



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΘΕΜΑ

Μοριακή Φυλογέγερση και Φυλογεωγραφία του είδους *Podarcis cretensis* (Sauria: Lacertidae)



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Βασιλικόπουλος Αλέξανδρος Α.Μ.1666

Υπεύθυνος Καθηγητής

Πουλακάκης Νίκος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Συστηματικής και Εξέλιξης του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης και υποβλήθηκε στο τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Η υπόδειξη του θέματος της παρούσας εργασίας έγινε από τον επίκουρο καθηγητή του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης Πουλακάκη Νίκο, ο οποίος ήταν και ο επιβλέπων καθηγητής της παρούσας εργασίας.

Για την επίτευξη των στόχων μου τόσο κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών μου σπουδών καθώς και κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας είχα τη στήριξη και συμπαράσταση αρκετών ανθρώπων τους οποίους νοιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω το Νίκο Πουλακάκη που με δέχτηκε στο εργαστήριο Μοριακής Συστηματικής και Εξέλιξης για την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας και μου έδωσε τη δυνατότητα να ανακαλύψω από κοντά τον θαυμαστό κόσμο της Μοριακής Φυλογένεσης και της Φυλογεωγραφίας. Επιπλέον θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την πολύ καλή μας συνεργασία κατά τη διάρκεια του τελευταίου ενός χρόνου, και που με έκανε αμέσως να νοιώσω άνετα όντας πάντα πρόθυμος εκεί να με βοηθήσει τόσο στο πειραματικό κομμάτι όσο και γενικότερα στην επίλυση οποιονδήποτε αποριών.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Πέτρο Λυμπεράκη αλλά και το Μανώλη Παπαδημητράκη για τη βοήθειά τους σε θέματα που αφορούσαν την οργάνωση των δειγμάτων στις συλλογές του Μουσείου, αλλά κυρίως γιατί οι πόρτες τους ήταν πάντα ανοιχτές σε περιπτώσεις που χρειάστηκα τη βοήθειά τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω ακόμα σε όλα τα παιδιά του Εργαστηρίου Μοριακής Συστηματικής και Εξέλιξης επειδή μοιράστηκαν τις οποιεσδήποτε στιγμές αγωνίας μου και ήταν πάντα πρόθυμοι να με καθοδηγήσουν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Όσον αφορά το παρεάκι από την Κρήτη (το οποίο ήταν αρκετά μεγάλο και δεν θα ήθελα η μεμονωμένη αναφορά κάποιων να μειώσει την αξία και την σημασία των υπολοίπων) ήταν από τους βασικούς παράγοντες που τα τέσσερα χρόνια των σπουδών μου στην Κρήτη θα μου μείνουν αξέχαστα και για αυτό τους ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ για τη στήριξη και την συμπαράσταση καθ όλη τη διάρκεια των προπτυχιακών σπουδών μου αλλά και γενικότερα οφείλω στην οικογένειά μου και ιδιαίτερα στους γονείς μου Σταματία και Θοδωρή, οι οποίοι με βοήθησαν να πετύχω τους στόχους μου και να ξαναβρώ τον εαυτό μου όταν τα πράγματα για μένα στη ζωή είχαν πάρει άσχημη τροπή. Για αυτό το λόγο θα ήθελα να αφιερώσω το παρόν κείμενο στην οικογένειά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Φυλογένεση και μοριακοί δείκτες	7
1.2 Η επιστήμη της Φυλογεωγραφίας	7
1.3 Οι σαύρες ως οργανισμοί-μοντέλα για εξελικτικές μελέτες	8
1.4 Γενικά στοιχεία αναφορικά με το υπό εξέταση είδος	8
1.4.1 Γενικά στοιχεία για τις σαύρες της οικογένειας Lacertidae (Linnaeus, 1758)	8
1.4.2 Το γένος <i>Podarcis</i> (Wagler, 1830) και η αντιπροσώπευσή του στον ελληνικό χώρο	9
1.4.3 Η ταξινομική αναθεώρηση των πληθυσμών του <i>Podarcis erhardii</i> από την Κρήτη	11
1.4.4 Μορφολογικά και οικολογικά χαρακτηριστικά του είδους <i>Podarcis cretensis</i>	13
1.4.5 Γεωγραφική εξάπλωση του είδους <i>Podarcis cretensis</i>	14
1.5 Παλαιογεωγραφία του Νοτίου Αιγαίου και της Κρήτης	15
1.6 Σκοπός της παρούσας εργασίας	18
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	20
2.1 Συλλογή δειγμάτων	20
2.2 Πειραματική Διαδικασία	21
2.2.1 Προετοιμασία και πλύση του ιστού	21
2.2.2 Εξαγωγή-απομόνωση ολικού γενωμικού DNA	22
2.2.3 Πολλαπλασιασμός των γονιδίων στόχων μέσω PCR	23
2.2.4 Καθαρισμός προϊόντος της PCR	25
2.2.5 Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR (sequencing)	26
2.3 Στοιχισμός αλληλουχιών	26
2.4 Φυλογενετικές αναλύσεις	27

2.4.1	Επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου εξέλιξης	27
2.4.2	Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων	27
2.4.3	Φυλογενετικές μέθοδοι	27
2.5	Εκτίμηση χρόνων απόσχισης	28
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	30
3.1	Μήκος αλληλουχιών και νουκλεοτιδική σύσταση	30
3.1.1	Κυτόχρωμα β	30
3.1.2	16s RNA	30
3.2	Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων μεταξύ των αλληλουχιών	30
3.3	Φυλογένεση	31
3.4	Περιγραφή της τοπολογίας των δέντρων	33
3.5	Εκτίμηση των χρόνων απόσχισης	34
3.6	Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων μεταξύ των κλάδων	35
3.6.1	Κυτόχρωμα β	35
3.6.2	16s RNA	35
3.6.3	Συνδυασμένη εκτίμηση γενετικών αποστάσεων μεταξύ των κλάδων	36
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37
4.1	Φυλογένεση	37
4.1.1	Ενδοειδική ποικιλομορφία και διαφοροποίηση μεταξύ των κλάδων	37
4.1.2	Κλάδος Α: Δυτική Κρήτη 1 – ΑΝ - Ανατολική Κρήτη	38
4.1.3	Κλάδος Β: Δυτική Κρήτη 2	39
4.2	Φυλογεωγραφία	39
4.2.1	Διερεύνηση της γεωγραφικής κατανομής των γενεαλογικών γραμμών	39
4.2.2	Υποθετικά σενάρια εποίκισης της Κρήτης και των δορυφορικών νησιών της	41
4.3	Προοπτικές για μελλοντικές μελέτες	43
4.4	Συμπεράσματα	44
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	56

