/9/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.397	Κρήτη	Ηράκλειο	Γέργερη, λίμνη Διγενή	19/9/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.309	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.325	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.321	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.322	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.317	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.314	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.311	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.308	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.328	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.312	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.335	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.324	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.338	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.323	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.336	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.337	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.332	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.329	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.326	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.327	Κρήτη	Ηράκλειο	Πάρτιρα	28/8/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.495	Κρήτη	Ηράκλειο	Πλακιώτισσα	9/5/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.416	Κρήτη	Ηράκλειο	Πλακιώτισσα	25/10/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.439	Κρήτη	Ηράκλειο	Πλακιώτισσα	25/10/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.428	Κρήτη	Ηράκλειο	Πλακιώτισσα	25/10/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.425	Κρήτη	Ηράκλειο	Πλακιώτισσα	25/10/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.423	Κρήτη	Ηράκλειο	Πλακιώτισσα	25/10/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.417	Κρήτη	Ηράκλειο	Πλακιώτισσα	25/10/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.419	Κρήτη	Ηράκλειο	Πλακιώτισσα	25/10/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.418	Κρήτη	Ηράκλειο	Πλακιώτισσα	25/10/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.414	Κρήτη	Ηράκλειο	Πλακιώτισσα	25/10/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.415	Κρήτη	Ηράκλειο	Πλακιώτισσα	25/10/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.411	Κρήτη	Ηράκλειο	Πλακιώτισσα	25/10/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.412	Κρήτη	Ηράκλειο	Πλακιώτισσα	25/10/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.407	Κρήτη	Ηράκλειο	Πλακιώτισσα	25/10/2002	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.409	Κρήτη	Ηράκλειο	Πλακιώτισσα	25/10/2002	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.516	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.515	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.517	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.526	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.601	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.602	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.598	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.599	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι



NHMC_code	Περιφέρεια	Νομός	Τοποθεσία	Ημερομηνία	mtDNA	microsat
NHMC80.3.15.594	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.595	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.525	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.604	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.527	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.522	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.523	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.524	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.518	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.520	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.521	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.596	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.600	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.605	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.603	Κρήτη	Ηράκλειο	Πόμπια	8/6/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.288	Κρήτη	Ηράκλειο	Σκινιάς	31/7/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.291	Κρήτη	Ηράκλειο	Σκινιάς	31/7/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.293	Κρήτη	Ηράκλειο	Σκινιάς	31/7/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.290	Κρήτη	Ηράκλειο	Σκινιάς	31/7/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.285	Κρήτη	Ηράκλειο	Σκινιάς	31/7/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.286	Κρήτη	Ηράκλειο	Σκινιάς	31/7/2002	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.287	Κρήτη	Ηράκλειο	Σκινιάς	31/7/2002	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.292	Κρήτη	Ηράκλειο	Σκινιάς	31/7/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.202	Κρήτη	Ηράκλειο	Θραψανό, υγρότοπος Λιβάδα	17/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.203	Κρήτη	Ηράκλειο	Θραψανό, υγρότοπος Λιβάδα	17/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.633	Κρήτη	Λασιθί	Μπραμιανά	4/7/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.634	Κρήτη	Λασιθί	Μπραμιανά	4/7/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.635	Κρήτη	Λασιθί	Μπραμιανά	5/7/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.636	Κρήτη	Λασιθί	Μπραμιανά	5/7/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.159	Κρήτη	Λασιθί	Μπραμιανά	13/4/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.284	Κρήτη	Λασιθί	Μπραμιανά	12/6/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.281	Κρήτη	Λασιθί	Μπραμιανά	12/6/2002	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.282	Κρήτη	Λασιθί	Μπραμιανά	12/6/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.889	Κρήτη	Λασιθί	Ζάκρος	16/5/2004	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.45	Κρήτη	Λασιθί	Ζάκρος	26/3/2000	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.75	Κρήτη	Χανιά	Ακρωτήρι, βάλτος Χωραφάκια	3/5/2000	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.114	Κρήτη	Χανιά	Φραγκοκάστελλο	18/11/2000	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.115	Κρήτη	Χανιά	Φραγκοκάστελλο	19/11/2000	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.167	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	6/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.164	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	6/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.165	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	6/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.166	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	6/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.493	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	25/4/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.175	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	4/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.170	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	4/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.171	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	4/5/2002	Όχι	Ναι

NHMC_code	Περιφέρεια	Νομός	Τοποθεσία	Ημερομηνία	mtDNA	microsat
NHMC80.3.15.173	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	4/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.174	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	4/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.180	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	4/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.176	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	4/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.178	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	4/5/2002	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.485	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	25/4/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.486	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	25/4/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.490	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	25/4/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.491	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	25/4/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.492	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	25/4/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.488	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	25/4/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.489	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	25/4/2003	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.70	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	27/5/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.71	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	27/5/2000	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.68	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	27/5/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.69	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	27/5/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.66	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	27/5/2000	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.67	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	27/5/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.73	Κρήτη	Χανιά	Γαύδος	27/5/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.76	Κρήτη	Χανιά	Γεωργιούπολη	5/6/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.82	Κρήτη	Χανιά	Γεωργιούπολη	5/6/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.79	Κρήτη	Χανιά	Γεωργιούπολη	5/6/2000	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.81	Κρήτη	Χανιά	Γεωργιούπολη	5/6/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.77	Κρήτη	Χανιά	Γεωργιούπολη	5/6/2000	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.78	Κρήτη	Χανιά	Γεωργιούπολη	5/6/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.80	Κρήτη	Χανιά	Γεωργιούπολη	5/6/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.111	Κρήτη	Χανιά	Λίμνη Κουρνά	7/11/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.110	Κρήτη	Χανιά	Λίμνη Κουρνά	7/11/2000	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.112	Κρήτη	Χανιά	Λίμνη Κουρνά	7/11/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.108	Κρήτη	Χανιά	Λίμνη Κουρνά	6/11/2000	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.93	Κρήτη	Χανιά	Κρύα Βρύση Κισσάμου	6/8/2000	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.94	Κρήτη	Χανιά	Κρύα Βρύση Κισσάμου	6/8/2000	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.897	Κύπρος		Κύπρος	25/4/2005	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.940	Κύπρος		Κύπρος	25/4/2005	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.896	Κύπρος		Κύπρος	25/4/2005	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.939	Κύπρος		Κύπρος	25/4/2005	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.920	Μακεδονία	Σέρρες	Λίμνη Κερκίνη	27/9/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.915	Μακεδονία	Σέρρες	Λίμνη Κερκίνη	27/9/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.916	Μακεδονία	Σέρρες	Λίμνη Κερκίνη	27/9/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.917	Μακεδονία	Σέρρες	Λίμνη Κερκίνη	27/9/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.912	Μακεδονία	Σέρρες	Λίμνη Κερκίνη	27/9/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.913	Μακεδονία	Σέρρες	Λίμνη Κερκίνη	27/9/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.923	Μακεδονία	Σέρρες	Λίμνη Κερκίνη	27/9/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.914	Μακεδονία	Σέρρες	Λίμνη Κερκίνη	27/9/2004	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.919	Μακεδονία	Σέρρες	Λίμνη Κερκίνη	27/9/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.918	Μακεδονία	Σέρρες	Λίμνη Κερκίνη	27/9/2004	Όχι	Ναι

NHMC_code	Περιφέρεια	Νομός	Τοποθεσία	Ημερομηνία	mtDNA	microsat
NHMC80.3.15.924	Μακεδονία	Σέρρες	Λίμνη Κερκίνη	27/9/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.925	Μακεδονία	Σέρρες	Λίμνη Κερκίνη	27/9/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.921	Μακεδονία	Σέρρες	Λίμνη Κερκίνη	27/9/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.922	Μακεδονία	Σέρρες	Λίμνη Κερκίνη	27/9/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.881	Πελοπόννησος		Λίμνη Άραξος	13/5/2004	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.880	Πελοπόννησος		Λίμνη Άραξος	13/5/2004	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.882	Πελοπόννησος		Άργος	14/5/2004	Ναι	Όχι
NHMC80.3.15.885	Πελοπόννησος		Άργος	14/5/2004	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.887	Πελοπόννησος		Άργος	14/5/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.883	Πελοπόννησος		Άργος	14/5/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.884	Πελοπόννησος		Άργος	14/5/2004	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.886	Πελοπόννησος		Άργος	14/5/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.877	Πελοπόννησος		Παλαιοχώρι	13/5/2004	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.878	Πελοπόννησος		Παλαιοχώρι	13/5/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.879	Πελοπόννησος		Παλαιοχώρι	13/5/2004	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.137	Πελοπόννησος	Μεσσηνία	Κακαβάς, ποταμός Περιστερά	17/8/2001	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.898	Στερεά Ελλάδα	Αττική	Μαραθώνας	25/3/2005	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.899	Στερεά Ελλάδα	Αττική	Μαραθώνας	25/3/2005	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.900	Στερεά Ελλάδα	Αττική	Μαραθώνας	25/3/2005	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.909	Στερεά Ελλάδα	Αττική	Μαραθώνας	26/3/2005	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.910	Στερεά Ελλάδα	Αττική	Μαραθώνας	26/3/2005	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.911	Στερεά Ελλάδα	Αττική	Μαραθώνας	26/3/2005	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.907	Στερεά Ελλάδα	Αττική	Μαραθώνας	26/3/2005	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.908	Στερεά Ελλάδα	Αττική	Μαραθώνας	26/3/2005	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.901	Στερεά Ελλάδα	Αττική	Νέα Μάκρη	26/3/2005	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.905	Στερεά Ελλάδα	Αττική	Νέα Μάκρη	26/3/2005	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.902	Στερεά Ελλάδα	Αττική	Νέα Μάκρη	26/3/2005	Όχι	Ναι
NHMC80.3.15.903	Στερεά Ελλάδα	Αττική	Νέα Μάκρη	26/3/2005	Ναι	Ναι
NHMC80.3.15.904	Στερεά Ελλάδα	Αττική	Νέα Μάκρη	26/3/2005	Όχι	Ναι
<i>Mauremys caspica</i>						
NHMC80.3.112.1	Συρία		As Suwar	08/04/1999	Ναι	Όχι
NHMC80.3.112.62	Συρία		Λίμνη Al Asad	09/04/1999	Ναι	Όχι
<i>Mauremys leprosa</i>						
NHMC80.3.113.1	Ισπανία		Ria Orlina, Rados d'Emporda	17/6/2004		
NHMC80.3.113.2	Ισπανία		Ria Orlina, Rados d'Emporda	17/6/2004		
NHMC80.3.113.119	Μαρόκο		Oued Tensift	4/1/2001		
NHMC80.3.113.120	Μαρόκο		Oued Tensift	4/1/2001		
NHMC80.3.113.121	Μαρόκο		Oued Tensift	4/1/2001		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

**Πίνακας 1**

Πίνακας γενετικών αποστάσεων με βάση το μοντέλο Kimura 2-parameter για τις αλληλουχίες του *cyt b*. Στην παρένθεση δίπλα από τον κάθε απλότυπο αναφέρεται ο αριθμός των ατόμων που παρουσίασαν τον απλότυπο αυτό.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<i>M. rivulata</i>																						
1.C1 (14)																						
2.C2 (3)	0,012																					
3.C3 (17)	0,009	0,002																				
4.C9 (4)	0,007	0,005	0,002																			
5.C6 (6)	0,002	0,009	0,007	0,005																		
6.C7 (10)	0,005	0,007	0,005	0,002	0,002																	
7.C8 (4)	0,002	0,009	0,007	0,005	0,005	0,002																
8.C10 (2)	0,007	0,005	0,007	0,005	0,005	0,002	0,005															
9.C5 (1)	0,003	0,006	0,009	0,006	0,003	0,006	0,006	0,003														
10.C12 (1)	0,002	0,009	0,007	0,009	0,005	0,007	0,005	0,009	0,006													
11.C13 (3)	0,007	0,005	0,002	0,005	0,005	0,002	0,005	0,005	0,009	0,005												
12.C4 (4)	0,005	0,007	0,005	0,007	0,007	0,005	0,002	0,007	0,009	0,002	0,002											
13.C11 (5)	0,002	0,014	0,012	0,009	0,005	0,007	0,005	0,009	0,003	0,005	0,009	0,007										
14.AJ564455 (1)	0,007	0,003	0,000	0,003	0,007	0,003	0,003	0,007	0,010	0,003	0,001	0,001	0,007									
<i>M. caspica</i>																						
15.SYR1 (1)	0,039	0,036	0,034	0,031	0,036	0,034	0,036	0,036	0,038	0,041	0,036	0,039	0,036	0,031								
16.SYR62 (1)	0,031	0,029	0,026	0,024	0,029	0,026	0,029	0,029	0,032	0,034	0,029	0,031	0,034	0,024	0,012							
<i>M. leprosa</i>																						
17.SPA1 (1)	0,036	0,049	0,046	0,044	0,039	0,041	0,039	0,044	0,045	0,039	0,044	0,041	0,039	0,048	0,057	0,049						
18.SPA2 (1)	0,039	0,052	0,049	0,046	0,041	0,044	0,041	0,046	0,048	0,041	0,046	0,044	0,041	0,052	0,059	0,052	0,002					
19.MOR120 (1)	0,044	0,057	0,054	0,052	0,046	0,049	0,046	0,052	0,052	0,046	0,052	0,049	0,046	0,055	0,067	0,059	0,014	0,017				
20.MOR121 (1)	0,046	0,059	0,057	0,054	0,049	0,052	0,049	0,054	0,055	0,049	0,054	0,052	0,049	0,059	0,070	0,062	0,012	0,014	0,002			
21.MOR119 (1)	0,045	0,056	0,054	0,054	0,048	0,051	0,048	0,054	0,051	0,045	0,051	0,048	0,048	0,051	0,071	0,059	0,018	0,021	0,003	0,005		
22.G. spengleri	0,124	0,128	0,124	0,120	0,124	0,120	0,120	0,124	0,128	0,128	0,124	0,124	0,124	0,124	0,124	0,124	0,124	0,128	0,120	0,124	0,115	
23.T.marginata	0,137	0,122	0,125	0,128	0,134	0,131	0,134	0,128	0,131	0,134	0,128	0,131	0,140	0,129	0,129	0,120	0,156	0,159	0,153	0,156	0,139	0,189

**Πίνακας 2**

Πίνακας γενετικών αποστάσεων με βάση το μοντέλο Kimura 2-parameter για τις αλληλουχίες της D-loop. Στην παρένθεση δίπλα από τον κάθε απλότυπο αναφέρεται ο αριθμός των ατόμων που παρουσίασαν τον απλότυπο αυτό.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
<i>M. rivulata</i>	1.D4 (3)																							
	2.D6 (4)	0.002																						
	3.D1 (5)	0.004	0.002																					
	4.D10 (4)	0.006	0.004	0.002																				
	5.D2 (40)	0.006	0.004	0.002	0.004																			
	6.D7 (2)	0.008	0.006	0.004	0.006	0.002																		
	7.D13 (1)	0.008	0.006	0.004	0.006	0.002	0.004																	
	8.D18 (1)	0.008	0.006	0.004	0.006	0.002	0.004	0.004																
	9.D15 (1)	0.008	0.006	0.004	0.006	0.002	0.004	0.004	0.004															
	10.D14 (1)	0.006	0.008	0.006	0.008	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006														
	11.D12 (2)	0.006	0.008	0.006	0.004	0.008	0.010	0.010	0.010	0.010	0.004													
	12.D16 (1)	0.002	0.004	0.002	0.004	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006	0.004	0.004												
	13.D5 (2)	0.004	0.006	0.004	0.006	0.002	0.004	0.004	0.004	0.004	0.002	0.006	0.002											
	14.D11 (2)	0.007	0.005	0.002	0.000	0.005	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.002	0.005	0.007										
	15.D17 (1)	0.013	0.013	0.010	0.013	0.007	0.010	0.010	0.010	0.007	0.007	0.013	0.010	0.007	0.013									
	16.D9 (1)	0.010	0.010	0.007	0.003	0.003	0.007	0.007	0.007	0.003	0.003	0.003	0.007	0.003	0.003	0.010								
	17.D3 (1)	0.003	0.003	0.007	0.010	0.003	0.007	0.007	0.007	0.003	0.003	0.010	0.007	0.003	0.010	0.010	0.007							
	18.D8 (1)	0.013	0.013	0.010	0.008	0.013	0.015	0.015	0.015	0.015	0.010	0.005	0.010	0.013	0.001	0.013	0.003	0.010						
<i>M. caspica</i>	19.SYR1 (1)	0.075	0.077	0.079	0.082	0.082	0.084	0.084	0.084	0.082	0.082	0.077	0.079	0.089	0.112	0.108	0.100	0.095						
	20.SYR62 (1)	0.061	0.063	0.061	0.063	0.063	0.065	0.065	0.065	0.065	0.063	0.063	0.058	0.061	0.068	0.088	0.084	0.084	0.077	0.021				
<i>M. leprosa</i>	21.SPA (2)	0.094	0.092	0.094	0.096	0.096	0.099	0.099	0.099	0.099	0.101	0.101	0.096	0.099	0.095	0.132	0.128	0.120	0.120	0.101	0.106			
	22.MOR121 (1)	0.089	0.087	0.089	0.087	0.092	0.094	0.094	0.094	0.094	0.097	0.092	0.092	0.094	0.087	0.133	0.121	0.121	0.108	0.092	0.101	0.023		
<i>M. leprosa</i>	23.MOR119_120 (2)	0.092	0.089	0.092	0.089	0.094	0.097	0.097	0.097	0.099	0.094	0.094	0.097	0.090	0.137	0.125	0.125	0.111	0.089	0.099	0.028	0.004		
24.T.marginata	0.211	0.214	0.217	0.220	0.217	0.220	0.220	0.220	0.214	0.217	0.220	0.214	0.214	0.224	0.298	0.293	0.282	0.271	0.223	0.223	0.203	0.201	0.204	

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ**

**Δημοσιεύσεις που σχετίζονται με τη διδακτορική διατριβή**

## THE INTER- AND INTRASPECIFIC STATUS OF AEGEAN *MAUREMYS RIVULATA* (CHELONIA, BATAGURIDAE) AS INFERRED BY MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCES

GEORGIA MANTZIOU<sup>1,2</sup>, NIKOS POULAKAKIS<sup>1</sup>, PETROS LYMBERAKIS<sup>1</sup>, EFSTRATIOS VALAKOS<sup>3</sup> AND MOYSIS MYLONAS<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Natural History Museum of Crete, University of Crete

<sup>2</sup>Department of Biology, University of Crete

<sup>3</sup>Section of Animal and Human Physiology, Department of Biology, University of Athens

The genus *Mauremys* (Chelonia, Bataguridae) is widely distributed throughout Asia, Europe and NW Africa. Three species (*Mauremys caspica*, *Mauremys rivulata* and *Mauremys leprosa*) are discontinuously distributed around the Mediterranean region. Present distributions are much smaller than those documented within the fossil record of *Mauremys* in the Mediterranean region. All three extant species are identified on the basis of morphology. In the present study we compare partial mitochondrial DNA sequences of *cyt-b* from 16 populations of *Mauremys rivulata* from Greece, one from Jordan (*M. rivulata*), two from Syria (*M. caspica*) and one from Morocco (*M. leprosa*). Comparison of *cyt-b* partial sequences supports the monophyly of the three species considered, as well as their proposed taxonomic status (i.e. separation at the species level). *Mauremys leprosa* is the most differentiated of the three, *M. caspica* and *M. rivulata* being more closely related. Climatic changes during the Pleistocene influenced the distribution of *M. rivulata* and resulted in a latitudinal oscillation of the populations in a north – south direction in Greece, and consequently in a mixing of their genetic material. This hypothesis is confirmed by the absence of correlation between genetic distances and geographical origin of the specimens studied.