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος *Podarcis* αποτελεί την κυρίαρχη ομάδα ερπετών στην περιοχή της νότιας Ευρώπης, ενώ στον ελληνικό χώρο αντιπροσωπεύεται από την παρουσία 8 ειδών από τα οποία τα 5 είναι ενδημικά. Πρόσφατες μελέτες φυλογενετικού και φυλογεωγραφικού χαρακτήρα είχαν ως αποτέλεσμα την αναθεώρηση της συστηματικής εντός του γένους στην περιοχή του ελληνικού χώρου. Τα πιο πρόσφατα δεδομένα από την εν λόγω περιοχή είχαν οδηγήσει στην αναγνώριση των πληθυσμών του *Podarcis erhardii* από την Κρήτη ως νέο διακριτό είδος, για το οποίο προτάθηκε η ονομασία *Podarcis cretensis*, που ενδημεί στην Κρήτη και τις δορυφορικές της νησίδες. Στην παρούσα μελέτη γίνεται μια προσπάθεια διερεύνησης των φυλογενετικών σχέσεων των πληθυσμών του είδους *P. cretensis* με βάση τις αλληλουχίες του κυτοχρώματος β (cyt b) και της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας (16s rRNA) του mtDNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης. Εκτός από τη χρήση των εν λόγω γενετικών δεικτών για σκοπούς μοριακής φυλογένεσης, έγινε επίσης μια απόπειρα διερεύνησης της χωρικής κατανομής των απλοτύπων και των γενεαλογικών γραμμών που προκύπτουν από τη φυλογενετική ανάλυση, καθώς και μια εκτίμηση των χρόνων απόσχισης μεταξύ των γενεαλογικών γραμμών. Η τοπολογία των κύριων κλάδων που προέκυψαν από την φυλογενετική ανάλυση δεν διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι απλότυποι δημιουργούν ομάδες που δεν σχετίζονται με την γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων, καθώς τα άτομα της δυτικής Κρήτης δεν φαίνεται να μοιράζονται ένα κοντινό κοινό πρόγονο. Οι διαδικασίες απομόνωσης των ομάδων πληθυσμών στην περιοχή της Κρήτης σχετίζονται με γεγονότα που χρονολογούνται κυρίως μέσα στο Πλειόκαινο. Η χρήση δεικτών μεγαλύτερης ευαισθησίας, η βελτίωση των γνώσεών μας πάνω στην παλαιογεωγραφία της Κρήτης καθώς και η καλύτερη μελέτη της οικολογίας του εν λόγω είδους αποτελούν προτεραιότητες για την επίλυση του φυλογενετικού παράδοξου και την κατανόηση της σημερινής κατανομής του τάξου.

Λέξεις-Κλειδιά: μοριακοί δείκτες, κυτόχρωμα β, 16s rRNA, Κρήτη

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φυλογένεση και μοριακοί δείκτες

Το πεδίο της φυλογένεσης έχει ως αντικείμενο μελέτης τη διερεύνηση των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών. Με βάση τις μεταξύ τους ομοιότητες οι οργανισμοί μπορούν να ομαδοποιηθούν, με το σκεπτικό ότι ο βαθμός ομοιότητας τους καθορίζεται από το πόσο μακριά ή κοντά στο παρελθόν έζησε ο κοινός τους πρόγονος (Κορνήλιος, 2007).

Μέχρι πρόσφατα η αναπαράσταση των φυλογενετικών σχέσεων των οργανισμών βασιζόταν κυρίως σε μορφολογικούς χαρακτήρες. Ιδιαίτερα όσον αφορά τις φυλογενετικές σχέσεις σε ενδοειδικό επίπεδο, τέτοιου είδους μελέτες αδυνατούσαν να δώσουν μια σαφή εικόνα για τα πρότυπα της ενδοειδικής ποικιλομορφίας ή και να θεμελιώσουν πρότυπα που να ερμηνεύουν το χωρικό διαχωρισμό τους και το βαθμό διαφοροποίησής τους.

Η σύγκριση τμήματος ή ολόκληρης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας συγκεκριμένων γενετικών τόπων, η οποία εξετάζει τις σχέσεις των τάξεων μέσα από συναπαμορφίες και όχι με βάση την συνολική ομοιότητα, όπως ισχύει στις μορφολογικές αναλύσεις που στηρίζονται σε ποσοτικούς χαρακτήρες, έχει αποδειχθεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στη διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων που διέπουν τα τάξα (Πουλακάκης, 2005) . Σε γενικές γραμμές η χρήση μοριακών δεικτών στη φυλογένεση έχει τύχει πολύ μεγάλης αποδοχής ακόμα και από πολύ φανατικούς οπαδούς της μορφολογίας, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου οι μορφολογικοί χαρακτήρες αποτυγχάνουν να δώσουν μια ξεκάθαρη εικόνα για την εξελικτική ιστορία των μελετούμενων τάξεων (Michel-Salzat & Bouchon, 2000), όπως για παράδειγμα στην περίπτωση των κρυπτικών ειδών (cryptic species).

1.2 Η επιστήμη της Φυλογεωγραφίας

Η φυλογεωγραφία είναι το πεδίο της έρευνας που ασχολείται με τις αρχές και τις διαδικασίες που καθορίζουν τα γεωγραφικά πρότυπα των γενεαλογικών γραμμών, ειδικά εκείνων εντός του είδους αλλά και μεταξύ στενά συγγενικών ειδών . Ως παρακλάδι της Βιογεωγραφίας , η φυλογεωγραφία προσπαθεί να μελετήσει και να ερμηνεύσει τη σύγχρονη γεωγραφική κατανομή των διαφόρων εξελικτικών γραμμών

των οργανισμών και τον τρόπο που οι ιστορικές διαδικασίες έχουν επηρεάσει την εξάπλωση και την εξέλιξη των οργανισμών. Με βάση τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό πως ο χρόνος και ο χώρος είναι δύο συνδεδεμένοι άξονες της φυλογεωγραφίας, πάνω στους οποίους υπό ιδεατές συνθήκες αποτυπώνονται οι ιδιαίτερες γενεαλογίες των γονιδίων ή ειδών που μας ενδιαφέρουν (Avisé, 2000).

Οι πρώτες μελέτες ανάλυσης νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και των πολυμορφισμών που εμφανίζουν σε ενδοειδικό επίπεδο πραγματοποιήθηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 70' και έδειξαν ότι οι γενετικοί απλότυποι εμφανίζονται εντοπισμένοι γεωγραφικά και ότι οι ιεραρχικές τους σχέσεις αντικατοπτρίζουν την ιστορία των αντίστοιχων πληθυσμών (Avisé et al., 1979). Τα στοιχεία αυτά είχαν ως άμεσο αποτέλεσμα την ανάδειξη του κλάδου της Φυλογεωγραφίας στο χώρο της Εξελικτικής Βιολογίας και της Βιογεωγραφίας (Avisé et al., 1987). Από τότε και μέχρι σήμερα ο αριθμός των μελετών που σχετίζονται με το ευρύτερο πεδίο της Φυλογεωγραφίας έχουν αυξηθεί σημαντικά, με αποτέλεσμα τη σχεδόν εκθετική αύξηση των σχετικών δημοσιεύσεων σε επιστημονικά περιοδικά (Avisé, 2000).

1.3 Οι σαύρες ως οργανισμοί-μοντέλα για εξελικτικές μελέτες

Οι σαύρες έχουν αναδειχθεί ως οργανισμοί μοντέλα τα τελευταία χρόνια για την διεξαγωγή μελετών στον ευρύτερο χώρο της Εξελικτικής Βιολογίας, λόγω της συσσωρευμένης γνώσης πάνω στη δημογραφία τους, στις στρατηγικές επιβίωσης τους, καθώς και την προσαρμοστική οικομορφολογία και οικοφυσιολογία τους (Camargo et al., 2010). Επιπλέον τα συγκεκριμένα ζώα είναι εύκολο να βρεθούν στο πεδίο, ενώ χαρακτηρίζονται από μεγάλη ανοχή στις διαφορετικές μεταχειρίσεις. Τα παραπάνω πλεονεκτήματα καθιστούν τις σαύρες ιδανικούς οργανισμούς για την διεξαγωγή φυλογενετικών και φυλογεωγραφικών μελετών (Camargo et al., 2010).

1.4 Γενικά στοιχεία αναφορικά με το υπό εξέταση είδος

1.4.1 Γενικά στοιχεία για τις σαύρες της οικογένειας Lacertidae (Linnaeus, 1758)

Η οικογένεια Lacertidae περιλαμβάνει 32 γένη με περίπου 280 είδη (Arnold et al., 2007) τα οποία εξαπλώνονται στο μεγαλύτερο τμήμα της Ευρώπης, στην Ασία

και στην Αφρική (Πουλακάκης, 2005). Οι σαύρες της οικογένειας Lacertidae αποτελούν την επικρατέστερη ομάδα ερπετών στο χώρο της Ευρώπης αφού αντιπροσωπεύουν περίπου το 75% των ειδών της ευρωπαϊκής ερπετοπανίδας (Πουλακάκης, 2005). Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι είναι δυνατή η παρουσία αρκετών ειδών της οικογένειας Lacertidae στην ίδια περιοχή. Πιο συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι περισσότερα των 7 ειδών της οικογένειας Lacertidae μπορούν να είναι συμπάτρια, ενώ κάποια από αυτά μπορεί να ανήκουν και στο ίδιο γένος (Arnold & Burton 1978, Arnold 1987).

Όσον αφορά τη φυλογένεσή τους τα Lacertidae αποτελούν μια αναμφίβολα μονοφυλετική ομάδα ερπετών, ο καθορισμός της οποίας έγινε με βάση 10 μορφολογικά χαρακτηριστικά που αναγνωρίστηκαν ως συναπωμορφίες της συγκεκριμένης ομάδας (Estes et al., 1988). Σύμφωνα με τελευταίες μελέτες οι σαύρες της οικογένειας Lacertidae είναι πιο συγγενικές με τα Αμφισβαίνια, μια ομάδα που περιλαμβάνει σκωληκόμορφες χωρίς άκρα σαύρες που ζουν στο έδαφος, παρά με την οικογένεια Teiidae (Scincomorpha) (Arnold 2004, Townsend et al. 2004) μια υπόθεση που υποστηρίζεται και από μοριακά δεδομένα (Πουλακάκης 2005).

Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των γενών της οικογένειας δεν είναι έχουν προσδιοριστεί ακριβώς, ακόμα και μετά την ανάλυση 5000 βάσεων μιτοχονδριακού DNA (Fu, 2000). Οι πιο σημαντικές φυλογενετικές μελέτες έγιναν από τον Arnold (1989) με βάση τη μορφολογία, από τους Mayer & Benyr (1994) πάνω στην εξέλιξη των αλβουμινών, από τους Harris et al. (1998) με βάση το μιτοχονδριακό DNA και τη μορφολογία, και από τον Fu (2000) με βάση το μιτοχονδριακό DNA. Όλες αυτές οι μελέτες με εξαίρεση αυτή του Arnold (1989) συμφωνούν στην υποδιαίρεση των Lacertidae σε δύο υποοικογένειες: τα Gallotinae και τα Lacertinae (Sindaco & Jeremcenko, 2008). Η υποοικογένεια Lacertinae (στην οποία εντάσσεται μεταξύ άλλων και το γένος *Podarcis*) αποτελεί μονοφυλετική ομάδα και περιλαμβάνει όλα τα είδη της Ευρώπης και των παρακείμενων περιοχών, ενώ χαρακτηρίζεται από πολύ γρήγορους ρυθμούς διαφοροποίησης και ειδογένεσης (Arnold, 2004).

1.4.2 Το γένος *Podarcis* (Wagler, 1830) και η αντιπροσώπευσή του στον ελληνικό χώρο

Το γένος *Podarcis* (Squamata: Lacertidae) αποτελείται συνολικά από 21 είδη στη νότια Ευρώπη (Sindaco & Jeremcenko, 2008), συμπεριλαμβάνοντας τα

πρόσφατα αναγνωρισμένα *P. levendis* και *P. cretensis* από την περιοχή της Ελλάδας (Lymberakis et al., 2008). Το συγκεκριμένο γένος αποτελεί την κυρίαρχη ομάδα ερπετών στην εν λόγω περιοχή (Harris & Arnold, 1999; Harris & Sa Souza, 2002; Sa Souza & Harris, 2002), ενώ εξαπλώνεται επίσης σε ένα τμήμα της Βορειοδυτικής Αφρικής καθώς και σε ένα μικρό τμήμα της Βορειοδυτικής Ανατολίας (Sindaco & Jeremcenko, 2008). Η ταξινομική του είναι αρκετά περίπλοκη και ανανεώνεται συνεχώς, κυρίως λόγω του ότι τα είδη του γένους είναι αρκετά όμοια μορφολογικά όμως χαρακτηρίζονται από υψηλή ενδοειδική ποικιλομορφία (Arnold, 2002).



Εικόνα 1.4.2: Η κατανομή του γένους *Podarcis*. Η διακεκομμένη γραμμή υποδηλώνει τα ανατολικά όρια του γένους (Arnold, 1973)

Από φυλογενετικής σκοπιάς υπάρχουν σημαντικά στοιχεία τόσο από μορφολογικά όσο και από γενετικά δεδομένα ότι το γένος *Podarcis* αποτελεί μια μονοφυλετική ομάδα (Arnold 1973; Fu, 2000; Oliveiro et al., 2000). Ο διαχωρισμός του από το γένος *Lacerta* έγινε από τον Arnold (1973) με βάση τη μορφολογία και επιβεβαιώθηκε αργότερα με βάση μοριακές αναλύσεις (Harris & Arnold, 1999; Carranza et al., 2004).

Οι σαύρες του γένους *Podarcis* έχουν την τυπική μορφολογία των Lacertidae. Το μέγεθός τους είναι μέτριο, με το μέγιστο μήκος κεφαλοκορμού στα ενήλικα άτομα να φτάνει τα 8,5-9cm, και η ουρά τους έχει μήκος δύο φορές μεγαλύτερο από αυτό του σώματος (Πουλακάκης 2005). Είναι ζώα φωτόκα με μεγάλη ποικιλότητα στον τύπο και τον χρωματισμό των σχεδίων του σώματός τους, ενώ παρουσιάζουν υψηλές αναριχητικές ικανότητες και εκμεταλλεύονται μεγάλο εύρος μικροενδιαιτημάτων (Πουλακάκης 2005). Παρά το γεγονός πως τα ενδιαιτήματά τους μπορεί να

σχετίζονται σχεδόν με όλους του τύπους βλάστησης, εμφανίζουν μια προτίμηση για φρύγανα και μακί (Πουλακάκης 2005).