*Key words:* Aegean region, cytochrome *b*, Mediterranean, phylogeography

### INTRODUCTION

*Mauremys caspica* (Gmelin, 1774), *Mauremys rivulata* (Valenciennes, 1833) and *Mauremys leprosa* (Schweigger, 1812) are the sole European representatives of the diverse family Bataguridae. The family consists of 23 genera, distributed in the Palearctic region, with the exception of the genus *Rhinoclemmys*, which is distributed in Central and South America (Pough *et al.*, 1998; Fritz, 2001). The systematic position of the family is very problematic (McDowell, 1964; Gaffney & Meylan, 1988; Pough *et al.*, 1998; Fritz, 2001). It has been traditionally considered to be a subfamily of Emydidae (Hirayama, 1984; Iverson, 1992), or a separate paraphyletic family (Gaffney & Meylan, 1988; Pough *et al.*, 1998), but nowadays the opinion of other authors (Shaffer *et al.*, 1997; Fritz, 2001) - who consider Bataguridae as a separate monophyletic family - prevails, although they all agree that to resolve this issue, additional data from more complete sampling are required. The family Bataguridae is known at least from the Eocene in the Old World and the Nearctic. It is possible that the Paleocene “Emydidae”, described from China, actually belong to the Bataguridae family (Fritz, 2001). The genus *Mauremys* is known in the Western Palearctic from the Oligocene (Fritz, 2001), but

Melentis (1966) places its origin earlier in the Eocene. Prior to the Pleistocene, it was widely distributed in Europe, North Africa and the Arabian Peninsula.

Until very recently *M. rivulata* and *M. leprosa* were treated as subspecies of *M. caspica*. *Mauremys leprosa* was the first to be raised to species level. According to Fritz (2001), this elevation had been considered by Boulenger (1889) and later by Siebenrock (1909), but was not widely acknowledged until after 1980 (Busack & Ernst, 1980). It was based on morphometric studies as well as on the biochemical studies of Merkle (1975). *Mauremys leprosa* is geographically separated from the other two species by a gap in the present distribution of the genus (Fig. 1). According to Busack & Ernst (1980), the geographic isolation, which led to cessation of gene flow, started in the Pliocene.

*Mauremys rivulata* was raised to the species level more recently (Fritz & Wischuf, 1997). The authors stated that morphometric features could not separate the two species, but suggested species status on the basis of the colour pattern of the carapace and plastron. Although the two species are separated by geographic barriers (Fritz & Wischuf, 1997) and occupy ecologically different habitats (Busack & Ernst, 1980), a narrow contact zone exists, from which Fritz & Wischuf (1997) report two hybrids.

Apart from the morphological studies (Busack & Ernst, 1980; Fritz & Wischuf, 1997; Tok, 1999), Merkle (1975) examined these species by protein electrophoresis. He examined 17 proteins and found that *M. caspica*

*Correspondence:* G. Mantziou, Natural History Museum of Crete, University of Crete, Knossou Av., P. O. Box 2208, GR71409 Irakleio, Crete, Greece. E-mail: mantziou@nhmc.uoc.gr; mantziou@edu.biology.uoc.gr



and *M. rivulata* were identical; *M. leprosa* shared only 13 of these proteins with the other two taxa.

Fritz and Wischuf (1997) noted that the coloration of specimens preserved in ethanol degrades and is not as clear in old animals as it is in young animals. Moreover, turtles of the genus *Mauremys* exhibit great intraspecific variation in colour patterns (Schleich *et al.*, 1996). There are no molecular studies on the Mediterranean *Mauremys* species. We therefore considered that the use of a molecular approach to independently test the present taxonomy would be of great interest. In the present study we investigate the intraspecific relationships of Aegean *M. rivulata* and their relation to the other two Mediterranean *Mauremys* species. We address questions on genetic distances among the species and attempt a reconstruction of their phylogenetic relationships.

We use partial sequences of cytochrome-*b* (cyt-*b*) of the mitochondrial DNA (mtDNA), a gene already used in several similar studies (Lamb *et al.*, 1994; Lamb & Lydeard, 1994; Lenk *et al.*, 1998; Lenk *et al.*, 1999). Mitochondrial DNA is a very useful tool in detecting genetic differences and phylogeographic patterns at the intraspecific level, or in closely related species, due to its non-recombining mode of inheritance, rapid pace of

evolution and extensive intraspecific polymorphism (Avisé *et al.*, 1987). Mitochondrial DNA evolution rate appears significantly slower in Testudines, relative to other groups of vertebrates (Avisé *et al.*, 1992; Lamb *et al.*, 1994; Lenk *et al.*, 1999). Nevertheless, mtDNA can be very informative in cases where morphological data seem to be inconclusive (Lenk *et al.*, 1998), which is the case with *Mauremys* species (Fritz & Wischuf, 1997).

## MATERIALS AND METHODS

### SAMPLES

Twenty-eight specimens of *Mauremys* were collected from 20 localities (Table 1). Of these localities, 24 contained *M. rivulata*, two contained *M. caspica* and two contained *M. leprosa*. Two published sequences of other Batagurids were used in the analysis database: *Heosemys spinosa* (GenBank U81362, Shaffer *et al.*, 1997) and *Cuora aurocapitata* (GenBank AF043262, Wu *et al.*, unpublished).

Homologous sequences of the emydid turtle *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758) and the tortoise *Testudo marginata* (Schoepff, 1795) were included in the study as outgroups.

TABLE 1. Museum number, exact locality and accession number of each specimen, used in the analysis (code is used in Figs. 1, 3, 4, 5 and Table 2)

Species	Museum number	Locality	Code	Accession number
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.41	Greece, Crete, Almyros River	1	AF487640
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.26	Greece, Crete, Almyros River	2	AF487638
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.16	Greece, Crete, Almyros River	3	AF487639
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.125	Greece, Crete, Preveli	4	AF487633
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.71	Greece, Crete, Gavdos	5	AF487637
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.66	Greece, Crete, Gavdos	6	AF487641
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.93	Greece, Crete, Krya Vrysi	7	AF487632
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.45	Greece, Crete, Zakros	8	AF487627
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.79	Greece, Crete, Georgioupoli	9	AF487629
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.77	Greece, Crete, Georgioupoli	10	AF487628
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.75	Greece, Crete, Akrotiri	11	AF487625
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.128	Greece, Chios isl.	12	AF487630
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.127	Greece, Chios isl.	13	AF487631
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.98	Greece, Lesbos isl.	14	AF487636
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.53	Greece, Kyklades, Naxos isl.	15	AF487634
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.83	Greece, Dodekanisa, Rodos isl.	16	AF487635
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.100	Greece, Dodekanisa, Icaria isl.	17	AF487619
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.103	Greece, Samos isl.	18	AF487622
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.104	Greece, Samos isl.	19	AF487620
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.132	Greece, Dodekanisa, Kos isl.	20	AF487621
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.135	Greece, Thessalia, Larisa	21	AF487623
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.136	Greece, Thessalia, Larisa	22	AF487626
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.137	Greece, Peloponnisos, Kakkavas	23	AF487624
<i>Mauremys rivulata</i>	NHMC 80.3.15.56	Jordan, 25 km south of Jarash	24	AF487642
<i>Mauremys caspica</i>	NHMC 80.3.112.1	Syria, 5 km after As Suwar towards Marqadah	25	AF487644
<i>Mauremys caspica</i>	NHMC 80.3.112.62	Syria, lake Al Asad	26	AF487643
<i>Mauremys leprosa</i>	NHMC 80.3.113.119	Morocco, Qued Tensift	27	AF487645
<i>Mauremys leprosa</i>	NHMC 80.3.113.120	Morocco, Qued Tensift	28	AF487646
<i>Emys orbicularis</i>	NHMC 80.3.16.6	Greece, Thessalia, Larisa	29	AF487648
<i>Emys orbicularis</i>	NHMC 80.3.16.7	Greece, Thessalia, Larisa	30	AF487649
<i>Testudo marginata</i>	NHMC 80.3.22.6	Greece, Kythira isl.	31	AF487647

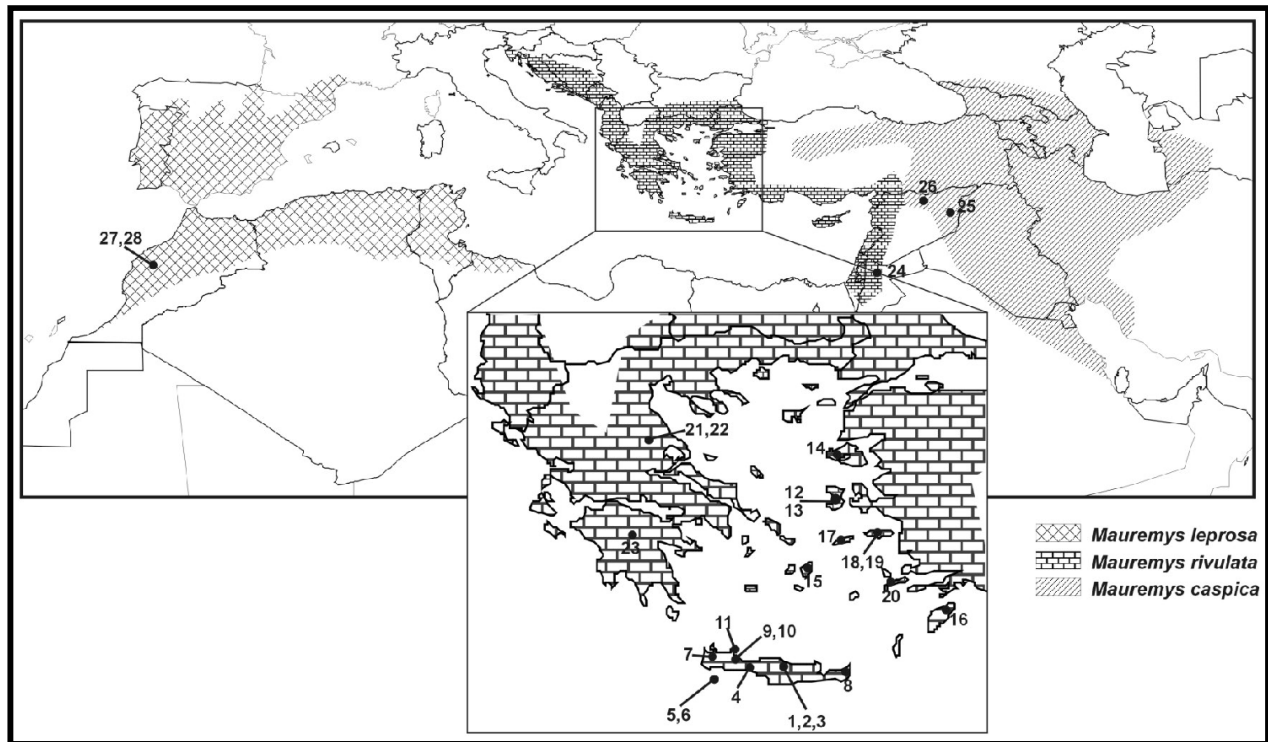


FIG. 1. Present distribution of the three Mediterranean *Mauremys* species and geographic origin of the studied specimens (numbers correspond to the code listed in Table 1).

This material was collected from 1999 to 2001 during several field trips. The geographical origin of the studied specimens is shown in Fig. 1.

Blood samples were obtained from every animal, except from animals with numbers NHMC 80.3.112.62, NHMC 80.3.15.98 and NHMC 80.3.22.6, which died and from which tissue sample was isolated and kept in ethanol (95%). The blood was collected by coccygeal vein puncture as described by Haskell & Porkas (1994), preserved in ethanol and stored at 4°C. After blood sampling the animals were released. Museum numbers were given to each animal that was captured and although they were released the numbers still correspond to the tissue samples taken from each one (Table 1).

#### DNA EXTRACTION, AMPLIFICATION AND SEQUENCING

Blood samples were first centrifuged at 13 000 rpm for 4 min. Ethanol was removed and samples were left at 37°C for 1 hour. Total genomic DNA was extracted following standard proteinase-k protocol, with standard salt extraction method (Sambrook *et al.*, 1989).

PCR amplification, targeting a segment of the *cyt-b* gene of the mitochondrial genome (mtDNA) was done on all extractions. The universal primers L14724 and H15175 (Palumbi, 1996) were used to amplify a 451 bp fragment of the mitochondrial *cyt-b* gene.

Amplifications were performed in a 10 µl total reaction volume, where 1 µl of template DNA was mixed with 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 pmol of each primer and 0.5 units of Taq Polymerase (GibcoBRL). Thermocycling was then performed in a PTC-100 (MJ-

Research) thermocycler. The cycle programme comprised of an initial denaturation step of 2 min at 94°C, followed by 35 cycles of denaturation for 1 min at 94°C, annealing for 1 min at 50°C, extension for 1 min at 72°C and a final extension at 72°C for 10 min.

Sequencing of double-stranded DNA was performed in both directions in a PE-ABI377 sequencer (using dye-terminator chemistry). The primers in the sequencing reactions were the same as in the amplification procedure.

#### SEQUENCES ALIGNMENT AND PHYLOGENETIC ANALYSIS

Multiple sequence alignment was performed using a ClustalX program package (version 1.8: Thompson *et al.*, 1997), using the default parameters, alternative gap opening and gap extension penalties, with minor modifications made by eye.

Pairwise sequence comparisons were made for the *cyt-b* data set using MEGA (v.2, Kumar *et al.*, 2001) in order to determine the number, nature, distance and distribution of base substitutions. Genetic distance was estimated using the Kimura two-parameter model (Kimura, 1980).

Evolutionary relationships, which result from DNA sequence data, are reliable only if sites are not saturated by multiple substitutions (Swofford *et al.*, 1996). To assess potential saturation of substitutions of the *cyt-b* sequences, the numbers of transitions (Ts) and transversions (Tv) were plotted against the corresponding uncorrected *P*-distances for all pairwise comparisons.

Phylogenetic relationships among specimens were inferred via neighbour-joining (NJ, Saitou & Nei 1987), maximum parsimony (MP, Swofford *et al.*, 1996), and maximum likelihood methods (ML, Felsenstein 1981). NJ trees were implemented by MEGA (v. 2.0, Kumar *et al.*, 2001) using Kimura's (1980) two-parameter distance estimate, even though the distance metric used in NJ had no effect on topology. MP and ML trees were constructed using PAUP (Windows Version 4.0b8a, Swofford, 2002).

Nucleotides were used as discrete, unordered characters. The shortest tree was looked for with the branch and bound search. When more than one minimal length tree was found, the strict consensus tree was presented. Confidence estimates were obtained via bootstrapping with 1000 replicates (Felsenstein, 1985).