Στον ελληνικό χώρο το γένος *Podarcis* χαρακτηρίζεται από την παρουσία 8 ειδών (Πίνακας 1.4.2) από τα οποία τα 5 είναι ενδημικά της Ελλάδας (Lymberakis & Poulakakis, 2010). Πιο συγκεκριμένα τα είδη *Podarcis erhardii* (Bedriaga, 1882), *Podarcis peloponnesiaca* (Bibron & Bory, 1833), *Podarcis levendis* (Lymberakis et al., 2008) και *Podarcis cretensis* (Wettstein, 1952) αποτελούν ενδημικά είδη της Ελλάδας και σύμφωνα με πρόσφατες φυλογενετικές μελέτες αποτελούν μαζί ένα μονοφυλετικό κλάδο με ισχυρή στατιστική υποστήριξη (Πουλακάκης 2005, Poulakakis et al., 2005a, Lymberakis et al., 2008). Επιπλέον στον ελληνικό χώρο εξαπλώνονται τα είδη *Podarcis gaigae* (Werner, 1930), *Podarcis milensis* (Bedriaga, 1882) τα οποία είναι επίσης ενδημικά καθώς και τα *Podarcis taurica* (Pallas, 1814) και *Podarcis muralis* (Laurenti, 1768).

Πίνακας 1.4.2: Τα είδη του γένους *Podarcis* στον ελληνικό χώρο και η περιοχή εξάπλωσής τους

Είδος & Συγγραφέας	Γεωγραφική εξάπλωση
<i>Podarcis erhardii</i> (Bedriaga, 1882)	Ηπειρωτική Ελλάδα & Κυκλάδες
<i>Podarcis peloponnesiaca</i> (Bibron & Bory, 1833)	Πελοπόννησος
<i>Podarcis levendis</i> (Lymberakis et al., 2008)	Νήσος Πορί και Λαγουβάρδος
<i>Podarcis cretensis</i> (Wettstein, 1952)	Κρήτη & δορυφορικά νησιά
<i>Podarcis gaigae</i> (Werner, 1930)	Νησιωτικό συγκρότημα Σκύρου
<i>Podarcis milensis</i> (Bedriaga, 1882)	Νησιωτικό συγκρότημα Μήλου
<i>Podarcis taurica</i> (Pallas, 1814)	Αλβανία, Ελλάδα, Βουλγαρία, Δυτική Τουρκία, Ουγγαρία, Ρουμανία, Ουκρανία, Μολδαβία
<i>Podarcis muralis</i> (Laurenti, 1768)	Νότια & Κεντρική Ευρώπη (όχι νησιά)

1.4.3 Η ταξινομική αναθεώρηση των πληθυσμών του *Podarcis erhardii* από την Κρήτη

Τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες που έχουν διεξαχθεί στον ελληνικό χώρο με επίκεντρο μελέτης το γένος *Podarcis*, έφεραν στο φως καταστάσεις κρυφής ποικιλομορφίας και παραφυλίας οι οποίες απαιτούσαν την επαναπροσέγγιση της ταξινομικής κατάστασης εντός του γένους (Poulakakis et al., 2003; Poulakakis et al., 2005a; Lymberakis et al., 2008).

Το είδος *P. erhardii* που κατανέμεται σήμερα σχεδόν σε όλη την ηπειρωτική Ελλάδα, στις Κυκλάδες και στις Βόρειες Σποράδες μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι

κατανέμεται και στην Κρήτης και το Πορί (Valakos et al., 1999). Από την άλλη το είδος *P. peloponnesiaca* κατανέμεται αποκλειστικά στην περιοχή της Πελοποννήσου (Sindaco & Jeremcenko, 2008). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν πως το είδος *P. erhardii* αποτελεί ένα παραφυλετικό τάξο σε σχέση με το είδος *P. peloponnesiaca* (Poulakakis et al., 2003; Poulakakis et al., 2005a, Πουλακάκης, 2005). Τα αποτελέσματα αυτά προέκυψαν αρχικά μέσω φυλογενετικής ανάλυσης των πληθυσμών του είδους *Podarcis erhardii*, με δείγματα προερχόμενα από όλο το εύρος της κατανομής του τάξου (συμπεριλαμβανομένης και της Κρήτης), με τη χρήση του mtDNA ως γενετικού δείκτη (Poulakakis et al., 2003; Poulakakis et al., 2005a). Το γεγονός πως τα δύο παραπάνω τάξα είναι παραφυλετικά ουσιαστικά σημαίνει πως ο κοινός πρόγονος όλων των πληθυσμών της *P. erhardii* έδωσε γένεση σε έναν ακόμα κλάδο του οποίου οι απόγονοι δεν συμπεριλαμβάνονται στο εν λόγω είδος. Αυτός ο κλάδος είναι εκείνος από τον οποίο προέκυψαν οι αρτίγονοι πληθυσμοί του είδους *P. peloponnesiaca*. Εν προκειμένου σε αυτή την περίπτωση όπως και σε άλλες περιπτώσεις παραφυλίας απαιτείται ο επαναπροσδιορισμός της ταξινομικής των ειδών του γένους, μια προσέγγιση που είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο για τους σκοπούς της εξελικτικής όσο και της διαχειριστικής Βιολογίας.

Οι Lymberakis et al (2008) χρησιμοποίησαν τα παραπάνω δεδομένα σε συσχέτιση με τη διαφοροποίηση μορφολογικών χαρακτήρων και πρότειναν πως οι πληθυσμοί *P. erhardii* της Κρήτης μπορούν να αναχθούν στο επίπεδο του είδους, για το οποίο πρότειναν την ονομασία *P. cretensis*. Το είδος *P. cretensis* (Εικ.2) διαφέρει όσον αφορά συγκεκριμένους μορφολογικούς χαρακτήρες (Lymberakis et al., 2008) από τα είδη *P. erhardii*, *P. levendis* και *P. peloponnesiaca* και οι κλάδοι που προκύπτουν από την φυλογενετική ανάλυση των μορφολογικών χαρακτήρων (4 φολιδωτικοί χαρακτήρες) έχουν ισχυρή στατιστική υποστήριξη (όπως και εκείνοι που προκύπτουν από μοριακά δεδομένα) (Lymberakis et al., 2008). Επιπλέον η τοπολογία των κλάδων αντιστοιχεί απόλυτα στην τοπολογία που προκύπτει από την φυλογενετική ανάλυση που προκύπτει από μοριακές αναλύσεις (Lymberakis et al., 2008). Όσον αφορά τους βιομετρικούς χαρακτήρες η ανάλυση τους δεν έρχεται σε αντίθεση την προτεινόμενη ταξινομική προσέγγιση με βάση τους φολιδωτικούς χαρακτήρες, ωστόσο δεν είναι ιδιαίτερα πληροφοριακοί (Lymberakis et al., 2008).