For maximum likelihood (ML) analysis (Felsenstein, 1981), the best fit model of DNA substitution and the parameter estimates used for tree construction were chosen by performing hierarchical likelihood ratio tests (Huelsenbeck & Crandall, 1997) using Modeltest 3.06 (Posada & Crandall, 1998). Heuristic ML searches were performed with 10 replicates of random sequence addition and tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping. ML bootstraps employed 1000 iterations. The model parameters (substitution rate matrix, gamma distribution approximation with four rate classes, and empirical nucleotide frequencies) were estimated initially from the starting trees generated by the approach described above (Huelsenbeck & Crandall, 1997). These estimates were used in a ML analysis to produce a tree from which the parameters were then reestimated. In an iterative fashion, these steps were repeated until the ML score converged to its maximum value (Swofford *et al.* 1996).

A minimum spanning network was constructed among *M. rivulata* haplotypes, by using Arlequin v.2000 (Schneider *et al.*, 2000).

Tajima's relative rate test (Tajima, 1993; Nei & Kumar, 2000) was carried out using MEGA (v.2.0) in order to assess differences in rates among separate lineages. Statistical estimation of the validity of the molecular clock hypothesis was performed using the  $\chi^2$  test proposed by Fitch (1976). In addition, the maximum likelihood model was used to test the null hypothesis that the sequences were evolving at constant rates and therefore fit a molecular clock (Muse & Weir, 1992). This hypothesis may be tested once we have chosen one of the models of evolution, simply calculating the log likelihood score of the chosen model with the molecular clock enforced and comparing it with the log likelihood previously obtained without enforcing the molecular clock. In this case, the molecular clock is the null hypothesis. The number of degrees of freedom is the number of OTUs - 2. It should be mentioned that in this analysis we used not only the unique haplotypes, but all 33 sequences.

Clock assumptions must be treated cautiously since the differences in mtDNA evolution in higher vertebrate

groups have not yet been fully identified, and many studies have shown considerable rate heterogeneity (Hillis *et al.*, 1996). Nevertheless, the use of clock assumptions for closely related taxa is generally considered to be more reliable than for distantly related taxa (Caccone *et al.*, 1997), which stems from the premise that rates of evolution of a particular gene are likely to be stable in closely related taxonomic groups, with similar life histories, metabolic rates, and generation times. In this respect, the estimation of "local" rates for closely related taxa might be preferable over a "universal" rate (Hillis *et al.*, 1996). In the present study we use an evolutionary rate suggested for turtle mtDNA (Avisé *et al.*, 1992; Lamb *et al.*, 1994; Lenk *et al.*, 1999), instead of the universal rate.

The published sequence used in the relative rate test as outgroup (one specimen), was that of *Staurotypus triporcatus* (GenBank U81349, Shaffer *et al.*, 1997).

The sequence data from this study were deposited in the GenBank Data library under the accession numbers AF487619–AF487649.

## RESULTS

### BASE COMPOSITION

A total of 11 unique haplotypes from the 28 specimens of *Mauremys* were obtained in this study (Table 2), the lengths of which ranged from 365 to 427 bp. Within the *cyt-b* gene of the presented sequences, no insertions, no deletions and no premature stop codons were encountered.

A total of 435 base pairs were aligned, of which 42 sites (9.65%) were variable among the *Mauremys* species (26.66% including outgroups) and 25 (5.75%) were parsimony informative (16.78% including outgroups). Nine (21.43%) of the 42 variable positions represent changes in the first codon position, 8 (19.05%) in the second and 25 (59.52%) in the third.

Mean base composition of the fragment of *cyt-b* of the three codon positions is provided in Table 3. There is a strong bias in base composition (Bias C of Irwin *et al.*, 1991), a feature characteristic of *cyt-b* and other mitochondrial protein-coding genes in mammals and reptiles. This fact supports the authenticity of the mitochondrial sequences (Irwin *et al.*, 1991; McGuire & Heang, 2001; Lenk *et al.*, 2001; Surget-Groba *et al.*, 2001). As expected, the abundance of G's was low (12.9%), whereas the percentages of A, T and C were quite similar (26.9–31.0%). However, a significant compositional bias exists at the second and especially the third codon position. The frequency of guanine at the first position is 21.1%, while a marked under-presentation of guanine was observed at both second (16.2%) and third position (1.8%).

### GENETIC DIVERGENCE AND SATURATION

Summarized Kimura two-parameter distances between all pairs are given in Table 4. Sequence divergence ranged from 0.24% within *M. rivulata*

TABLE 2. Grouping of selected *Mauremys* samples into 11 unique haplotypes (numbers in parenthesis correspond to the code listed in Table 1)

Haplotype	Samples	Frequency
<i>M. rivulata</i>		
h1	Samos (19)	25%
	Akrotiri (11)	
	Kos (20)	
	Gavdos (5)	
	Gavdos (6)	
	Krya Vrysi (7)	
	h2	
Samos (18)		
Larissa (21)		
Larissa (22)		
Peloponissos (23)		
Jordan (24)		
Preveli (4)		
h3	Chios (13)	8.33%
	Lesvos (14)	
h4	Zakros (8)	12.50%
	Georgiupoli (9)	
	Georgiupoli (10)	
h5	Naxos (15)	8.33%
	Chios (12)	
h6	Rodos (16)	4.16%
h7	Almyros (1)	12.50%
	Almyros (2)	
	Almyros (3)	
<i>M. caspica</i>		
h8	Syria (25)	50%
h9	Syria (26)	50%
<i>M. leprosa</i>		
h10	Morocco (27)	50%
h11	Morocco (28)	50%

haplotypes to 16.97% between *E. orbicularis* and *M. leprosa*. If we consider only *Mauremys* species, sequence divergence ranged from 0.24% (within *M. rivulata*) to 7.45% between *M. leprosa* and *M. caspica*.

The results of saturation analysis are presented in Fig 2. Both transitions and transversions show an approxi-

TABLE 3. Percentage base composition at first, second and third codon position for all 33 specimens. Compositional bias index (CBI) is calculated as  $C = (2/3) \sum |c_i - 0.25|$  where C is the compositional bias index and  $c_i$  the frequency of *i*th base (Irwin *et al.*, 1991).

Nucleotide	Position			Mean
	First	Second	Third	
A	30.0	21.4	40.8	31.0
T	26.8	37.5	16.6	26.9
C	22.1	24.9	40.8	29.2
G	21.1	16.2	1.8	12.9
CBI	0.091	0.167	0.421	

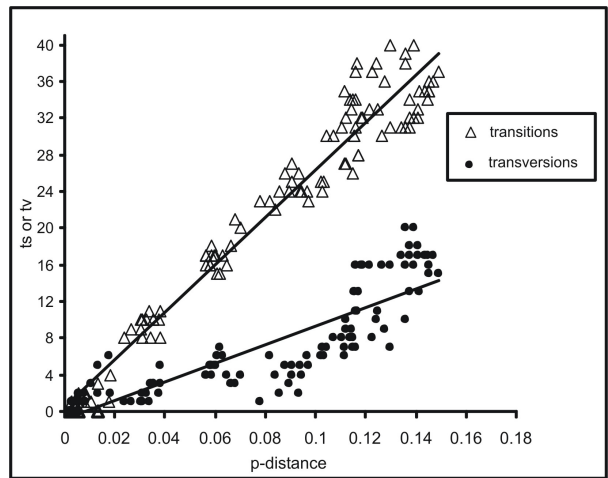


FIG. 2. Relationships between genetic distance, transitions and transversions.

mately linear relationship with distances, which indicates that saturation has not occurred.

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS

For the phylogenetic analyses, a data set of 16 *cyt-b* sequences (11 unique haplotypes of *Mauremys* spp.,

TABLE 4. Genetic distances (Kimura two-parameter) between the different taxa. In-group sequence divergence is given in diagonal. The range of genetic distances is given in the parentheses.

	<i>M. rivulata</i>	<i>M. caspica</i>	<i>M. leprosa</i>	<i>C. aurocapitata</i>	<i>H. spinosa</i>	<i>T. marginata</i>	<i>E. orbicularis</i>
<i>M. rivulata</i>	0.7 (0.24-1.78)						
<i>M. caspica</i>	3.36 (2.45-3.95)	1.83					
<i>M. leprosa</i>	6.16 (5.9-6.66)	7.14 (6.83-7.45)	0.28				
<i>C. aurocapitata</i>	9.56 (8.41-10.26)	8.94 (8.81-9.07)	10.49 (10.34-10.63)	n/c			
<i>H. spinosa</i>	11.49 (10.23-12.37)	11.03 (10.56-11.5)	12.53 (12.36-12.71)	12.91	n/c		
<i>T. marginata</i>	12.88 (12.41-13.89)	13.06 (12.36-13.76)	14.51 (14.34-14.68)	15.42	13.91	n/c	
<i>E. orbicularis</i>	14.64 (12.72-16.31)	14.54 (12.70-16.63)	16.23 (15.49-16.97)	16.44	12.87	15.47	0.25

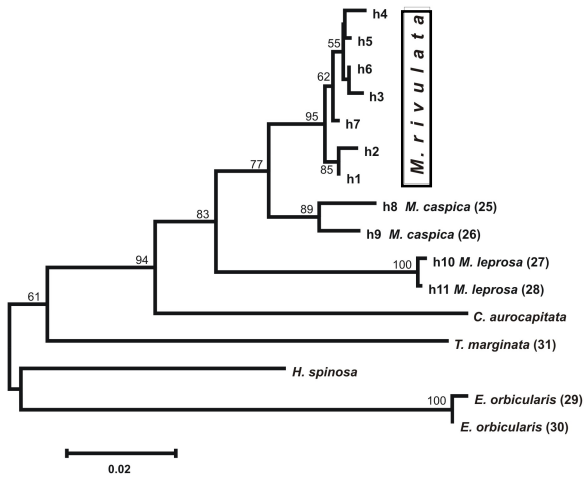


FIG. 3. Phylogenetic analysis of the mitochondrial *cyt-b* gene of *Mauremys*. Tree inferred by the neighbour-joining (NJ) method, based on 1000 replicates.

two of *Emys orbicularis* and one of *Testudo marginata* from this study, two of other Batagurid species from the literature) was used. Tree length distribution, determined from random sampling of  $10^6$  unweighted trees, was significantly skewed to the left ( $g1=-0.471$ ), suggesting strong phylogenetic signal in the data ( $P<0.01$ ; Hillis & Huelsenbeck, 1992).

In the phylogenetic analysis carried out by the neighbour joining method, the resulting tree (Fig. 3), rooted by *E. orbicularis*, showed *Mauremys* species as a monophyletic group (83% bootstrap support, b.s.). Three lineages are evident in the tree: an early offshoot of *M. leprosa* (100% b.s.), followed by *M. caspica* (89% b.s.) and *M. rivulata* (95% b.s.).

The parsimony analysis of the 16 *cyt-b* sequences, using *E. orbicularis* as outgroup, resulted in 176 equally parsimonious trees of 170 steps (consistency index  $CI=0.788$  and homoplasy index  $HI=0.212$ ), the strict consensus of which is shown (with bootstrap values) in Fig 4. The topology of this tree is similar to the NJ tree, regarding the main clades.

For the maximum likelihood analysis, likelihood ratio tests indicated that the Tamura-Nei model with general time reversible option was the most appropriate for subsequent ML analyses (Table 5). The phylogeny recovered by the ML analysis was similar to that recovered by the MP and NJ analysis and is illustrated in Fig.

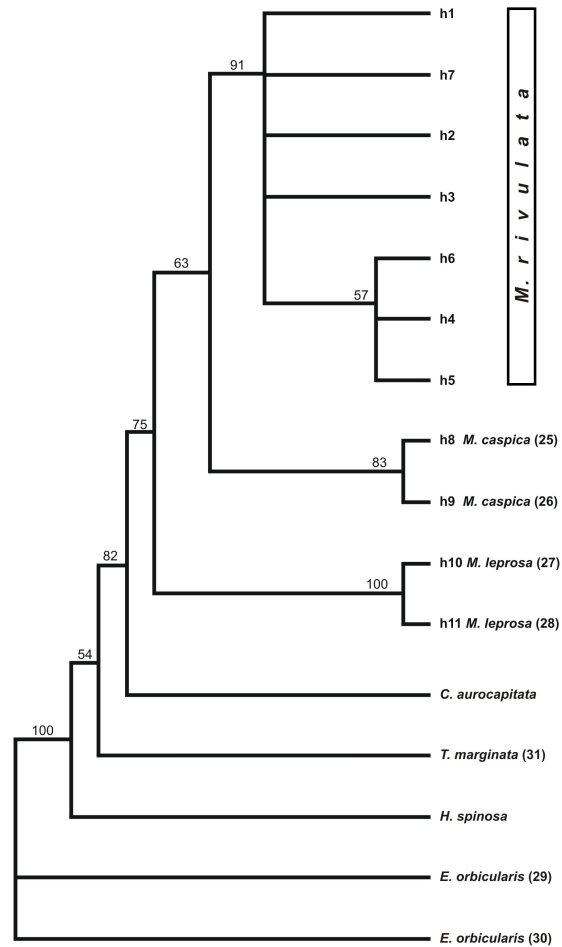


FIG. 4. A Maximum Parsimony (MP) tree derived from *cyt-b* sequences of *Mauremys* species. The strict consensus of the 176 equally most parsimonious trees is presented. Probability percentages of bootstrap replicates (1000) supporting each branching pattern are given beside the corresponding nodes (numbers correspond to the code listed in Table 1).

5. One ML tree was identified ( $-\ln L=1383.01$ ; final parameters estimates: base frequencies  $A=0.30$ ,  $C=0.30$ ,  $G=0.14$ ,  $T=0.26$ ,  $a=0.3159$ ,  $P_{inv}=0.000$ , and  $A/G=3.59$ ,  $C/T=11.04$ ).

Geographic distribution of *M. rivulata* haplotypes is shown in Fig. 6. The minimum spanning network among *M. rivulata* haplotypes is presented in Fig.7.

TABLE 5. Test of hypotheses relating to the model of evolution appropriate for phylogeny reconstruction (Huelsenbeck & Crandall, 1997). *P*- values were obtained with Modeltest (Posada & Crandall, 1998).

Null hypothesis	Models compared	$-\ln L_0$	$-\ln L_1$	df	<i>P</i>
Equal nucleotide frequencies	$H_0$ :JC69, $H_1$ :F81	1513.1719	1481.9972	3	0.0000
Equal $T_i$ and $T_v$ rates	$H_0$ :81, $H_1$ :HKY85	1481.9972	1425.8398	1	0.0000
Equal $T_i$ rates	$H_0$ :HKY85, $H_1$ :TrN	1425.8398	1417.3188	1	0.0000
Equal $T_v$ rates	$H_0$ :TrN, $H_1$ :TIM	1417.3188	1416.5848	1	0.2257
Equal rates among sites	$H_0$ :TrN, $H_1$ :TrN+G	1417.3189	1387.3484	1	0.0000
Proportion of invariable sites	$H_0$ :TrN+G, $H_1$ :TrN+I+G	1387.3484	1387.2443	1	0.3241

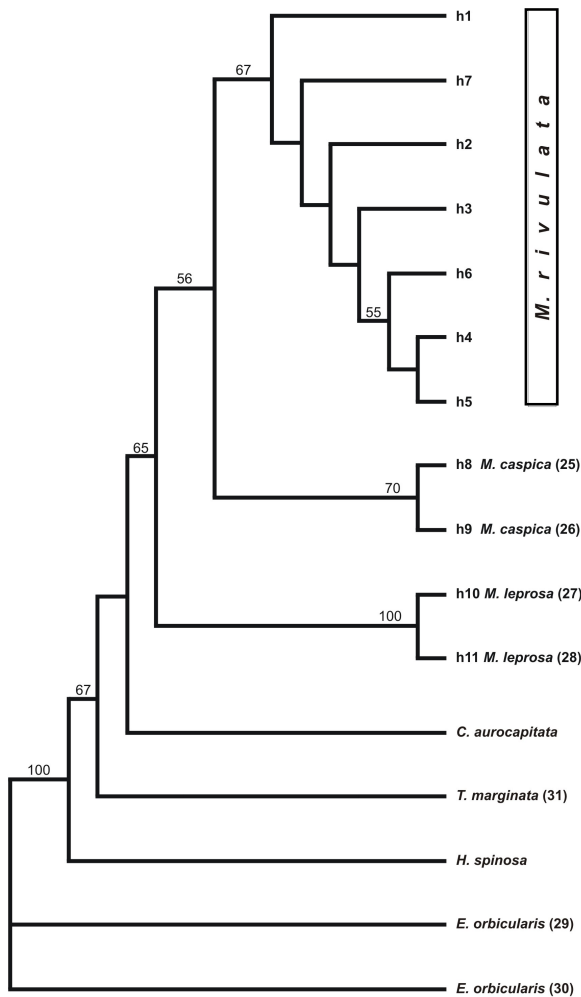


FIG. 5. A Maximum Likelihood (ML) tree derived from *cyt-b* sequences of *Mauremys* species. Probability percentages of bootstrap replicates supporting each branching pattern are given beside the corresponding nodes (numbers correspond to the code listed in Table 1). Bootstrap values >50% are shown.

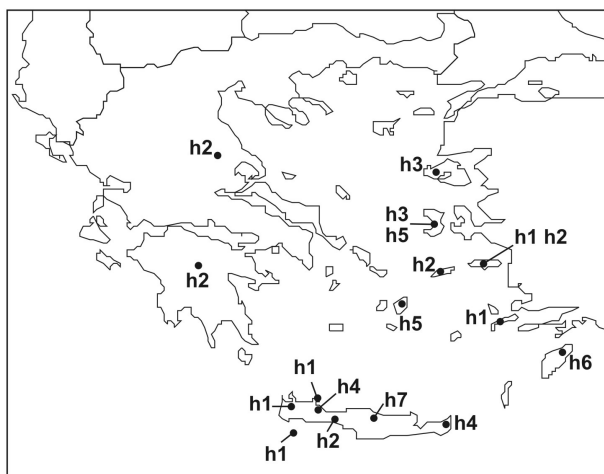


FIG. 6. Geographic distribution of *M. rivulata* haplotypes. Note the absence of geographic patterns.

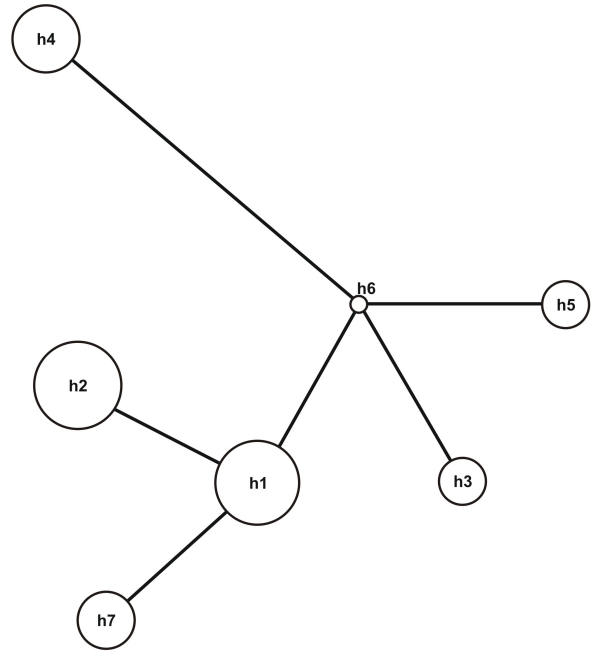


FIG. 7. Minimum spanning network for the 7 *M. rivulata* haplotypes. Size of each circle is proportional to the frequency of the haplotypes.

TABLE 6. Estimated splitting time between clades. The splitting time is estimated using a divergence rate of 0.3%–0.4% per Myr. A: *M. rivulata* clade, B: *M. caspica* clade, C: *M. leprosa* clade.

Clades	Da	Splitting Time	
		Rate: 0.3% per Myr	Rate: 0.4% per Myr
(A&B) vs. C	5.88%	19.6 Myr ago	14.7 Myr ago
A vs. B	2.1%	7 Myr ago	5.3 Myr ago

Tajima’s relative rate test was carried out for many different pair-combinations of the examined clades and resulted that all these clades evolve with the same rate ( $\chi^2 < 3.84, P > 0.05$ ). The likelihood ratio test was employed to investigate the rate of homogeneity for the analysed species (Huelsenbeck & Crandall, 1997). Because the simpler (clocklike) tree cannot be rejected at a significance level of 5% (LRT=17.66, df=31,  $\chi_{critical} = 19.28$ ), we do not reject the application of a molecular clock to the species used in the analysis.

Since our results are compatible with the molecular clock hypothesis, we can use the suggested evolving rate for mtDNA of Emydidae (0.3%–0.4% per Myr) (Lenk *et al.*, 1999). The resulting estimated splitting times between clades are summarized in Table 6.

DISCUSSION

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS

Our results indicate that *M. rivulata*, *M. caspica* and *M. leprosa* are indeed genetically isolated taxa. These three taxa constitute a monophyletic group, which splits



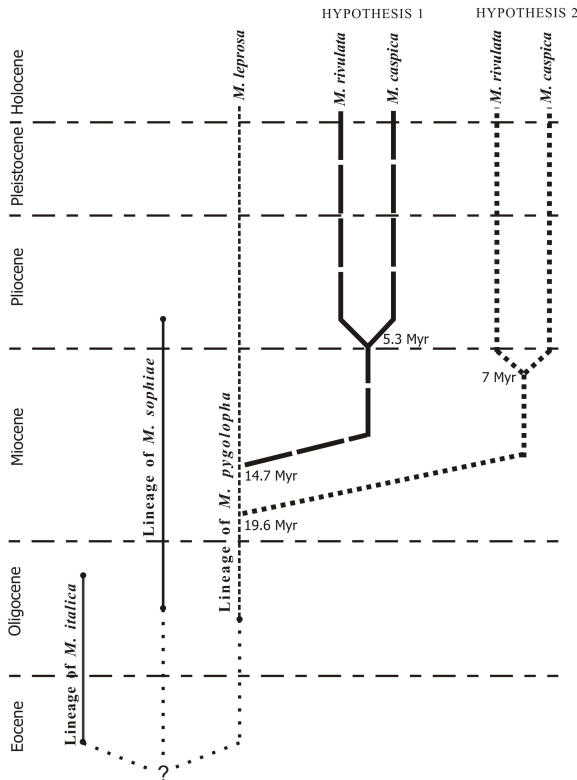


FIG. 8. Alternative hypothesis on the phylogenetic relationships of the three species in question. By applying mtDNA evolutionary rate of 0.4% per Myr or of 0.3% per Myr, we result in hypothesis 1 or hypothesis 2, respectively.

into two genealogical lineages. The first corresponds to the lineage leading to *M. leprosa*, whereas the second corresponds respectively to the lineage from which the *caspica-rivulata* group emerged. The very small within-group divergence of *M. rivulata* and the multifold between-group divergence (3.36% between *M. caspica* and *M. rivulata*) support the elevation of *M. rivulata* to the species level, as suggested by Fritz & Wischuf (1997), although further sampling in the area of contact is necessary to fully resolve this issue.

The elevation of *M. leprosa*, which was based on electrophoretic and morphometric data (Merkle, 1975; Busack & Ernst, 1980), is further supported from our results.

Specimens of *M. rivulata* (from the Middle East to Greece) cluster with a small intraspecific differentiation ranging from 0.24% to 1.78% (mean=0.7%). This divergence is not related to the geographic origin of the specimens (see Fig. 6, Fig. 7 and Appendix 1). The small intraspecific divergence observed in *M. rivulata*, is comparable to results reported by Lenk *et al.* (1999) for *Emys orbicularis*. The authors compared a great number of populations from Europe and N. Africa, which split to seven groups of haplotypes without being separated geographically.

In general, phylogeographic patterns are considered to be the result of a multifactorial process, which is somewhat arbitrary and variable among different species (Taberlet *et al.*, 1998). The combination of existing

paleontological data with the results we present, permits a preliminary interpretation of the phylogeographic pattern of *M. rivulata* in the Eastern Mediterranean and especially in the area of the Aegean Sea.

According to Lenk *et al.* (1999), the climate change in Europe 3.2 Myr ago triggered a sudden radiation of *Emys orbicularis*. During the climatic oscillations of the Pleistocene, the range of *E. orbicularis* probably fragmented recurrently, with isolated populations along a slender belt throughout southern Europe. This belt has been shaped by cold climates to the north and by barriers of inappropriate habitat to the south. Thus, southern Italy and Greece served as refugia for the populations of *E. orbicularis*.

Kotsakis (1980) claimed that the lower Pleistocene glaciations, which provoked the southward shift of distribution of *E. orbicularis* in Italy, drove *Mauremys* populations to extinction in the peninsula.

Thereby, the main factor that influenced the present distribution of *Mauremys* in the Mediterranean region, and particularly the distribution of *M. rivulata* in the Balkans, is climatic change, which prevailed during the glacial periods of the Pleistocene. The cold periods resulted in the latitudinal shift of *Mauremys* populations in the Italian Peninsula towards the south, and ultimately led to their extinction. Something similar occurred in the Balkan Peninsula with *M. rivulata*, resulting in a latitudinal shift of the populations towards the south and east, but it did not result in extinction since they found refuges on the coast of Asia Minor and in the Aegean islands.

Consequently, the shifting and rearrangements of *M. rivulata* populations led to their mixing and the probable establishment of new populations on islands, where they did not exist before and where populations of *E. orbicularis* were not favoured due to ecological factors. According to Lenk *et al.* (1999), *E. orbicularis* is more favoured by continental climate conditions.

On the other hand, the genetic distances observed among *M. rivulata* haplotypes, and their relationships based on minimum spanning network, are not related to respective geographic distances. This fact cannot be explained by the vicariance approach of the distributional pattern of *M. rivulata*, but can be better explained by a dispersal model. To propose a dispersal model we need to have evidence that *M. rivulata* is easily dispersed.

According to Lenk *et al.* (1999), marine straits represent no absolute barriers for *E. orbicularis* and coastal corridors could have promoted genetic exchange. This is probably also the case for *M. rivulata* since this species inhabits also brackish waters (Gasith & Sidis, 1983; Sidis & Gasith, 1985; Engelmann *et al.*, 1993). Consequently, the easily accessible marine straits, which appeared in the Aegean area repeatedly during Pliocene and Pleistocene, and the great dispersal capacity of *M. rivulata* through coastal corridors, are supporting the dispersal model. The extant populations of *M. rivulata* are probably still under the influence of this dispersal procedure.

PHYLOGENETIC RELATIONS INFERRED BY  
PALAEOLOGICAL DATA

Bergounioux (1955) suggested that there are three parallel evolutionary lines in the Western Palearctic turtles of the genus *Mauremys* (Fig. 8): (1) the lineage of *Mauremys italica*, which starts in the Eocene with the species *M. italica* and *M. vidali* and ends in the Oligocene with *M. chainei*; (2) the lineage of *Mauremys sophiae*, which consists of *M. batalleri* from the Oligocene, goes on in the Miocene with *M. batalleri* and *M. sophiae* and ends in the Pliocene with *M. sophiae*; (3) the lineage of *M. pygolopha*, which starts in the Oligocene, with *M. subpyrenaica*, continues in the Miocene with *M. rotundiformis* and *M. pygolopha* and in the Pliocene with *M. romani* and *M. gaudryi*. Broin (1977) suggests that *M. romani* and *M. gaudryi* are synonymous. According to Melentis (1966), *M. steinheimensis* from the Miocene belongs to this lineage as well. Among these we can also place *M. sarmatica* from the Miocene, which is supposed to be the direct ancestor of *M. gaudryi* from the Pliocene (Kotsakis, 1980). The fossils considered most akin to the extant *Mauremys* species belong to this third lineage (Melentis, 1966; Kotsakis, 1980).

Combining our results with the available paleontological data allows us to suggest a hypothesis on the phylogenetic relationships of the three species in question. The three species share a common ancestor, which is situated in the lineage of *M. pygolopha*. The first to separate from this lineage is the branch that led to the extant *M. leprosa* with the intermediate form of *M. gaudryi* (Broin, 1977; Kotsakis, 1980). When applying the above mentioned evolutionary rate (0.3%-0.4% per Myr) to our data, the common ancestor of the two main genealogical lines dates to the Lower Miocene/Middle Miocene (from 19.8 Myr ago to 14.9 Myr ago; Fig. 8). This contradicts Busack & Ernst's (1980) suggestion that this isolation started during the Pliocene. The information on the second branch, which led to *M. caspica* and *M. rivulata*, is very restricted. The only hypothesis we may initially support is that the two species have shared a long common history. The common ancestor of the genealogical lines, which led to *M. rivulata* and *M. caspica*, is dated in the Upper Miocene/Lower Pliocene (from 7.2 Myr ago to 5.4 Myr ago). Because the lack of relevant paleontological data and geological events inhibit making a more accurate dating, further study is necessary, which will have to include more specimens of the three Mediterranean *Mauremys* species.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was partially supported by the post-graduate program "Management of marine and terrestrial biological resources" of the University of Crete and partially by the "Program for the support of young scientists" (PENED) of the Greek Ministry of Development. Many thanks to the reviewers for helpful comments on an earlier draft of this manuscript.

## REFERENCES

- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 489-522.
- Avise, J. C., Bowen, B. W., Lamb, T., Meylan, A. B. & Bermingham, E. (1992). Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: Evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. *Molecular Biology and Evolution* **9**, 457-473.
- Bergounioux, F. M. (1955). Chelonia. In *Traité de Paléontologie*. **5**, 487-544. Piveteau J. (Ed.), Paris.
- Boulenger, G. A. (1889). *Catalogue of the Chelonians, Rhynchocephalians, and Crocodiles in the British Museum (Natural History)*. London (British Museum).
- Broin, F. (1977). Contribution à l'étude des Chéloniens. Chéloniens continentaux du Crétacé supérieur et du Tertiaire de France. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle* **38**, 1-366.
- Busack, S. D. & Ernst, C. H. (1980). Variation in the Mediterranean populations of *Mauremys* Gray 1869 (Reptilia, Testudines, Emydidae). *Annals of the Carnegie Museum* **49**, 251-264.
- Caccone, A., Milinkovitch, M. C., Sbordoni, V. & Powell, J. R. (1997). Mitochondrial DNA rates and biogeography in European newts (Genus *Euproctus*). *Systematic Biology* **46**, 126-144.
- Engelmann, W. E., Fritzsche, J., Gunther, R. & Obst, F. J. (1993). *Lurche und Kriechtiere Europas*. Neumann Verlag Radebeul.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**, 368-376.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Fitch, W. M. (1976). Molecular evolutionary clocks. In *Molecular Evolution*, 160-178. Ayala, F. J. (Ed.). Sinauer, Sunderland.
- Fritz, U. (2001). *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 3/IIIA Schildkröten (Testudines) I*. AULA-Verlag.
- Fritz, U. & Wischuf, T. (1997). Zur Systematik westasiatisch-südosteuropäischer Bachschildkröten (Gattung *Mauremys*) (Reptilia: Testudines: Bataguridae). *Zoologische Abhandlungen, Staatliches Museum für Tierkunde, Dresden* **49**, 223-260.
- Gaffney, E. S. & Meylan, P. A. (1988). A phylogeny of turtles. In *The phylogeny and classification of the tetrapods. Vol.1, Amphibians, Reptiles and Birds*. Benton, M. J. (Ed.). Oxford, Clarendon Press.
- Gasith, A. & Sidis, I. (1983). The distribution and nature of the habitat of the Caspian terrapin *Mauremys caspica rivulata* (Testudines: Emydinae) in Israel. *Israel Journal of Zoology* **32**, 91-102.



- Haskell, A. & Porkas, M. A. (1994). Nonlethal blood and muscle tissue collection from Redbelly Turtles for genetic studies. *Herpetological Review* **25**, 11-12.
- Hillis, D. M., and Huelsenbeck, J. P. (1992). Signal, noise and reliability in phylogenetic analyses. *Journal of Heredity* **83**, 189-195.
- Hillis, D. M., Mable, B. K. & Moritz, C. (1996). Applications of molecular systematics: the state of the field and a look to the future. In *Molecular Systematics*. 515-543. Hillis, D. M., Moritz, C. & Mable, B. K. (Eds). Sunderland: Sinauer Associates.
- Hirayama, R. (1984). Cladistic analysis of batagurine turtles (Batagurinae: Emydidae: Testudinoidea): a preliminary result. *Studia Geologica Salmanticensia* vol. especial **1**, 141-157.
- Huelsenbeck, J. P. & Crandall, K. A. (1997). Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annual Review of Ecology and Systematics* **28**, 437-466.
- Irwin, D. M., Kocher, T. D. & Wilson, A. C. (1991). Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* **32**, 128-144.
- Iverson, J. B. (1992). *A revised checklist with distribution maps of the turtles of the world*. Earlham College, Green Nature Books. Florida, USA.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**, 111-120.
- Kotsakis, T. (1980). Révision des tortues (Emydidae, Testudinidae, Trionychidae) du Plio-Pléistocène de Valdarno supérieur (Toscane, Italie). *Quaternaria* **22**, 11-37.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. & Nei, M. (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* **17**, 1244-1245.
- Lamb, T. & Lydeard, C. (1994). A molecular phylogeny of the gopher tortoises, with comments on familial relationships within Testudinoidea. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **3**, 283-291.
- Lamb, T., Lydeard, C., Walker, R. B. & Gibbons, J. W. (1994). Molecular systematics of map turtles (*Graptemys*): A comparison of mitochondrial restriction site versus sequencing data. *Systematic Biology* **43**, 543- 559.
- Lenk, P., Fritz, U., Joger, U. & Wink, M. (1999). Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758). *Molecular Ecology* **8**, 1911- 1922.
- Lenk, P., Joger, U., Fritz, U., Heidrich, P. & Wink, M. (1998). Phylogenetic patterns in the mitochondrial cytochrome *b* gene of the European pond turtle (*Emys orbicularis*): first results. In *Proceedings of the Emys Symposium Dresden 96. Mertensiella* **10**, 159-175. Fritz, U., Joger, U., Podloucky, R. & Servan, J. (Eds).
- Lenk, P., Kalyabina, S., Wink, M. & Joger, U. (2001). Evolutionary relationships among the true vipers (Reptilia: Viperidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**, 94-104.
- McDowell, S. B. (1964). Partition of the genus *Clemmys* and related problems in the taxonomy of the aquatic Testudinidae. *Proceedings of the Zoological Society of London* **143**, 239-279.
- McGuire, J. A. & Heang, K. B. (2001). Phylogenetic systematics of Southeast Asian flying lizards (Iguania: Agamidae: Draco) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Biological Journal of the Linnean Society* **72**, 203-229.
- Melentis, J. K. (1966). Studien über fossile Vertebraten Griechenlands: 10. *Clemmys caspica* aus dem Pleistozän des Beckens von Megalopolis im Peloponnes (Griechenland). *Annales Géologiques des Pays Helléniques* **17**, 169-181.
- Merkle, D. A. (1975). A taxonomic analysis of the *Clemmys* complex (Reptilia: Testudines) using starch gel electrophoresis. *Herpetologica* **31**, 162-166.
- Muse, S. V. & Weir, B. S. (1992). Testing for equality of evolutionary rates. *Genetics* **132**, 269-276.
- Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press.
- Palumbi, S. R. (1996). Nucleic Acids II: the Polymerase Chain Reaction. In *Molecular Systematics*, 205-248. Hillis, D. M., Moritz, C. & Mable, B. K. (Eds). Sunderland: Sinauer Associates.
- Posada, D. & Crandall, K. A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817-818.
- Pough, F. H., Andrews, R. M., Cadle, J. E., Crump, M. L., Savitzky, A. H. & Wells, K. D. (1998). *Herpetology*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Schleich, H. H., Kästle, W. & Kabisch, K. (1996). *Amphibians and Reptiles of North Africa*. Koeltz Scientific Books, Koenigstein, Germany.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. (2000). *ARLEQUIN version 2.001: A software for population genetics data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Shaffer, H. B., Meylan, P. & McKnight, M. L. (1997). Tests of turtle phylogeny: molecular, morphological, and paleontological approaches. *Systematic Biology* **46**, 235-268.
- Sidis, I. & Gasith, A. (1985). Food habits of the Caspian terrapin (*Mauremys caspica rivulata*) in unpolluted and polluted habitats in Israel. *Journal of Herpetology* **19**, 108-115.
- Siebenrock, F. (1909). Synopsis der rezenten Schildkröten, mit Berücksichtigung der in historischer Zeit ausgestorbenen Arten. *Zoologische Jahrbücher* **10**, 427-618.
- Surget-Groba, Y., Heulin, B., Guillaume, C. P., Thorpe, R. S., Kypriyanova, L., Vogrin, N., Maslak, R., Mazzotti, S., Venczel, M., Ghira, I., Odierna, G., Leontyeva, O., Monney, J. C. & Smith, N. (2001). Intraspecific