Εικόνα 1.4.3: Ενήλικο άτομο *Podarcis cretensis* από την περιοχή της Κάτω Μηλιάς (Δυτ. Κρήτη) (http://www.euroherp.com/species/Podarcis_cretensis/)

Η αναγωγή των πληθυσμών της *P. erhardii* στην Κρήτη στο επίπεδο του είδους έγινε με τη χρήση της έννοιας του εξελικτικού είδους, αφού τα τάξα είναι αλλοπάτρια (Lymberakis et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα σύμφωνα με την άποψη των Good & Wake (1993) ο γενικός σκοπός στη συστηματική βιολογία είναι να διακρίνουμε συνεκτικές-ομοιόμορφες γενετικά ομάδες, οι οποίες είναι εξελικτικά ανεξάρτητες και στη συνέχεια να τις ανάγουμε στο επίπεδο του είδους. Στην περίπτωση των εν λόγω ειδών του γένους *Podarcis*, η παραπάνω πρόταση είναι εφαρμόσιμη (Lymberakis et al., 2008).

1.4.4 Μορφολογικά και οικολογικά χαρακτηριστικά του είδους *Podarcis cretensis*

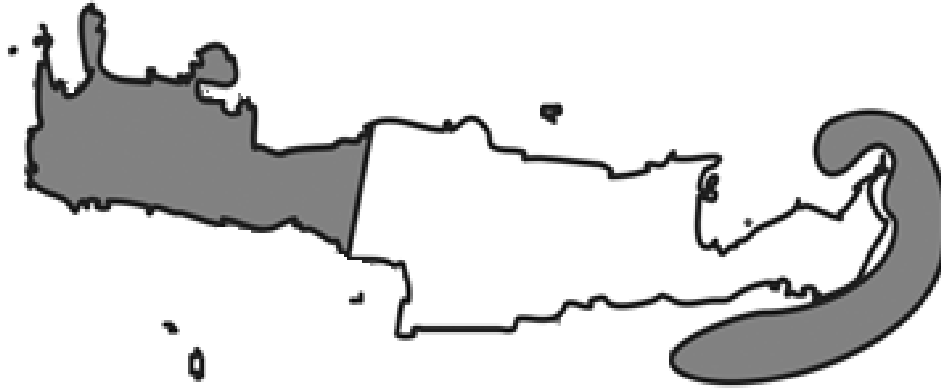
Οι σαύρες του είδους *P. cretensis* είναι από τις μικρότερες σαύρες του γένους που συναντώνται στον Ελληνικό χώρο μαζί με τις σαύρες του είδους *P. erhardii* (Lymberakis et al., 2008). Το μήκος του σώματος, χωρίς την ουρά, φτάνει κοντά στα 7 cm, ενώ το μήκος της ουράς που έχει σχεδόν διπλάσιο μήκος από εκείνο του σώματος μπορεί να ξεπερνά τα 11cm σε κάποια αρσενικά (Lymberakis et al., 2008). Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του είδους είναι η παρουσία φυλετικού

διμορφισμού, κυρίως όσον αφορά κάποιους φολιδωτικούς χαρακτήρες, όπως ο αριθμός των μηριαίων πόρων και το μέγεθος των κροταφικών φολίδων (Lymberakis et al., 2008). Τα στοιχεία αυτά είναι ενδιαφέροντα ωστόσο ο φυλετικός διμορφισμός ως προς φολιδωτικούς χαρακτήρες είναι κοινό φαινόμενο σε πολλές οικογένειες σαυρών (Cole, 1966).

Όσον αφορά τα ενδιαιτήματα του είδους στο νησί της Κρήτης αυτά περιλαμβάνουν βραχώδεις ή και αμμώδεις ακτογραμμές όπως επίσης και τμήματα φρυγανικών οικοσυστημάτων απομακρυσμένα από την ακτή που μπορεί να φτάνουν σε αρκετά μεγάλα υψόμετρα (Poulakakis et al., 2005a, Πουλακάκης 2005). Πιο συγκεκριμένα το είδος παρουσιάζει μεγάλη οικολογική πλαστικότητα στο νησί και εξαπλώνεται επίσης κοντά σε αστικές περιοχές και κήπους. Αυτό ακριβώς το χαρακτηριστικό έχει οδηγήσει στη μεγάλη μορφολογική ποικιλομορφία όσον αφορά κυρίως τους βιομετρικούς χαρακτήρες, αφού οι χαρακτήρες αυτοί επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από το περιβάλλον (Lymberakis et al., 2008). Ωστόσο η μορφολογική αυτή ποικιλομορφία δεν αντιστοιχεί σε παρόμοια επίπεδα γενετικής διαφοροποίησης. Το αποτέλεσμα είναι η αναγνώριση των διακριτών αυτών μορφολογικά και γεωγραφικά ομάδων ως διαφορετικές οικομορφές (Lymberakis et al., 2008).

1.4.5 Γεωγραφική εξάπλωση του είδους *Podarcis cretensis*

Το είδος *P. cretensis* είναι ενδημικό της Κρήτης και των δορυφορικών νησιών της (Lymberakis et al., 2008). Στη Κρήτη κατανέμεται μόνο στη δυτική πλευρά του νησιού και πιο συγκεκριμένα δυτικά του κατακόρυφου άξονα που χωρίζει το νησί στα δύο στην περιοχή του Ρεθύμνου (Lymberakis et al., 2008). Το είδος στο νησί μπορεί κανείς να το συναντήσει από τα πιο χαμηλά υψόμετρα μέχρι το υψόμετρο των 2000μ. σε κάποιες περιπτώσεις (Lymberakis et al., 2008). Οι δορυφορικές νησίδες της Κρήτης στις οποίες το είδος είναι παρών είναι οι εξής (από τα νοτιοδυτικά προς ανατολικά και βόρεια, και πάλι προς τα ανατολικά): Ελαφόνησος (νησίδα), Άρτεμις, Γαιδουρονήσι (Χρυσή), Μικρονήσι (δίπλα στο Γαιδουρονήσι προς τα ανατολικά), Καβαλλοί, Ελάσα, Παξιμάδα, Δραγονάδα, Πρασσονήσι (αμέσως βορειότερα της Δραγονάδας), Αυγό, Δία, Κάργα, Αγ. Νικόλαος (μέσα στον κόλπο της Σούδας) και οι Άγιοι Θεόδωροι (Lymberakis et al., 2008).