- phylogeography of *Lacerta vivipara* and the evolution of viviparity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **18**, 449-459.
- Swofford, D. L. (2002). *PAUP 40b8a: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods)*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Swofford, D. L., Olsen, G. J., Waddell, P. J. & Hillis, D. M. (1996). Phylogenetic inference. In *Molecular Systematics*, 407-514. Hillis, D. M., Moritz, C. & Mable, B. K. (Eds). Sunderland: Sinauer.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. G. & Cosson, J. F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**, 453-464.
- Tajima, F. (1993). Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis. *Genetics* **135**, 599-607.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Research* **24**, 4876-4882.
- Tok, C. V. (1999). The taxonomy and ecology of *Mauremys caspica rivulata* Valenciennes, 1833 (Testudinata: Testudinidae) on Resadiye (Dacta) Peninsula. *Turkish Journal of Zoology* **23**, 17-21.

Accepted 27.1.03

#### APPENDIX 1

Genetic distances (Kimura two-parameter) between the *Mauremys* haplotypes and other taxa used in the analysis. *M.r.*, *M. rivulata*; *M.c.*, *M. caspica*; *M.l.*, *M. leprosa*; *C.a.*, *C. aurocapitata*; *H.s.*, *H. spinosa*; *T.m.*, *T. marginata*; *E.o.*, *E. orbicularis*.

	h1 ( <i>M.r.</i> )	h2 ( <i>M.r.</i> )	h3 ( <i>M.r.</i> )	h4 ( <i>M.r.</i> )	h5 ( <i>M.r.</i> )	h6 ( <i>M.r.</i> )	h7 ( <i>M.r.</i> )	h8 ( <i>M.c.</i> )	h9 ( <i>M.c.</i> )	h10 ( <i>M.l.</i> )	h11 ( <i>M.c.</i> )	<i>C.a.</i>	<i>H.s.</i>	<i>T.m.</i>	<i>E.o.</i> (30)
h1 ( <i>M.r.</i> )															
h2 ( <i>M.r.</i> )	0.24														
h3 ( <i>M.r.</i> )	1.31	1.78													
h4 ( <i>M.r.</i> )	0.84	1.35	0.79												
h5 ( <i>M.r.</i> )	0.55	1.07	0.53	0.53											
h6 ( <i>M.r.</i> )	0.28	0.80	0.26	0.53	0.26										
h7 ( <i>M.r.</i> )	0.27	0.79	0.52	0.80	0.53	0.53									
h8 ( <i>M.c.</i> )	3.54	3.54	3.28	3.37	3.07	3.06	3.83								
h9 ( <i>M.c.</i> )	2.39	2.66	3.79	3.73	3.40	3.08	3.02	1.81							
h10 ( <i>M.l.</i> )	6.07	6.16	6.04	5.77	5.79	5.79	6.32	7.00	6.45						
h11 ( <i>M.l.</i> )	5.62	5.98	5.87	5.61	5.61	5.61	5.87	6.80	6.60	0.28					
<i>C. a.</i>	8.76	9.04	9.03	9.33	8.94	8.58	7.77	8.39	8.19	9.72	9.46				
<i>H. s.</i>	10.73	11.02	11.21	10.33	10.26	10.23	9.39	9.68	10.45	11.46	11.15	11.58			
<i>T. m.</i>	11.62	11.64	12.40	11.48	11.41	11.38	11.17	12.26	11.20	12.75	12.95	13.6	12.46		
<i>E. o.</i> (30)	11.58	11.82	13.56	14.08	13.73	13.41	12.64	14.33	11.53	13.74	14.53	14.53	11.68	13.58	
<i>E. o.</i> (29)	11.88	12.13	13.90	14.45	14.08	13.76	12.98	14.68	11.53	14.12	14.90	14.53	11.68	13.90	0.25

## PRIMER NOTE

# Isolation and characterization of six polymorphic microsatellite markers in the freshwater turtle *Mauremys rivulata* (Testudines: Geoemydidae)

G. MANTZIOU,\*† A. ANTONIOU,†§ N. POULAKAKIS,\*† G. GOULIELMOS,‡  
C. S. TSIGENOPOULOS,§ T. PINOU¶ and M. MYLONAS\*†

\*Natural History Museum of Crete, University of Crete, Knossos Ave., PO Box 2208, 71409 Irakleio, Crete, Greece, †Department of Biology, University of Crete, Vassilika Vouton PO Box 2208, 71409 Irakleio, Crete, Greece, ‡Department of Internal Medicine, Division of Rheumatology, Clinical Immunology and Allergy, School of Medicine, University of Crete, Voutes, 715 00 Irakleio, Greece, §Department of Genetics and Molecular Biotechnology, Hellenic Centre for Marine Research, Thalassocosmos Gournes Padiados, 71500 Irakleio, Crete, Greece, ¶Department of Biological and Environmental Sciences, Western Connecticut State University, 181 White Street, Danbury, CT 06810, USA

## Abstract

Six polymorphic microsatellite loci containing dinucleotide repeats were developed for the freshwater turtle *Mauremys rivulata*. The number of alleles ranged from five to 18. The observed and expected heterozygosities ranged from 0.19 to 0.79 and 0.46 to 0.90, respectively. These markers may serve as a valuable tool for population genetics analyses and provide information on the evolutionary history of the species.

**Keywords:** Geoemydidae, *Mauremys rivulata*, microsatellites

Received 22 February 2005; revision accepted 6 April 2005

The freshwater turtle *Mauremys rivulata* is one of the three Mediterranean species of the genus *Mauremys*. This species is distributed in Croatia, Serbia and Montenegro, Albania, Bulgaria, Greece, Cyprus, the Mediterranean coast of Turkey, Syria, Lebanon, Jordan and Israel (Wischnu & Busack 2001). Populations of *M. rivulata* have experienced a severe decline during the last decades due to anthropogenic pressure. Based on cytochrome *b* sequence data (Mantziou *et al.* 2004), intraspecific relationships could not be clearly resolved, since the variation within *M. rivulata* was relatively small and not related to the geographical origin of the specimens. Microsatellite markers may serve as a valuable tool for the investigation of the existing genetic variability and population structure.

For the isolation of the microsatellite loci, already published protocols were followed, with some modifications. Total genomic DNA was extracted from nail samples using the Holmes–Bonner lysis solution (Holmes & Bonner 1973) and standard phenol–chloroform extraction. DNA was

digested with the restriction enzymes *AluI*, *HaeIII* and *RsaI*, and the resulting fragments, ranging from 200 to 800 bp, were ligated to double-stranded SNX linkers using high concentration DNA ligase to achieve efficient blunt-end ligation (Hamilton *et al.* 1999). Ligations were used without further purification for subtractive hybridization with 5'-biotinylated oligonucleotide primers [(GA)<sub>10</sub> and (AC)<sub>8</sub>] as the hybridization target, and with streptavidin-coated magnetic beads (Promega) as the substrate to capture genomic DNA-oligonucleotide hybrids (Kijas *et al.* 1994). Repeat-enriched DNA was rendered double-stranded and amplified in a polymerase chain reaction (PCR) using the forward SNX linker as a primer. Amplification was verified on a 2% agarose electrophoresis gel loaded with a 5- $\mu$ L aliquot. The resulting purified PCR product was then directly ligated overnight at 4 °C into the plasmid pGEM-T vector (Promega), followed by transformation in *Escherichia coli* JM109 competent cells (Promega). A total of 100 colonies were screened for dinucleotide repeats using a triple PCR technique: amplification with two primers of the vector (T7 and SP6) and one nonbiotinylated primer, such as (GA)<sub>10</sub> or (AC)<sub>8</sub>. Ten positive colonies that had at

Correspondence: G. Mantziou, Fax: +30 2810 324 366; E-mail: mantziou@nhmc.uoc.gr

## 2 PRIMER NOTE

**Table 1** Characterization of six polymorphic microsatellite loci in the freshwater turtle, *Mauremys rivulata*

Locus [GenBank ID]	Primer sequence (5'–3')	Repeat unit	Allele size range (bp)	$T_a$ (°C)	$n$	$N_a$	$H_O$	$H_E$	$P$ value for HWE test
MR-1 [AY934859]	L: 5'-FAM-TTTCTGCACCTGCTTAACTT R: 5'-CTCATGGAGGTGGTGTACT	(AC) <sub>11</sub>	222–234	56	26	5	0.577	0.716	0.3827
MR-2 [AY934860]	L: 5'-TET-ACGGAATCCTGATTAATCC R: 5'-CTTCCCTCAATACAATGGTT	(AC) <sub>9</sub>	199–229	52	23	5	0.783	0.652	0.6950
MR-3 [AY934861]	L: 5'-TET-CATTTTCTTTATCGCCTCAC R: 5'-CTTTCACAGCACAAAGTCTCA	(GT) <sub>8</sub>	181–189	55	26	5	0.192	0.468	0.0001
MR-5 [AY934862]	L: 5'-TET-TCTAGGTCGCCCTGTAGG R: 5'-CTGGGAATGTTCTGCGGTTG	(GA) <sub>18</sub>	149–189	62	27	10	0.593	0.848	0.0031
MR-8 [AY934863]	L: 5'-TET-TGCCCTCTGATGCTCTGGTG R: 5'-GCCCAAATGTCTACAAGTGTGG	(GT) <sub>32</sub> (GA) <sub>12</sub>	154–194	62	29	18	0.793	0.912	0.0001
MR-9 [AY934864]	L: 5'-FAM-CCAATGCTCCAGGCGTG R: 5'-GCCAGTCTTACTGCTGAACC	(CT) <sub>16</sub>	97–105	55.5	27	5	0.482	0.771	0.0064

L, forward primer; R, reverse primer.  $T_a$ , annealing temperature;  $n$ , sample size;  $N_a$ , number of alleles;  $H_O$ , observed heterozygosity;  $H_E$ , expected heterozygosity; HWE, Hardy–Weinberg equilibrium.

least two bands in the agarose gel were found and were sequenced according to dideoxy-chain termination methodology in a LI-COR 4200 L sequencer (Microchemistry Laboratory, IMBB-FORTH, Crete, Greece).

The PCR primers were designed in the flanking regions using the online software PRIMER version 3.0 (<http://www.genome.wi.mit.edu>) and positioned with priming sites approximately 10–100 bp away from each microsatellite in an attempt to standardize amplification products to a range between 100 and 250 bp (Table 1). Four out of the 10 sequences were not suitable for primer design, because the repeat was at the end of the sequence. The forward primer of each pair was 5'-fluorescently labelled with either FAM or TET dyes (MWG Biotech). Polymorphism was tested with a minimum of 23 individuals of *M. rivulata* from 10 Greek populations originating from the following localities: Larissa, Argos and the islands of Crete, Gavdos, Rodos, Kos and Lesvos. The PCR amplification conditions of six microsatellites were optimized using a gradient thermocycler (MyCycler™ Thermal Cycler, Bio-Rad).

Microsatellite DNA amplifications were performed in 10 µL total volume reactions containing 200 ng DNA, 0.5 µM of each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 × PCR buffer, 300 µM dNTPs and 0.2 U *Taq* DNA polymerase (Promega). After a preliminary denaturation step at 94 °C for 5 min, PCR was performed for 30 cycles of 1 min denaturing at 94 °C, 1 min at annealing temperature (Table 1) and 1 min at 72 °C. The cycling was ended with a final extension step at 72 °C for 5 min. After amplification, PCR products were mixed with loading dye (dextran blue), formamide and an internal size standard (GeneScan-500 TAMRA, Applied Biosystems), denatured for 2.5 min at 95 °C, then set on ice for 1 min and electrophoresed in a 6% denaturing polyacrylamide gel. Amplified products were resolved using

GENESCAN™ fragment analysis software on an ABI PRISM 377 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Resolved microsatellite alleles were precisely sized using the software GENOTYPER (Applied Biosystems) to calculate their number, range and distribution.

Observed and expected heterozygosities for each locus were calculated using the GENETIX software (version 4.04, Belkhir *et al.* 2000). The number of alleles per locus and the observed and expected (nonbiased, Nei 1978) heterozygosity values are listed in Table 1. All microsatellite loci were polymorphic and the number of alleles varied from five to 18. The observed heterozygosities ranged from 0.19 to 0.79 (Table 1). Linkage disequilibrium (LD) and Hardy–Weinberg exact tests were conducted using GENEPOP (version 3.4, Raymond & Rousset 1995). There was no LD between loci. Observed and expected heterozygosity values conformed to Hardy–Weinberg equilibrium only for loci MR-1 and MR-2. The heterozygote deficiency observed for the other four loci was caused possibly by population structuring (Wahlund effect), since the studied individuals belonged to distinct populations.

The microsatellites developed here represent a very powerful tool for genetic and ecological studies of the freshwater turtle, as well as for analysing intraspecific phenomena related to genetic substructuring of populations. In addition, these microsatellites may be tested and used over a larger range of species within the genus *Mauremys*, for which, no other specific microsatellite markers have been so far amplified successfully.

### Acknowledgements

This project was partially funded by the Stavros Niarchos Foundation and by the Directory of Research and Technology of Greece

(Project PENED 01ED424). We are grateful to Dr C. Mylonas (biologist) for critically reading the manuscript and the linguistic support of text.

## References

- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikli L, Bonhomme F (2000) *GENETIX, Logiciel Sous Windows™ Pour la Génétique Des Populations, Version 4.01*. University of Montpellier II, Montpellier, p. 957.
- Hamilton MB, Pincus EL, Di Fiore A, Fleischer RC (1999) Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques*, **27**, 500–507.
- Holmes DS, Bonner J (1973) Preparation, molecular weight, base composition, and secondary structure of giant ribonucleic acid. *Biochemistry*, **12**, 2330–2338.
- Kijas JMH, Fowler JCS, Garbett CA, Thomas MR (1994) Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *BioTechniques*, **16**, 656–662.
- Mantziou G, Poulakakis N, Lymberakis P, Valakos E, Mylonas M (2004) The inter- and intraspecific status of Aegean *Mauremys rivulata* (Chelonia, Bataguridae) as inferred by mitochondrial DNA sequences. *Herpetological Journal*, **14**, 35–45.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583–590.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248–249.
- Wischuf T, Busack SD (2001) *Mauremys rivulata* (Valenciennes in Bory de Saint-Vincent et al. 1833) — Ostmediterrane Bachschildkroete. In: *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas Band 3/IIIA Schildkröten (Testudines) I* (ed. Fritz U), Aula-Verlag, Wiebelsheim.



# L'*Emyde caspienne* de l'ouest, *Mauremys rivulata*

Lina Rifai et Georgia Mantziou

## Description

*Mauremys rivulata* est l'une des trois espèces de tortue d'eau douce du genre *Mauremys* vivant autour de la méditerranée. Fritz et Wischuf (1997) ont élevé ce taxon au rang d'espèce à part entière et l'ont séparé de *M. caspica*. Dans le passé, elle était reconnue comme une sous-espèce de cette dernière, *M. caspica rivulata*.