Εικόνα 1.4.5: Η γεωγραφική κατανομή του είδους *Podarcis cretensis* στην Κρήτη και τα δορυφορικά νησιά (σκιασμένες περιοχές)

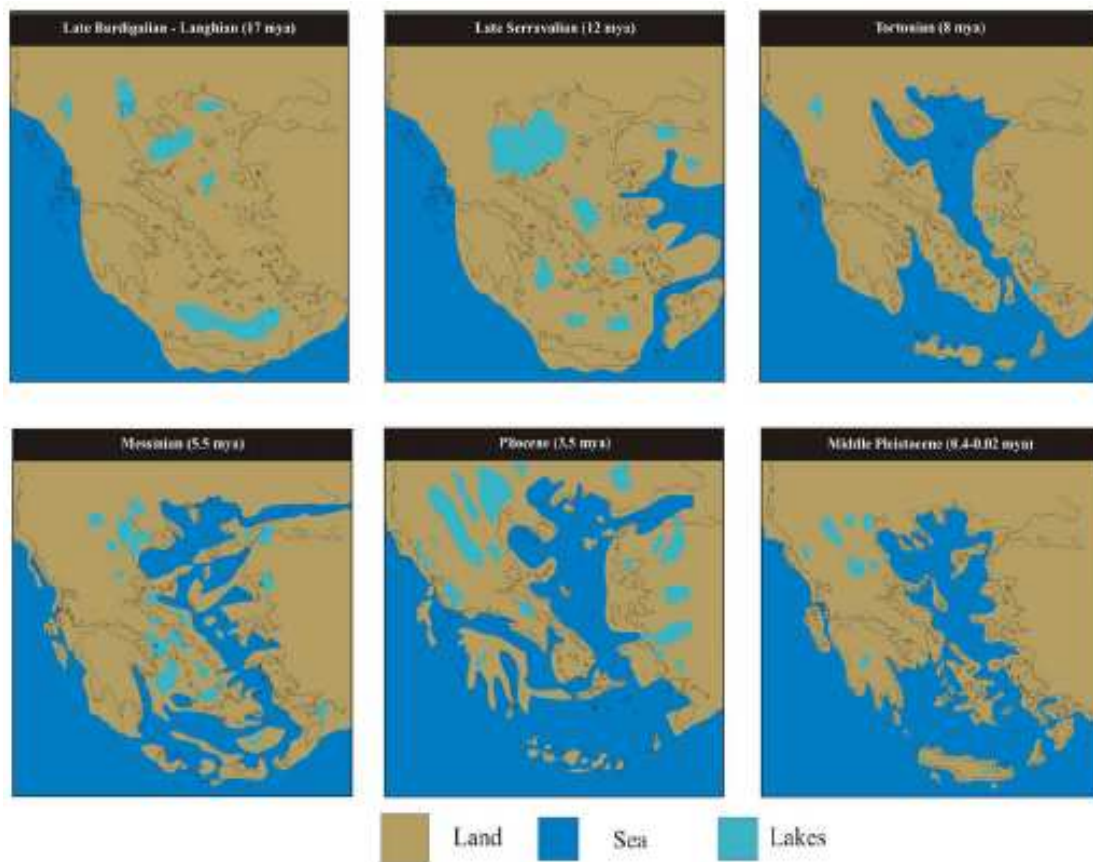
1.5 Παλαιογεωγραφία του Νοτίου Αιγαίου και της Κρήτης

Η ιστορία των νησιών του νότιου Αιγαίου τόξου ξεκινά από το μέσο Μειόκαινο (15-11 εκ. χρόνια πριν), οπότε και ξεκίνησε η εκτεταμένη διαμερισματοποίηση της Αιγαϊδας (χερσαία μάζα η οποία περιελάμβανε την σημερινή χερσόνησο της Ελλάδας καθώς και την περιοχή του Αιγαίου πελάγους) η οποία είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία πολυάριθμων μορφών νησιών στο χώρο του Αιγαίου (Dermitzakis & Papanikolaou, 1981; Le Pichon & Angelier, 1981). Σύμφωνα με πιο πρόσφατες μελέτες των γεωδυναμικών διεργασιών της περιοχής φαίνεται πως όλη αυτή η διαδικασία που είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το σχηματισμό της Κρήτης ξεκίνησε 23-26εκ. χρόνια πριν (Meulenkamp et al., 1988).

Όσον αφορά την Κρήτη παρά το γεγονός πως δεν υπάρχει απόλυτη ταύτιση απόψεων για τις ακριβείς περιόδους και τη διάρκεια των χερσαίων επαφών της με άλλες ηπειρωτικές περιοχές, είναι γενικά αποδεκτό πως η οριστική και πλήρης απομόνωσή συνέβη πριν από περίπου 5εκ. χρόνια στο κατώτερο Πλειόκαινο (Meulenkamp et al., 1985).

Η Κρήτη γενικά κατέχει εξέχουσα θέση ανάμεσα στα ελληνικά νησιά λόγω του ορεινού της χαρακτήρα. Συγκεκριμένα στην Κρήτη συναντά κανείς πάνω από 50 κορυφές που ξεπερνούν το υψόμετρο των 2000μ. (Lymberakis & Poulakakis, 2010; Chatzaki et al., 2005), ενώ το 39% της επιφανείας της βρίσκεται πάνω από τα 400μ. και το 12,5% πάνω από τα 800μ. (Chatzaki et al., 2005). Τα βουνά της Κρήτης είναι γενικά νέα εξετάζοντάς τα στον γεωλογικό χρόνο (Chatzaki et al., 2005). Πιο

συγκεκριμένα μέχρι και πριν από 5 εκ. χρόνια η Κρήτη αποτελούνταν από πολυάριθμες νησιωτικές μάζες, των οποίων το υψόμετρο δεν ξεπερνούσε τα 500μ. (Meulenkamp et al., 1988).

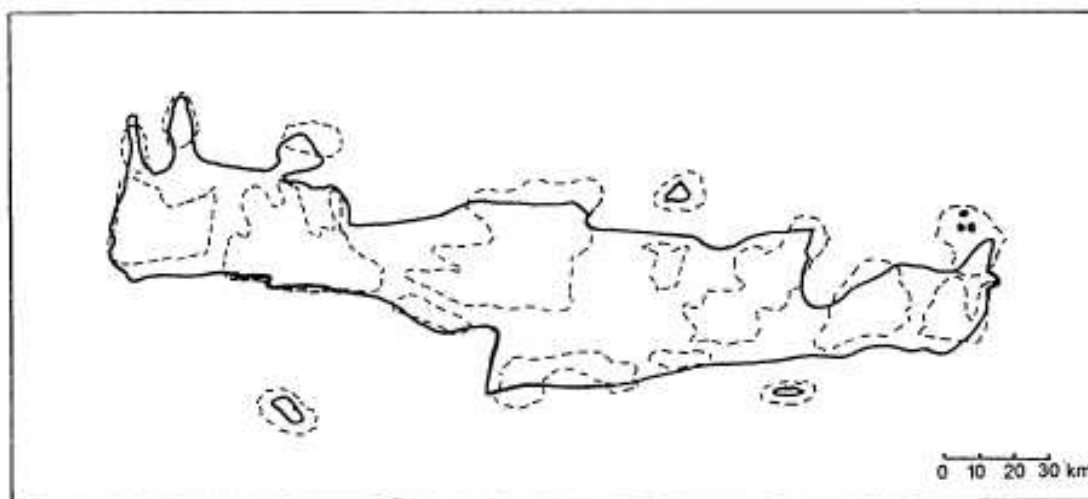


Εικόνα 1.5.1: Η παλαιογεωγραφική εξέλιξη του Αιγαίου από το ανώτερο Βουρδιγάλιο-Λάγγιο (17 εκ. χρόνια πριν) μέχρι και το μέσο Πλειστόκαινο (800.000 χρόνια πριν). (Creutzbutg 1963; Dermitzakis & Papanikolaou 1981; Dermitzakis 1990)

Κατά την περίοδο του Μεσσηνίου (6 εκ.χ. πριν) η ανύψωση των χερσαίων μαζών της Ιβηρικής χερσονήσου που είχε ξεκινήσει ήδη από το μέσο Μειόκαινο, ολοκληρώθηκε και ως αποτέλεσμα η επικοινωνία μεταξύ Μεσογείου και Ατλαντικού περιορίστηκε (Dermitzakis, 1994). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την λεγόμενη «κρίση αλατότητας του Μεσσηνίου» ένα φαινόμενο το οποίο περιελάμβανε την πτώση της στάθμης της θάλασσας, την επανασύνδεση χερσαίων μαζών σε ορισμένες περιπτώσεις καθώς και την εναπόθεση μεγάλου πάχους στρωμάτων αλάτων στις θαλάσσιες λεκάνες (Dermitzakis, 1994). Η δημιουργία χερσαίων γεφυρών μεταξύ Κρήτης και Πελοποννήσου είναι πιθανή, ωστόσο το γεγονός αυτό όμως δεν αποτελεί απόδειξη για την ανταλλαγή ατόμων ή για ύπαρξη γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών της Κρήτης και άλλων περιοχών. Αυτό διότι η Κρήτη ήταν

απομονωμένη από την Πελοπόννησο και τις Κυκλάδες μέσω βαθιών φαραγγιών που δεν επέτρεψαν τις μετακινήσεις των ζωικών οργανισμών (Schüle, 1993).

Την περίοδο του κατώτερου Πλειόκαινου (5,5-4εκ.χρ. πριν) η επικοινωνία μεταξύ Ατλαντικού και Μεσογείου είχε αποκατασταθεί και η στάθμη της θάλασσας την περίοδο αυτή έφτασε στα υψηλότερα επίπεδα (Legakis & Kypriotakis, 1994) κάτι που σημαίνει εκ νέου απομόνωση Κρήτης-Πελοποννήσου και δημιουργία πολυάριθμων νησιών στην περιοχή της Κρήτης που χωρίζονταν με θαλάσσια φράγματα (Sondaar et al., 1996) (Εικ. 5). Η συγκρότηση μιας ενιαίας χερσαίας μάζας καθώς και τα τεκτονικά φαινόμενα που οδήγησαν στην εκτεταμένη ανύψωση του νησιού και την δημιουργία των ορεινών ζωνών (ζώνη άνω των 1600μ.) χρονολογούνται στο τέλος του Πλειόκαινου και τις αρχές του Πλειστοκαίνου (2-1,5 εκ. χρόνια πριν) (Chatzaki et al., 2005; Dermitzakis, 1994).



Εικόνα 1.2.2: Η μορφή του νησιού της Κρήτης (διακεκομμένες γραμμές) κατά την περίοδο του Πλειόκαινου (Legakis & Kypriotakis, 1994).

Το κυρίως νησί της Κρήτης περιβάλλεται από πολυάριθμες ομάδες νησιών, κάθε μια από τις οποίες έχει την δικιά της ιστορία όσον αφορά την σύνδεση της με το κυρίως νησί, το χρόνο σχηματισμού και την επίδραση του ανθρώπου (Parmakelis et al., 2003). Πιο συγκεκριμένα η ομάδα του Κουφονησιού (νοτιοανατολικά της Κρήτης) που περιλαμβάνει τις νησίδες Στρογγυλό, Μακρουλό, Μαρμαρά, Κουφονήσι και Τραχηλο δημιουργήθηκε κατά το Ολόκαινο (Peters, 1985), ενώ δεν ήταν ποτέ συνδεδεμένη με το κυρίως νησί της Κρήτης (Parmakelis et al., 2003). Η πλήρης απομόνωση της ομάδας αυτής σε ξεχωριστά νησιά έγινε κατά τους ιστορικούς χρόνους (Parmakelis et al., 2003).

Το νησιωτικό σύμπλεγμα που περιλαμβάνει την Παξιμάδα και την Δραγονάδα και τη Γιανυσάδα είναι πολύ πιθανό όπως φαίνεται στην εικόνα 1.5.2 να επικοινωνούσε με το κυρίως νησί της Κρήτης κατά την περίοδο του Πλειοκαίνου αλλά και σε πιο πρόσφατες περιόδους στις οποίες η θαλάσσια στάθμη ήταν ακόμα χαμηλότερη (παγετώδεις περίοδοι). Τα νησιά Χρυσή αλλά και η Δία με το Αυγό χωρίζονται από την Κρήτη από θαλάσσια φράγματα βάθους μεγαλύτερου των 200μ. (Κασαπίδης, 1996), ενώ κατά την περίοδο του Πλειοκαίνου δεν φαίνεται να έχουν σύνδεση με το κυρίως νησί (Εικ.1.5.2). Μάλιστα υπάρχουν κάποια στοιχεία που υποστηρίζουν ότι η οριστική απομόνωση μεταξύ Κρήτης και Δίας πραγματοποιήθηκε στο Μεσσήνιο 6 εκ.. χρόνια πριν (Εικ.1 παράρτημα, Schilthuitzen et al., 2004).

1.6 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Στην παρούσα μελέτη γίνεται μια προσπάθεια διερεύνησης των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των πληθυσμών του είδους *P. cretensis* με τη χρήση μοριακών δεικτών. Άλλωστε όταν το αντικείμενο μελέτης είναι η επίλυση της φυλογένεσης των πληθυσμών εντός του είδους, όπως είναι και στη συγκεκριμένη μελέτη, η επιλογή και η χρήση κατάλληλων μοριακών δεικτών μπορεί να παρουσιάσει μια καλά επιλυμένη φυλογένεση των πληθυσμών του είδους, ιδιαίτερα σε είδη με χαμηλή ενδοειδική ποικιλομορφία στη μορφολογία τους. Παρά το γεγονός πως το είδος *P. cretensis* χαρακτηρίζεται από σχετικά υψηλή ποικιλομορφία όσον αφορά συγκεκριμένους μορφολογικούς χαρακτήρες, αυτοί δεν αντιστοιχούν σε παρόμοια επίπεδα γενετικής διαφοροποίησης (Lymberakis et al., 2008). Επομένως απαιτείται η χρήση δεικτών που εξελίσσονται λιγότερο ακανόνιστα, με ταχύ ρυθμό εξέλιξης ωστόσο, ώστε να αποκτήσουμε μια σαφή εικόνα για την εξελικτική ιστορία του είδους στην περιοχή της Κρήτης. Προκειμένου να αποκτήσουμε μια σαφή εικόνα όσον αφορά το μέγεθος της διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών γίνεται επίσης μια εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων τόσο μεταξύ του συνόλου των διαφορετικών απλοτύπων από κάθε πληθυσμό όσο και μεταξύ των ομάδων απλοτύπων που δημιουργούνται από τη φυλογενετική ανάλυση.