La dossière de *Mauremys rivulata* peut atteindre une longueur de 244 mm, les femelles étant de plus grande taille que les mâles (Rifai & Amr, 2004). Les mâles ont habituellement une queue de plus grande taille que les femelles, presque deux fois plus longue si on la mesure à partir de l'ouverture cloacale, et elle est chez ceux-ci plus épaisse à la base (Rifai et Amr, 2004). Les mâles ont aussi habituellement une forme plus aplatie que les femelles.

La dossière de *M. rivulata* est aplatie dorso-ventralement avec de légers renflements et comporte habituellement 11 plaques marginales et une plaque supracaudale sur chaque côté. On trouve également sur la dossière une nucale, 4 costales et 5 plaques vertébrales. Une forte carène centrale traverse les vertébrales. Cette carène est souvent plus prononcée chez les jeunes individus où l'on trouve aussi de chaque côté de celle-ci, sur les plaques costales, une carène secondaire beaucoup moins développée. Ces deux carènes secondaires disparaissent souvent ou sont faiblement développées chez les tortues adultes. Le plastron des mâles est plat en son centre ou légèrement concave. Les plaques anales sont fendues chez les deux sexes. Les doigts des membres avant possèdent 5 griffes alors que les pattes arrière n'en ont que 4.

La dossière des adultes est habituellement de couleur uniforme de brun à vert olive ou vert avec des ornements effacés ou absentes. Les plus jeunes tortues possèdent une dossière à fond de vert à sombre avec des

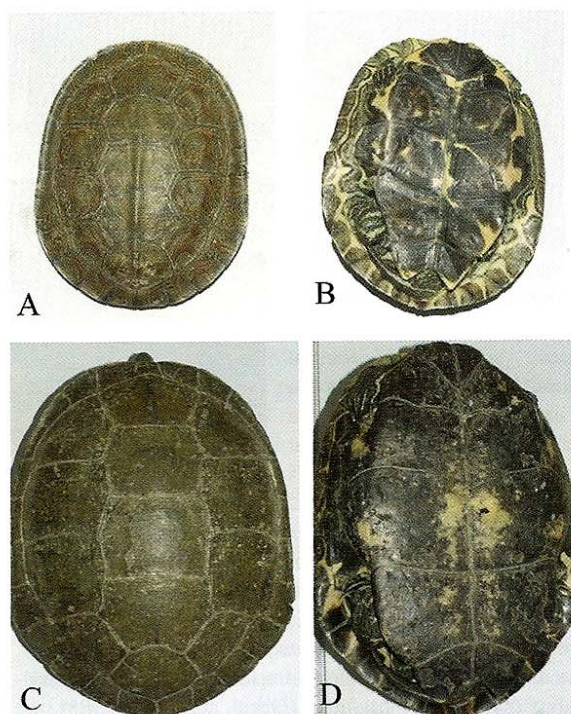


Fig. 1 : Vue dorsale (A) et ventrale (B) d'un juvénile *M. rivulata*. Vue dorsale (C) et ventrale (D) d'un adulte. Le juvénile et l'adulte ne sont pas à la même échelle.

ornementations claires irrégulières et réticulées brun rougeâtre ou parfois jaunâtre clair qui s'étendent sur plusieurs plaques.

Le plastron des plus jeunes individus est habituellement de sombre à noir au centre alors que ses bordures sont jaunâtres ou rougeâtres, les figures présentent alors un centre



# L'Emyde caspienne

noir. Les adultes conservent rarement ces formes claires; cependant le plastron tend à s'éclaircir avec l'âge et apparaît globalement plus jaunâtre. Le pont est habituellement de coloration uniforme, sombre à noir, avec parfois des points rouges ou jaunes sur les marginales.

Le nez de *M. rivulata* peut montrer des raies fines mais elles peuvent être absentes ou seulement limitées à deux lignes chez certains individus. (Figure 2). Les rayures sur les membres avant sont minces et jaunes sur un fond brun.

## Habitat

L'espèce vit en Croatie, Serbie et au Monténégro, en Albanie, Bulgarie, Grèce, Liban, Jordanie, Palestine, Israël et sur la côte méditerranéenne de la Turquie et en Syrie (Wischuf & Busack, 2001).

*Mauremys rivulata* occupe une variété d'habitats naturels ou modifiés par l'homme (Figure 3): des cours d'eau aux étangs saisonniers, lacs, lagunes côtières d'eau saumâtre et les canaux de drainage, les canaux d'irrigation, les barrages et les réservoirs. Néanmoins on ne le trouve habituellement pas dans les eaux à fort courant. Ces tortues sont habituellement dans l'eau ou très près de l'eau. Ce n'est qu'en de rares occasions qu'elles sont vues loin des milieux aquatiques.

Dans le sud de sa distribution géographique, *M. rivulata* est absente des milieux aquatiques dans les régions arides et de montagnes qui semblent être le principal facteur limitant sa présence en ces lieux (Gasith and Sidis, 1983).

L'Emyde caspienne de l'ouest peut tolérer une grande variation dans la qualité de l'eau; on la trouve dans des eaux acides, alcalines, polluées ou saumâtres (Gasith & Sidis, 1983; Sidis & Gasith, 1985). Lorsque leurs marais temporaires s'assèchent en été, les tortues d'eau estivent pour échapper à la chaleur extrême durant cette période. Elles peuvent aussi parfois migrer vers un autre milieu aquatique durant la sécheresse (Rifai & Amr, 2004). Dans le nord de sa distribution géographique, les tortues d'eau hibernent durant l'hiver (Arnold & Burton, 1985; Engelmann, 1993).

*M. rivulata* aime s'ensoleiller sur les berges ou les objets

flottants mais plonge rapidement lorsqu'elle est perturbée et disparaît dans la végétation aquatique ou dans la boue du fond de l'eau. Les juvéniles, s'ils vivent dans le même habitat aquatique que les adultes, sont alors trouvés dans des portions différentes de celles des adultes (Rifai & Amr, 2004). Les plus petits juvéniles, plus vulnérables, vivent habituellement dans les portions très peu profondes et plus boueuses des étangs, si on les compare aux portions plus profondes et plus claires du même habitat. Ces habitats offrent une meilleure protection contre les prédateurs pour ces juvéniles possédant une carapace plus molle.

*M. rivulata* ne se nourrit habituellement pas si la température de l'eau est inférieure à 13 °C ou supérieure à 30.5 °C (Sidis & Gasith, 1985). A une température de 36 °C l'espèce souffre probablement de la chaleur, c'est pourquoi lorsque la température de l'air dépasse 36 °C, l'espèce est vue flottante juste en dessous de la surface, en pointant sa tête de temps en temps pour éviter de trop s'échauffer (Rifai & Amr, 2004)

## Ecologie

Le régime alimentaire de l'Emyde caspienne de l'ouest est discutée par divers auteurs (Sidis & Gasith, 1985; Disi, 1998; Tok, 1999; Wischuf & Busack, 2001), qui ont fait des analyses fécales, des dissections et des observations. Les aliments ingérés par *Mauremys rivulata* sont de nature végétale comme des plantes aquatiques vasculaires, des algues, des ali-

ments saprophytes, des plantes terrestres et des graines (Sidis & Gasith, 1985). Des matières animales comme des insectes et leurs larves: coléoptères, hémiptères, chironomides, diptères, diplopodes, arthropodes, divers insectes non identifiés, divers crustacés et des vers (Tubicifidae), escargots aquatiques, têtards, poissons et restes d'oiseaux ainsi que des charognes (Sidis & Gasith, 1985; Disi, 1998; Wischuf & Busack, 2001) sont également ingérées.

Il semble que la composition du régime alimentaire dépend fortement de ce qui est disponible dans l'habitat, *M. rivulata* semble donc être un généraliste et opportuniste qui peut s'adapter dans une certaine mesure aux habitats modifiés voire perturbés. Le lavage d'estomac fait sur cette espèce (Rifai & Amr, en préparation) a conduit à



Fig. 2 : vue frontale de la tête de *M. rivulata*.



observer les matières végétales suivantes: graines, herbes et algues encroûtantes (*Chara canescens*). La même étude a montré que les matières animales ingérées étaient surtout constituées de larves d'anisoptères et de têtards de *Rana bedriagae*. Cependant des restes d'autres animaux comme des adultes et larves d'hémiptères, larves et pupes de diptères, des adultes hyménoptères et zygoptères, œufs et larves d'amphibiens ont été trouvés. On a constaté également (Rifai & Amr, en préparation) que le régime alimentaire



Fig. 3 : Habitat de *M.rivulata* en Jordanie à Birket Arai'is (A) et en Grèce (B).

des juvéniles, dont la longueur de dossière était inférieure à 80 mm, était essentiellement carnivore et consistait en une large variété d'invertébrés et de vertébrés mentionnés plus haut. Un changement alimentaire vers le régime herbivore semble s'effectuer avec l'âge adulte.

Le ratio mâle/femelle chez cette espèce est proche de 1:1 (Wischuf & Busack, 2001; Rifai & Amr, 2004). Dans les zones tempérées, les accouplements sont vus en continu de l'automne au printemps, des mois de novembre à avril, avec un pic en janvier et février (Gasith & Sidis, 1985). Dans les zones plus froides de l'aire de distribution, les accouplements ont probablement surtout lieu après le mois de janvier et février. Les œufs sont pondus entre mai et la fin juillet (Gasperetti et al., 1993; observation personnelle), et la période d'incubation dure entre 7 et 11 semaines.

Les œufs sont habituellement enterrés dans le sol près du milieu aquatique. Une taille de ponte habituelle comporte entre 4 et 10 œufs et deux à trois pontes sont probablement effectuées par saison, selon le climat dans la zone de reproduction. De plus amples recherches seraient nécessaires pour mieux connaître les paramètres reproductifs de cette espèce car les données restent en nombre limité.

### Menaces

*Mauremys rivulata* est inscrite dans l'annexe II de la Convention Européenne sur la nature et les habitats naturels de 1979. Les populations de cette espèce ont subi un sévère déclin durant ces dernières décennies à cause des pressions humaines à travers toute sa distribution géographique. *M. rivulata* conserve en certaines zones des populations denses mais les milieux aquatiques naturels sont gravement menacés sur l'aire méditerranéenne et dans le

Moyen Orient. La disparition de certaines populations a déjà été notée en Grèce (Mantziou, 2000).

Les menaces principales pesant sur cette espèce sont les suivantes:

*Menace n° 1*: l'assèchement et la canalisation des habitats aquatiques

De nombreux milieux aquatiques sont asséchés ou canalisés avec du ciment à cause de la demande croissante d'eau, notamment dans les îles de la région méditerranéenne et dans le Moyen Orient. La demande en eau a augmenté ces dix dernières années du fait de l'augmentation de l'activité touristique, du développement des villages et des petites villes ainsi que des pratiques agricoles. L'eau est utilisée pour les jardins, les cultures et les hôtels. Les populations de tortues devant faire face à de telles menaces sont soit éteintes soit confinées à des aires dans lesquelles elles ne peuvent plus se reproduire.

*Menace n° 2*: la grande pollution de milieux aquatique avec les pesticides, insecticides, engrais et déchets organiques de l'industrie du pétrole, des papeteries etc.

Durant ces dernières décennies il y a eu une augmentation de l'utilisation des engrais, des insecticides et des pesticides sans prendre en compte le fait que les grandes quantités déposées étaient entraînées par la pluie et finissaient dans les milieux aquatiques. De plus, de nombreuses industries ont rejeté leurs déchets dans les cours d'eau et les rivières



## L'Emyde caspienne

sans les avoir traités correctement. Bien que *M. rivulata* soit une espèce très tolérante, cela ne veut pas dire qu'elle est indestructible. L'extinction de certaines populations locales est probablement due à des pollutions. De plus récentes observations faites dans des milieux aquatiques pollués ont montré que de nombreux animaux présentent des déformations morphologiques sur la carapace (Mantziou,; Rifai, données non publiées). Des anomalies de développement de ce type ont été notées pour d'autres tortues d'eau (Bishop et al., 1998).

**Menace n° 3: compétition avec des espèces exotiques introduites**

L'introduction et la probable installation de la tortue d'eau *Trachemys scripta*, est une menace grandissante sur le long terme car elle entre en compétition pour l'alimentation avec l'espèce native. On note que l'espèce exotique devient plus grosse et a les mêmes besoins écologiques que *M. rivulata* mais qu'elle est plus agressive que celle-ci. Les populations natives, qui sont déjà menacées, deviennent excessivement vulnérables si elles doivent faire face à une espèce plus agressive et supérieure au niveau compétitif.

*T. scripta* est originaire de l'Amérique du nord mais elle a été introduite en Amérique du sud, Afrique du sud, la région méditerranéenne, en Jordanie, Palestine et au Bahreïn (Gasith et Sidis, 1983; Gasperetti et al., 1993). Gasperetti et al. (1993) note que l'espèce s'est installée au Bahreïn et qu'il semble évident qu'elle remplace la *M.*

*caspiica*, un taxon apparenté à *M. rivulata*. Des observations de *T. scripta* dans les cours d'eau et les étangs de Jordanie, Syrie, Palestine et Israël semblent suggérer la possible formation de populations sauvages, ce qui pourrait fortement menacer la survie de *M. rivulata* dans ces zones.

**Menace n° 4: dégradation et destruction de l'habitat.**

La fragmentation et la destruction des habitats sont des menaces qui augmentent pour les espèces animales, mais elles sont d'autant plus importantes pour les animaux aquatiques qui ne peuvent pas aussi aisément atteindre un autre habitat aquatique approprié. La destruction d'habi-

tats a augmenté ces dix dernières années à travers l'aire de distribution de l'espèce à cause du développement de nombreux villages et petites villes. Les habitats sont remplacés par des routes, des établissements ou des hôtels. L'Emyde caspienne de l'ouest est une espèce semi-aquatique mais qui ne peut se permettre de parcourir de très grandes distances pour trouver un nouvel habitat. Si un petit étang reste près de leur habitat d'origine, elles préfèrent rester au lieu de migrer vers un nouveau lieu. Malheureusement dans ces petites enclaves il n'existe plus de bons sites de ponte car les berges ont été couvertes avec du ciment et la population disparaîtra donc.

### Mesures de conservation

La plupart des menaces récentes pesant sur l'Emyde caspienne de l'ouest semblent être liées à la dégradation et la destruction de l'habitat. Afin de protéger cette espèce dans le futur, la destruction des habitats aquatiques devrait être réduite au minimum. Comme nous l'avons noté, l'espèce peut accepter un certain degré de pollution mais si des zones de ponte ne sont pas disponibles près des milieux en eau, elles ne peuvent plus se reproduire. C'est pourquoi il

faudrait être plus attentif lorsque le développement humain atteint ces zones. Des sites de pontes doivent être assurés pour permettre la survie de la population.

Une autre menace très récente est l'introduction de *Trachemys scripta* dans les habitats de *Mauremys*. Une collecte de ces animaux exotiques doit être effectuée. Une campagne

d'information sur les dangers potentiels des lâchers sur les tortues d'eau locales devrait être assurée afin de sensibiliser les possesseurs de ces animaux et limiter leur futur abandon.

La législation sur les rejets industriels et agricoles devrait être appliquée pour réduire les fortes pollutions de certains des habitats occupés par ces tortues d'eau. Même s'il a été montré lors d'anciennes études que cette tortue d'eau peut supporter un certain degré de pollution, il est aussi apparu que des déformations morphologiques existent chez des tortues vivant dans des milieux fortement pollués. (Bishop et al., 1998; obs. pers.).



Fig. 4 : Juvénile *M. rivulata* avec une carapace déformée



## Bibliographie

- Alekperov, A.M. 1978 - Zemnovodnye i presmykayushchiesya Azerbaidzhana. Elm, Baku. 264 p.
- Aliev, Spasskaya, T. Kh. 1980 - Oni nuzhdayutsya v okhrane.
- Ananjeva, N.B., Borkin, L.Ya., Darevsky, I.S., and Orlov, N.L. 1998 - Entsiklopediya Prirody Rossii : Zemnovodnye i Presmykayushchiesya. Moscow: ABF Publ., 574 p.
- Angel, F. & H. Lhote, 1939. - Reptiles et Amphibiens du Sahara central et du Soudan. *Bull. Com. Etud. hist. A. O. F.*, Paris, 21 [1938]: 345-384.
- Araújo P., Segurado P. & Santos N., 1997 - Bases para a Conservação das tartarugas de água doce, *Emys orbicularis* e *Mauremys leprosa*. Estudos de Biologia e Conservação da Natureza, 24. Instituto de Conservação da Natureza. Lisboa. 72p.
- Arnold, E. N. & Burton, J. A. 1985 - A Field Guide to the Reptiles and Amphibians of Britain and Europe. Collins, Grafton Street, London, pp.272.
- Atatür, M.K. 1995 - A preliminary report on the present status of Turkey's terrestrial and freshwater turtles from the viewpoint of conservation, 183-190, Red data Book on Mediterranean Chelonians, (Ballasina, D. ed.) Edagricole Edizioni Agricole, 190 p.
- Ayaz, D. 2003 - Investigations on the systematical states, morphologies, distributions, breeding and feeding biologies of *Emys orbicularis* (Testudinata: Emydidae) and *Mauremys rivulata* (Testudinata: Geoemydidae) from the Lakes District and eastern Mediterranean region. E. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, ?zmir, 239 p.
- Ayaz, D., Ta?kavak, E. & Budak, A. 2001 - *Emys orbicularis* (Testudinata: Emydidae) ve *Mauremys rivulata* (Testudinata: Bataguridae) Üzerine Biyo-Ekolojik Gözlemler. IV. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi 5-8 Ekim 2001, Bodrum.
- Ayaz, D., Ta?kavak, E. & Budak, A. 2002 - Some investigations on the taxonomy of the *Emys orbicularis* (Testudinata: Emydidae) specimens from western Anatolia. E. U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, Vo. 21, Issue (3/4): 279-285.
- Bakiev, A., 2004. - The distribution of *Emys orbicularis* in the Middle Volga river region, Russia. 9-11. In: Fritz, U., and Havas, P. (eds) Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on *Emys orbicularis* Kosice 2002, Biologia, Bratislava, 59/Suppl. 14.
- Bannikov, A.G., 1954 - Materials to knowledge of biology of the Caucasian turtles. Uchenye Zapiski Moskovskogo Gorodskogo Pedagogicheskogo Instituta, 18: 129-167. [En russe].
- Bannikov, A.G. 1951 - Materialy k poznaniyu biologii kawkazskikh cherepakh. Uchyonye Zapiski Mosk. Gor. Ped. In-ta. Moskva. 18: 129-167.
- Bannikov, A.G. 1954 - Materialy po biologii zemnovodnykh i presmykayushchikhsya Yuzhnogo Dagestana. Uchyonye Zapiski Mosk.Gor.Ped.In-ta. Moskva. 28: 75-88.
- Barth, D., Bernhard, D., Fritzsche, G., Fritz, U. 2004 - The freshwater turtle genus *Mauremys* (Testudines, Geoemydidae) - a textbook example of an east-west disjunction or a taxonomic misconception? *Zool. Scr.* 33: 213-221.
- Ba?o?lu, M. & Baran, ?. 1977 - The Reptiles of Turkey, Part I. The Turtles and Lizards. Ege Univ. Fen Fakültesi, Kitaplar Serisi, No: 76, Bornova-?zmir, 272 p.
- Bishop, C. A., Ng, P., Pettit, K. E., Kennedy, S.W., Stegeman, J.J., Norstrom, R.J. & Brooks, R.J. 1998 - Environmental contamination and developmental abnormalities in eggs and hatchlings of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) from the Great Lakes St. Lawrence River basin (1989-1991). *Environ. Pollut.*, 101(1):143-156.
- Blanc, C. P., 1978. - Notes sur les Reptiles de Tunisie. III. Distribution et perspectives de protection des Tortues terrestre et dulçaquicoles. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 55, 1-2: 51-65.
- Bons, J. & P. Geniez, 1996. - Amphibiens et Reptiles du Maroc (Sahara Occidental compris). Atlas biogéographique. Las Palmas, AHE. i-ii: 1-320.
- Boulenger, G. A., 1889. - Catalogue of the Chelonians, Rhynchocephalians, and Crocodiles in the British Museum (Natural History). London, British Museum. i-x, 1-311, pl. I-VI.
- Bour, R., 1978. - Les Tortues des Mascareignes: description d'une espèce nouvelle d'après un document (Mémoires de l'Académie) de 1737 dans lequel le crâne est figuré. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 287, D: 491-493.
- Bour, R. & Maran, J., 1998. - Taxinomie de *Mauremys leprosa* (Schweigger, 1812) dans le sud du Maroc (Reptilia, Chelonii, Bataguridae). *Manouria* 2: 22-52.
- Bozhansky, A.T. & Orlova, V.F., 1998. - Conservation status of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758), in European Russia. 41-46. In: Fritz, U., Joger, U., Podloucky, R., and Servan, J. (eds.) Proceedings of the *Emys* Symposium Dresden 96, Mertensiella 10.
- Busack, S. D. & C. H. Ernst, 1980. - Variation in Mediterranean populations of *Mauremys* Gray 1869 (Reptilia, Testudines, Emydidae). *Ann. Carnegie Mus.*, 49, 17: 251-264.
- Cadi A. et Miquet A., 2000 - Plan de réintroduction de la Cistude d'Europe (*Emys orbicularis*) au Lac du Bourget. *Projet Life 99 NAT/F/006321. CREN*, 31p.
- Cadi A. et Miquet A., 2003 - First result of the European Pond turtle release in the lake Bourget (France). Newsletter of the Re-introduction Specialist Group of IUCN Species Survival Commission, January 2003, 22: 44-45.
- Cadi A., 2003 - Ecologie de la Cistude d'Europe (*Emys orbicularis*): Aspects spatiaux et démographiques, application à la conservation. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1, 310p.
- Cadi A. et Joly P., 2003 - Introduction of exotic species: competition on basking site between the European pond turtle (*Emys orbicularis*) and the Slider turtle (*Trachemys scripta elegans*). *Canadian Journal of Zoology*, 81: 1392-1398.
- Cadi A. et Joly P., 2004 - Impact of the introduction of the slider turtle (*Trachemys scripta elegans*) on the European pond turtle (*Emys orbicularis*) survivor rate. *Biodiversity and Conservation*, 13: 2511-2518.
- Cadi A. et Miquet A., 2004 - A reintroduction program for the European pond turtle (*Emys orbicularis*) in Lake Bourget (Savoie, France): first results after two years. *Biologia, Bratislava*, 59/Suppl. 14: 155-159, 2004.
- Cadi A. et Faverot P., 2004 - Gestion et Restauration des populations de Cistude d'Europe et de leur habitat. Guide technique, CREN, 108p.
- Calviño, M.; Ayres, C. & Cordero Rivera, A. 2004 - *Emys orbicularis* L.: un carnívoro vegetariano. X Congreso Nacional y VII Iberoamericano de Etología, Almería (Spain).
- Carretero, M.A., Znari, M., Harris, D.J., Macé, J.C. 2005 - Morphological divergence among populations of *Testudo graeca* from west-central Morocco. *Animal Biol.* 55: 259-279.
- Cheylan M., 1998 - Evolution of the distribution of the European Pond turtle in the French mediterranean area since the post-glacial. In Mertensiella, Proceedings of the *Emys* Symposium, Dresden 96, 10: 47-65.
- Collins, J.T., Taggart, T.W. 2002 - Standard Common and Current Scientific Names for North American Amphibians, Turtles, Reptiles, and Crocodylians. Fifth Edition. Lawrence, Kansas (The Center for North American Herpetology), iv + 44 p.
- Cordero Rivera, A., Ayres Fernández, C., 2004 - A management plan for the European pond turtle (*Emys orbicularis*) populations of the river Louro basin (NW Spain). *Biologia* 59/Suppl. 14, 161-171.
- Crother, B.I., Boundy, J., Campbell, J.A., de Queiroz, K., Frost, D.R., Green, D.M., Highton, R., Iverson, J.B., McDiarmid, R.W., Meylan, P.A., Reeder, T.W., Seidel, M.E., Sites, J.W., Tilley, S.G., Wake, D.B. 2003 - Scientific and standard English names of amphibians and reptiles of North America and north of Mexico: Update. *Herpetol. Rev.* 34: 196-203.
- Danilov, I.G. 2005 - Die fossilen Schildkröten Europas. In: Fritz, U. (ed.), *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Schildkröten*



## Bibliographie

- II. AULA-Verlag (Wiesbaden/Wiebelsheim), pp. 329-441.
- Da Silva, E., 2002 - *Mauremys leprosa*. In: Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, pp. 143-146.
- Disi, A. M. 1998 - Morphometrics, distribution and ecology of chelonians in Jordan (Reptilia: Testudines), Faunistische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde Dresden, 21/Suppl. 5: 31-41.
- Doumergue, F., 1901. - Essai sur la faune erpétologique de l'Oranie. Oran, L. Fouque: 1-404, pl. 1-27. [Publication originale: 1899, Bull. Soc. géog. archéo. Oran, 19-21].
- Ducotterd, J. M. & Bour, R., 2002. - Nouvelles données sur les sous-espèces de *Mauremys leprosa* dans le centre et le sud du Maroc (Reptilia, Chelonii). Manouria 17: 12-21.
- Duguay R., et Baron J.P., 1998 - La Cistude d'Europe, *Emys orbicularis*, dans le Marais de Brouage (Charente Maritime): Cycle d'activité, thermorégulation, déplacements, reproduction et croissance. Annales Soc. Sci. Nat. de Charente-Maritime, 8: 781-803.
- Engelmann, W. E., Fritzsche, J., Gunther, R. & Obst, F. J. 1993 - Lurche und Kriechtiere Europas. Neumann Verlag Radebeul, pp.440.
- Ernst, C. H. & Barbour, R. W. 1989 - Turtles of the World. Smithsonian Ins. Press., Washington, D. C., and London, 388 p.
- Farkas, B. 2000 - The European pond turtle *Emys orbicularis* (L.) in Hungary. Stapfia 69 (= Kataloge des OÖ Landesmuseums, Neue Folge Nr. 149): 127-132.
- Farkas, B. 2002 - European Pond Turtle Action Plan. Manuscript submitted to WWF Hungary, 20 p. (en hongrois)
- Farkas, B. 2003 - Tasty morsels. Vadon, Budapest, 10(4): 22-23. (en hongrois)
- Feldman, C.R., Parham, J.F. 2002 - Molecular phylogenetics of emydid turtles: Taxonomic revision and the evolution of shell kinesis. Mol. Phylogen. Evol. 22: 388-398.
- Fritz, U. 1989 - Zur innerartlichen Variabilität von *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). 1. Eine neue Unterart der Europäischen Sumpfschildkröte aus Kleinasien *Emys orbicularis luteofusca* subsp. nov. Salamandra, Bonn, 25 (3/4): 143-168.
- Fritz U. 1992 - Zur innerartlichen Variabilität von *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). 2. Variabilität in Osteuropa und Redefinition von *Emys orbicularis orbicularis* (Linnaeus, 1758) und *E. o. hellenica* (Valenciennes, 1832). Zool. Abh. Staatl. Mus. Tierkd. Dresden, 47 (5): 37-77.
- Fritz U. 1994 - Zur innerartlichen Variabilität von *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). 4. Variabilität und Zoogeographie im pontokaspischen Gebiet mit Beschreibung von drei neuen Unterarten. Zool. Abh. Staatl. Mus. Tierkd. Dresden, 48 (4): 53-93.
- Fritz, U. 1998 - Introduction to zoogeography and subspecific differentiation in *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). Mertensiella, 10: 1-27.
- Fritz U. 1998 - Introduction to zoogeography and subspecific differentiation in *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). In: Fritz U. et al. (eds). Proceedings of the EMYS Symposium Dresden 96. Mertensiella, 10: 1-27.
- Fritz U. 2001 - *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758) — Europäische Sumpfschildkröte. — In: Böhme W. (ed.). Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 3/IIIA: Schildkröten (Testudines) I (Bataguridae, Testudinidae, Emydidae). AULA-Verlag, Wiebelsheim. Pp. 343-515.
- Fritz, U. 2003 - Die Europäische Sumpfschildkröte (*Emys orbicularis*). Zeitschrift für Feldherpetologie, Suppl. 1, Laurenti-Verlag, Bielefeld, 224 p.
- Fritz, U., Baran, ?, Budak, A. & Amthauer, E. 1998 - Some notes on the morphology of *Emys orbicularis* in Anatolia, especially on *E. o. luteofusca* and *E. o. colchica*, with the description of a new subspecies from southeastern Mertensiella, 10: 103-121.
- Fritz, U., Cadi, A., Cheylan, M., Coïc, C., Détaint, M., Olivier, A., Rosocchi, E., Guicking, D., Lenk, P., Joger, U., Wink, M. 2005a - Distribution of mtDNA haplotypes (cyt b) of *Emys orbicularis* in France and implications for postglacial recolonization. Amphibia-Reptilia 26: 231-238.
- Fritz, U., Fattizzo, T., Guicking, D., Tripepi, S., Pennisi, M.G., Lenk, P., Joger, U., Wink, M. 2005b - A new cryptic species of pond turtle from southern Italy, the hottest spot in the range of the genus *Emys*. Zool. Scr. 34: 351-371.
- Fritz, U., Fritzsche, G., Lehr, E., Ducotterd, J.-M., Müller, A. 2005c - The Atlas Mountains, not the Strait of Gibraltar, as a biogeographic barrier for *Mauremys leprosa*. Salamandra 41: 97-106.
- Fritz, U., Guicking, D., Lenk, P., Joger, U., Wink, M. 2004 - When turtle distribution tells European history: mtDNA haplotypes of *Emys orbicularis* reflect in Germany former division by the Iron Curtain. Biologia, 59 (Suppl. 14): 19-25.
- Fritz, U., Široký, P., Kami, H., Wink, M. 2005d - Environmentally caused dwarfism or a valid species - Is *Testudo weissingeri* Bour, 1996 a distinct evolutionary lineage? New evidence from mitochondrial and nuclear genomic markers. Mol. Phylogen. Evol. 37: 389-401.
- Fritz, U., Wischuf, T. 1997 - Zur Systematik westasiatisch-südosteuropäischer Bachschildkröten (Gattung *Mauremys*). Zool. Abh. Mus. Tierkd. Dresden 49: 223-260.
- Gasith, A. & Sidis, I. 1983 - The distribution and nature of the habitat of the Caspian terrapin *Mauremys caspica rivulata* (Testudines: Emydinae) in Israel. Israel J. Zool., Jerusalem, 32:91-102.
- Gasith, A. & Sidis, I. 1985 - Scxual activity in the Terrapin, *Mauremys caspica rivulata*, in Israel, in relation to the testicular cycle and climatic factors, Journal of Herpetology, 19(2): 254-260.
- Gasperetti, J. Stimson, A. F. Miller, J. D. Ross, J. P. & Gasperetti, P. R. 1993 - Turtles of Arabia, Fauna of Saudi Arabia, 13: 170-367.
- Gray, J. E., 1854 - Description of a new genus and some new species of Tortoises. Proc. zool. Soc. London (1852): 133-135.
- Gray, J. E., 1860 - Description of a new species of *Emys* lately living in the Gardens of the zoological Society. Proc. zool. Soc. London (1860): 232-233, pl. 30.
- Gray, J. E., 1870a - Description of *Mauremys laniaria*, a new freshwater Tortoise. Proc. zool. Soc. London (1869): 499-500, pl. 37.
- Gray, J. E., 1870b - Supplement to the Catalogue of Shield Reptiles in the Collection of the British Museum. I. Testudinata (Tortoises). London, British Museum. i-x, 1-120.
- Gus'kov, E.P., Lukina, G.P. & Koneva, V.A., 1983. - Guide to Amphibians and Reptiles of Rostovskaya Province. Rostov, Rostov University Publ. 49 p. [En russe].
- Holman, J.A., Parmley, D. 2005 - Noteworthy turtle remains from the Late Miocene (Late Hemphillian) of northeastern Nebraska. Texas J. Sci., 57: in press.
- Honegger, R.E. 1981 - Threatened Amphibians and Reptiles in Europe. Akademische Verlagsgesellschaft, Wiesbaden, 142 p.
- Iverson, J. B., 1992 - A Revised Checklist with Distribution Maps of the Turtles of the World. Richmond, J. Iverson. i-xiii, 1-363.
- Jesu, R., Piombo, R., Salvidio, S., Lamagni, L., Ortale, S., Genta, P. 2004 - Un nuovo taxon di testuggine palustre endemico della Liguria occidentale: *Emys orbicularis ingauna* n. ssp. Ann. Mus. Civ. Stor. Nat. „G. Doria“, 96: 133-192.
- Karmishev Yu. V. 1999 - Reproductive especially of *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758) in the south of Ukraine. In: 10th Ordinary General Meeting of Societas Europaea Herpetologica. Programme and Book of Abstracts. Irakleio. P. 80-81.
- Keller, C. 1997 - Ecología de poblaciones de *Mauremys leprosa* y *Emys orbicularis* en el Parque Nacional de Doñana. Ph.D. dissertation, Universidad de Sevilla.
- Keller, C., Andreu, A. C., 2002 - *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). Galápagos europeo. In: Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España. Ministerio de Medio Ambiente. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Madrid, pp. 181-186.
- Khabibulin, V., 2004. - Distribution of *Emys orbicularis* in the South Urals, Russia. 27-32. In: Fritz, U., and Havas, P. (eds) Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on *Emys orbicularis* Kosice 2002,



- Biologia, Bratislava, 59/Suppl. 14.
- Kireev, V.A., 1983. - Animal World of Kalmykia: Amphibians and Reptiles. Elista, Kalmytskoe Knizhnoe Publ. 112 p. [En russe].
- Kotenko T. I. 1987 - Conservation of amphibians and reptiles in the reserves of Ukraine. — In: Darevsky I. S. & Krever V. G. (eds). Amphibians and reptiles of the reserve areas. Moscow. Pp. 60–80 (in Russian).
- Kotenko T. I. 2000 - The European pond turtle (*Emys orbicularis*) in the steppe zone of the Ukraine. In: Hodl W. & Rossler M. (eds). Die Europäische Sumpfschildkröte. Stapfia 69, zugleich Kataloge des OO. Landesmuseums. Neue Folge 149, Linz: 87–106.
- Kotenko T. 2004 - Distribution, habitats, abundance and problems of conservation of the European pond turtle (*Emys orbicularis*) in the Crimea (Ukraine): first results. — In: Fritz U. & Havaš P. (eds). Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on *Emys orbicularis*. Biologia, Section Zoology, Bratislava, 59/Suppl. 14: 33–46.
- Kotenko T. I. & Fedorchenko A. A. 1993 - Reproductive cycle of *Emys orbicularis* in the Danube Delta. In: 7<sup>th</sup> Ordinary General Meeting of Societas Europaea Herpetologica. — Barcelona. P. 86.
- Kotenko T., Zinenko O., Guicking D., Sauer-Guerth H., Wink M. & Fritz U. 2004 - First data on the geographic variation of *Emys orbicularis* in Ukraine: mtDNA haplotypes, coloration, and size. In: Ananjeva N. & Tsinenko O. (eds). Herpetologia Petropolitana (in lit.).
- Kovács, T., B. Anthony, B. Farkas & M. Bera. 2004 - Preliminary results of a long-term conservation project on *Emys orbicularis* in an urban lake in Budapest, Hungary. Turtle and Tortoise Newsletter 7: 14-17.
- Krasovskiy, D.B. 1929 - Materialy k poznaniyu fauny Amphibia i Reptilia Khasavurtovskogo okruga Dagestanskoy ASSR. Izvestiya Gorskogo Pedagogicheskogo Instituta 9: 219-228.
- Krasavtsev, B.A. 1941 - Herpetologicheskie nablyudeniya v Predkavkazje. Trudy Voroshilovskogo ped. instituta, III: 25-38.
- Kuzmin, S.L., 2002. - The Turtles of Russia and Other Ex-Soviet Republics. Frankfurt-am-Main: Chimaira. 159 p.
- Lacomba, J.L., Sancho, V., 2000 - The European Pond Turtle conservation plan in the Valencian community: a proposal. Chelonii 2, 130-132.
- Lebboroni M. et Chelazzi G., 1991 - Activity patterns of *Emys orbicularis* L. (*Chelonia Emydidae*) in central Italy. Ethol. Ecol. Evol.(3): 257-268.
- Le Berre, M., 1989 - Faune du Sahara. 1. Poissons - Amphibiens - Reptiles. Paris Lechevallier - R. Chabaud. 1-332.
- Lenk P., Fritz U., Joger U. & Wink M. 1999 - Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758). Mol. Ecol. 8: 1911–1922.
- Linné, C. von, 1758 - Systema Naturae. Ed. 10. Holmiae (Stockholm), L. Salvii. 1: i-iv, 1-824.
- Lortet, L., 1887 - Observations sur les Tortues terrestres et paludines du bassin de la Méditerranée. Arch. Mus. Hist. nat. Lyon, IV: 1-26, pl. 1-8.
- Loveridge, A. & Williams, E. E., 1957 - Revision of the African Tortoises and Turtles of the suborder Cryptodira. Bull. Mus. comp. Zool., 115, 6: 163-557, pl. 1-18.
- Lukina, G.P., 1971 - Reproductive biology of *Emys orbicularis* in the Eastern-Pre-Azov area. *Ecologiya* (Sverdlovsk) (3): 99-100 [En russe].
- Mantziou, G. 2000 - Ecology, Distribution and Differentiation of *Mauremys caspica* (Testudines: Bataguridae) in Crete. M.Sc. Thesis, Postgraduate Program of Management of Marine and Land-Living Resources, Biology Department, University of Crete, pp. 125.
- Mantziou, G., Poulakakis, N., Lymberakis, P., Valakos, E., Mylonas, M. 2004 - The inter- and intraspecific status of Aegean *Mauremys rivulata* (Chelonia, Bataguridae) as inferred by mitochondrial DNA sequences. Herpetol. J. 14, 34-45.
- Mayol, J., 1993 - Concentración de nidos de *Emys orbicularis* en el Parque Natural de S'Albufera de Mallorca. Boletín Español de Herpetología 4, 21-23.
- Mazanaeva, L. & Orlova, V., 2004. - Distribution and ecology of *Emys orbicularis* in Daghestan, Russia. 47-53. In: Fritz, U., and Havas, P. (eds) Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on *Emys orbicularis* Kosice 2002, Biologia, Bratislava, 59/Suppl. 14.
- Mertens, R. & L. Müller, 1928. - Liste der Amphibien und Reptilien Europas. Abhandl. Senckenberg. Naturforsch. Gesell., Frankfurt a. M., 41: 1-62.
- Michahelles, C., 1829. - Commentatio de speciebus aut rarioribus, aut novis cheloniorum Europam meridionalem inhabitantibus. *Isis* (Oken), Leipzig (1829): 1295-1300.
- Moritz, L.D. 1916 - Cherepakhi Kavkaza. Lyubitel' prirody, 11: 113-121.
- Mosauer, W., 1934. - The Reptiles and Amphibians of Tunisia. Publ. Univ. California at Los Angeles, biol. Sc., 1, 3: 49-64.
- Nemoz, M., A. Cadi & S. Thienpont. 2004 - Effects of recreational fishing on survival in an *Emys orbicularis* population. Biologia, Bratislava, 59, Suppl. 14: 185-189.
- Nikolsky A.M. 1905 - Presmykayuschiesya i zemnovodnye Rossijskoj Imperii (Herpetologia Rossica). St.-Petersbourg. 517 p.
- Nikolsky, A.M. 1913 - Presmykayushchiesya i Zemnovodnye Kavkaza. Tiflis. 272 p.
- Nikolsky, A.M. 1915 - Fauna Rossii i sopredelnykh stran: Reptiles (Reptilia) 1: Chelonia Sauria. Petrograd: Imp. Acad. Sci. Publ. 532 p.
- Orlova, V.F., 2003. - Amphibians and Reptiles. P. 50-62. In: The present-day State of Biological Diversity within Protected Areas in Russia. Issue 1. Vertebrate Animals (eds). D.S. Pavlov, I.S. Darevsky). Moscow: IUCN, Min.Nat.Res.Russ.Fed., Comiss.Biodiv.Conserv.Rus.Acad.Sci. [En russe].
- Pallas P. S., 1814 - Zoographia Rosso-Asiatica, sistens Omnium Animalium in Extenso Imperio Rossico. Vol. Tertium (3). «1811 – 1831», Caes. Acad. Sci., Petropoli (= St. Petersburg). 7+428+125p.
- Parham, J.F. Feldman, C.R. 2002 - Generic revisions of emydid turtles. Turtle and Tortoise Newsl. 6: 28-30.
- Pestov, M.V., Ushakov, V.A., Bakka, S.V., Paramonov, G.V., & Mannapova, E.L., 1999. - Amphibians and reptiles included in the Red Data Book of Nizhegorodskaya Province. In: Aktualnye Problemy Gerpetologii i Toxinologii (3). Tolyatti: 81-86 [En russe].
- Puky, M., D. Gémesi & P. Schád 2004. Distribution of *Emys orbicularis* in Hungary with notes on related conservational and environmental education activities. Biologia, Bratislava 59, Suppl. 14: 55-60.
- Rifai, L. B. & Amr, Z. S. 2004 - Morphometrics and biology of the stripe-necked Terrapin, *Mauremys rivulata* (Valenciennes, 1833), in Jordan (Reptilia: Testudines: Geoemydidae). Zoologische Abhandlungen (Dresden), 54:177-197
- Rifai, L. & Amr, Z. S. In preparation - The diet of *Mauremys rivulata* (Valenciennes, 1833) in Jordan.
- Rollinat R., 1934. La vie des reptiles de la France centrale. Delagrave, Paris, 337p.
- Rovero F, et Chelazzi G., 1996 - Nesting migrations in a population of the European pond turtle *Emys orbicularis* (L) (Chelonia Emydidae) from central Italy. Ethol. Ecol. Evol., 8(3): 297-304.
- Salvador, A. & J.M. Pleguezuelos, 2002 - Reptiles Españoles. Canseco Editores.
- Schleich, H.H. 1996 - Beitrag zur Systematik des Formenkreises von *Mauremys leprosa* in Marokko. Teil I. Spixiana 22 (Suppl.): 29-59.
- Schleich, H. H., Kästle, W. & K. Kabisch, 1996. - Amphibians and Reptiles of North Africa. Berlin, Koeltz. [i-iv], 1-630 [incl. pl. 1-63].
- Schweigger, A. F., 1812a. - Prodrromus Monographiae Cheloniorum. Königsberg. Arch. Naturwiss. Math., 1, III: 271-368; IV: 406-462.
- Segurado P. & Araújo A.P.R., 2004 - Coexistence of *Emys orbicularis* and *Mauremys leprosa* in Portugal at two spatial scales: is there evidence of spatial segregation? In: Fritz, U. & Havas, P. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on *Emys orbicularis*. Biologia 59, Suppl. 14: 61-72. Ayres Fernández, C., Cordero Rivera, A., 2004. The incidence of asymmetries and accessory plates in *Emys orbicularis* from NW Spain. Biologia 59/Suppl. 14, 85-88.



## Bibliographie / Auteurs

- Segurado, P. 2000 - Modelação da distribuição e da Abundância local do cágado-mediterrânico (*Mauremys leprosa*) e do cágado-de-cara-ça-estriada (*Emys orbicularis*) em Portugal. Thesis (Msc), Instituto Superior de Agronomia, Portugal.
- Segurado P. & Araújo A.P.R., 2004 - Coexistence of *Emys orbicularis* and *Mauremys leprosa* in Portugal at two spatial scales: is there evidence of spatial segregation? In: Fritz, U. & Havas, P. Proceedings of the 3rd International Symposium on *Emys orbicularis*. *Biologia* 59, Suppl. 14: 61-72.
- Servan J., 1988 - La Cistude d'Europe, *Emys orbicularis*, dans les étangs de Brenne, France. *Mésogée* 48: 91-95.
- Servan J., 1998 - Ecological study of *Emys orbicularis* in Brenne (Central France). In Mertensiella, Proceedings of the EMYS Symposium Dresden 96, 10: 245-252.
- Shcherbak N. N. 1966 - Amphibians and reptiles of the Crimea. *Naukova dumka*, Kiev. 240 pp. (in Russian).
- Shcherbak N. N. & Shcherban' M. I. 1980 - Amphibians and reptiles of the Ukrainian Carpathians. *Naukova dumka*, Kiev. 267 pp. (in Russian).
- Shibanov, N.V. 1935. Materialy k faune reptilii Dagestana. *Sbornik trudov Gos. Zool. Mus. MGU. Moskva*, II: 63-68.
- Sidis, I. & Gasith, A., 1985 - Food habits of the caspian terrapin (*Mauremys caspica rivulata*) in unpolluted and polluted habitats in Israel. *J. Herpetol.*, 19 (4):108-115.
- Szczerbak N. N. 1998 - The European pond turtle (*Emys orbicularis*) in Ukraine. — In: Fritz U. et al. (eds). Proceedings of the EMYS Symposium Dresden 96. Mertensiella, 10: 259-266.
- Spasskaya, T. Kh. 1985 - Geograficheskoe rasprostraneniye i plotnost' populatsii cherepakh Dagestana. *Materialy VIII Nauchno-Prakticheskoy Konferentsii po Okhrane Prirody Dagestana*. Makhachkala: 57-58.
- Spinks, P.Q., Shaffner, H.B., Iverson, J.B., McCord, W.P. 2004 - Phylogenetic hypotheses for the turtle family Geoemydidae. *Mol. Phylogen. Evol.* 32: 164-182.
- Spix, J. B. de, 1824. — *Animalia nova sive Species novae Testudinum et Ranarum...* Monachii (Munich), F. S. Hübschmann. 1-53, pl. 1-22.
- Taraschuk B. I. 1959 - Fauna of Ukraine. V. 7. Amphibians and reptiles. *Acad. Sci. Ukrainian RSR, Kyiv*. 247 p. (in Ukrainian).
- Tertyshnikov, M.F., 2002. - Reptiles of Central Precaucasus. *Stavropol: Stavropol'servisshkola Publ.* 240 pp. [En russe].
- Tertyshnikov, M.F. 2002 - *Presmykayushchiesya Tsentral'nogo Predkavkazya*. *Stavropol'servisshkola*, Stavropol: 239 p.
- Tertyshnikov, M.F. & Vysotin, A.G. 1987 - Fauna reptilii vodnykh i okolovodnykh biogeotsenozov polupustynnoi zony Stavropolya. In: *Zhivotnye vodnykh i okolovodnykh biogeotsenozov polupustyni*. Kalmytskiy universitet, Elista: 104-108.
- Torvaji, L. 2003. Population ecology of pond turtles in Naplás Lake. Thesis, Veszprém University, 55 + 37 pp. *In Hungarian*
- Turov, S.S. & Krasovsky, D.B. 1933 - Ocherk fauny Prislakskogo olenyego zapovednika. *Zoologicheskoy Zhurnal* 2 (4): 35-56.
- Tok, C. V. 1999 - The Taxonomy and Ecology of *Mauremys caspica rivulata* Valenciennes, 1833 (Testudinata: Bataguridae) and *Testudo graeca iberica* Pallas, 1811 (Testudinata: Testudinidae) on Resadiye (Datça) Peninsula, *Turkish Journal of Zoology*, 23: 17-21.
- Villiers, A., 1958. — *Tortues et Crocodiles de l'Afrique noire française*. IFAN, Dakar. 1-354.
- Wischuf, T. & Busack, S. D. 2001 - *Mauremys rivulata* (Valenciennes in Bory de Saint-Vincent et al. 1833) — Ostmediterrane Bachschildkröte. In: *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Band 3/IIIA Schildkröten (Testudines) I* (ed. Fritz U), Aula-Verlag, Wiebelsheim, Germany.
- Wischuf, T., Fritz, U. 2001 - *Mauremys caspica* (Gmelin, 1774) — Kaspische Bachschildkröte. In: Fritz, U. (ed.), *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Schildkröten I*. AULA-Verlag (Wiesbaden/Wiebelsheim), pp. 43-56.

- Zinenko O. 2004 - Notes on egg-laying, clutch size and hatchling feeding of *Emys orbicularis* in the Kharkiv region, Ukraine. In: Fritz U. & Havaš P. (eds). Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on *Emys orbicularis*. *Biologia*, Section Zoology, Bratislava, 59/Suppl. 14: 33-46.
- Zuffi, M.A.L., 2000. Conservation biology of the European turtle *Emys orbicularis* (L.) in Italy, *Stapfia* 69, *Zugleich Kataloge des OÖ Landesmuseums, Neue Folge* Nr. 149: 219-228.

## Auteurs

- Ayaz, Dincer, Ege University, Faculty of Science, Biology Department, Hydrobiology Section, TR-35100, Bornova-?zmir, Turquie, E-mail: ayaz@sci.ege.edu.tr
- Ayres Fernández, César, Grupo de Ecología Evolutiva e da Conservación, Departamento de Ecología e Biología Animal, EUET Forestal, Universidade de Vigo, Campus Universitario, 36005 Pontevedra, Espagne,
- Bour, Roger, Laboratoire Reptiles & Amphibiens, MNHN, 25, rue Cuvier, F-75005 Paris, E-mail: bour@mnhn.fr
- Cadi, Antoine, Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution Université Paris Sud. E-mail: acadi@noeconservation.org
- Cordero Rivera, Adolfo, Grupo de Ecología Evolutiva e da Conservación, Departamento de Ecología e Biología Animal, EUET Forestal, Universidade de Vigo, Campus Universitario, 36005 Pontevedra, Espagne, E-mail: adolfo.cordero@uvigo.es
- Coutard, Cédric, Centre d'élevage et de protection de la tortue, Lieu dit Vignola, F20133 Ucciani, E-mail: cedric.coutard@wanadoo.fr
- Farkas, Balázs Bercsényi u. 21, H-2464 Gyúró, Hongrie, E-mail: farkasbalazs@yahoo.com
- Fritz, Uwe, Museum of Zoology, Natural History State Collections Dresden, Allemagne
- Gulácsi, Erika, Középadacs 31, H-6097 Kunadacs, Hongrie, E-mail: egulacsi@freemail.hu
- Kotenko, Tatiana, Schmalhausen Institute of Zoology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Vul. B. Khmel'nyts'kogo 15, Kyiv 01601 MSP, Ukraine, E-mail: kotenko@izan.kiev.ua
- Mantziou, Georgia, Molecular Systematics Lab, Natural History Museum of Crete, University of Crete, P.O. Box 2208, 71409 Irakleio, Crete Grèce, Email: mantziou@nhmc.uoc.gr
- Mazanaeva, Lyudmila F., Department of Zoology, Dagestan State University, 37 a M. Gadjeva st., 367025, Makhachkala, Russie, E-mail: mazanaev@mail.ru
- Morcillo, Vincent, Ancien presbytère, F30700 La Capelle Masmolene, E-mail: vincent.morcillo@wanadoo.fr
- Orlova, Valentina, Zoological Museum of the Moscow State University, B. Nikitskaya str. 6, 125009 Moscow, Russie, E-mail: orlova@zmmu.msu.ru
- Rifai, Lina, Department of Biology, University of Louisville, Louisville, KY 40292 USA, Email: lina.rifai@louisville.edu
- Segurado, Pedro, Unidade de Macroecologia e Conservação - Universidade Évora, Estrada dos Leões - Antiga Fábrica das Massas Leões, 7000 - 730 Évora, Portugal, E-mail: psegurado@uevora.pt.