Μελέτες που έχουν διεξαχθεί πάνω στη φυλογένεση και τη φυλογεωγραφία του γένους *Podarcis* στον ελληνικό χώρο έδειξαν ότι οι απλότυποι της σαύρας *P. cretensis* σχηματίζουν ομάδες που δεν σχετίζονται με την γεωγραφική κατανομή των δειγμάτων (Poulakakis et al., 2003; Poulakakis et al., 2005a). Στην παρούσα μελέτη

χρησιμοποιείται ένα συνδυασμένο σετ δεδομένων για την περαιτέρω διερεύνηση του παραπάνω προτύπου.

Εκτός από τη φυλογενετική ανάλυση στην παρούσα εργασία γίνεται επίσης μια προσπάθεια ερμηνείας της γεωγραφικής κατανομής των απλοτύπων της σαύρας *P. cretensis*. Η προσπάθεια μελέτης και ερμηνείας των φαινομένων και των διεργασιών που οδήγησαν το συγκεκριμένο τάξο στη σημερινή αξιοπερίεργη κατανομή του στην Κρήτη και τα δορυφορικά της νησιά γίνεται με την εφαρμογή της υπόθεσης του μοριακού ρολογιού, ώστε να αποσαφηνιστούν εν μέρει σε χρονική κλίμακα τα γεγονότα που έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην εξελικτική ιστορία των πληθυσμών του είδους.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή δειγμάτων

Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη βρίσκονται αποθηκευμένα στις συλλογές του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και αφορούν δείγματα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των ερευνητικών αποστολών του προσωπικού του μουσείου. Αξίζει να αναφερθεί πως κάποια από τα δείγματα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν από άλλους επιστήμονες εντός η και εκτός του Πανεπιστημίου Κρήτης για διάφορους ερευνητικούς σκοπούς.

Ο τρόπος διατήρησης των περισσότερων δειγμάτων ήταν σε μπουκαλάκια που περιείχαν 75% αλκοόλη, ενώ μόνο σε λίγες περιπτώσεις τα δείγματα ήταν διατηρημένα σε 100% αλκοόλη. Επιπλέον το γεγονός ότι κάποια από τα δείγματα αυτά ήταν αρκετά παλιά (χαρακτηριστικά αναφέρω ότι συμπεριλήφθηκαν δείγματα που είχαν συλλεχθεί πριν το 1995) σε συνδυασμό πάντα με τις κακές συνθήκες διατήρησης απαιτούσαν ιδιαίτερη μεταχείριση του ιστού ώστε να είναι επιτυχής η εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA.

Επιπλέον αξίζει να αναφέρουμε πως δείγματα από τοποθεσίες-κλειδιά της δυτικής Κρήτης ήταν περιορισμένα ενώ κάποια από αυτά είχαν συλλεχθεί με τη χρήση παγίδων pitfall (όπως τα περισσότερα δείγματα από το Λισσό του νομού Χανίων). Το γεγονός αυτό δυσκόλεψε τη διαδικασία απομόνωσης DNA, η οποία δεν ήταν ιδιαίτερα επιτυχής σε όλες τις περιπτώσεις.

Τέλος επιχειρήθηκε η λήψη ιστού από κάποια δείγματα στα οποία το ζώο δεν ήταν ακέραιο. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα ενός δείγματος από την περιοχή της Σαμαριάς Χανίων από το οποίο έλειπε σχεδόν όλη η ουρά, ενώ σε άλλες περιπτώσεις το δείγμα αντιπροσωπευόταν μόνο από ένα μικρό κομμάτι της ουράς.

Το σύνολο των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις της παρούσας μελέτης, με πληροφορίες για την ακριβή τοποθεσία, την ημερομηνία συλλογής και την αναφορά φαίνονται στον πίνακα 1 του παραρτήματος. Η γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων φαίνεται στην εικόνα 2 του παραρτήματος. Πιο συγκεκριμένα έγινε προσπάθεια να συμπεριληφθούν δείγματα από όλο το εύρος της κατανομής του είδους *P. cretensis* έτσι ώστε να αποφευχθεί όσο είναι δυνατόν η απώλεια μοναδικών απλοτύπων. Στις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες του κυτοχρώματος β (cyt *b*) και της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας του

μιτοχονδρίου (16s r RNA) από 23 δείγματα της Κρήτης τα οποία είχαν αλληλουχηθεί από προηγούμενες μελέτες. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες του *cyt b* από 13 άτομα της Κρήτης τα οποία έχουν επίσης αλληλουχηθεί σε προηγούμενες μελέτες, ενώ για τα δείγματα αυτά δεν υπήρχε η αντίστοιχη αλληλουχία για το 16s rRNA.

Τέλος για τη ρίζωση του δέντρου κατά τις φυλογενετικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν ως εξωομάδα οι αλληλουχίες του *cyt b* και του 16s rRNA από 2 δείγματα *P. lewendis* (Poulakakis et al., 2003, Πουλακάκης 2005) (AF486221-AF486222), καθώς και οι αλληλουχίες των δύο γονιδίων από 10 άτομα *P. peloponnesiaca* (Poulakakis et al. 2003 , Poulakakis et al., 2005a, Πουλακάκης, 2005).

2.2 Πειραματική Διαδικασία

Κατά την διάρκεια των εργαστηριακών αναλύσεων, ελήφθησαν όλες οι αναγκαίες προφυλάξεις, τόσο για την ασφάλεια του ερευνητή, όσο και για την αποφυγή μολύνσεων των δειγμάτων. Η τυπική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει συνοπτικά τα παρακάτω στάδια:

1. Προετοιμασία και πλύση του ιστού
2. Εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA
3. Πολλαπλασιασμός των γονιδίων στόχων μέσω PCR
4. Καθαρισμός του προϊόντος της PCR
5. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε αυτοματοποιημένη συσκευή προσδιορισμού νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

2.2.1 Προετοιμασία και πλύση του ιστού

Για τη διαδικασία της απομόνωσης ολικού γενωμικού DNA, πάρθηκε ένα μικρό κομμάτι ιστού από κάθε ζώο και τοποθετήθηκε σε ένα ξεχωριστό erpendorf του 1,5ml. Στα ζώα τα οποία είχαν την ουρά τους άθικτη έγινε προσπάθεια να παρθεί ιστός από το εσωτερικό του σώματος (συκώτι ή πνεύμονες) με την προϋπόθεση βέβαια ότι τα δείγματα ήταν πρόσφατα. Αυτό διότι έγινε προσπάθεια να αποφευχθεί η αλλοίωση των εξωτερικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων, καθώς πολλοί από τους εξωτερικούς χαρακτήρες αποτελούν αντικείμενο μορφολογικών μελετών. Στις

περισσότερες περιπτώσεις το απαιτούμενο κομμάτι του ιστού πάρθηκε από τμήμα της ουράς ενώ στα δύσκολα δείγματα έγινε προσπάθεια να χρησιμοποιηθεί τμήμα του οστού της ουράς.

Στη συνέχεια έγινε πλύση του ιστού κάθε δείγματος με διάλυμα πλύσης του ιστού (Tris-HCL συγκέντρωσης 10μM και pH=8) (Austin & Melville, 2006). Πιο συγκεκριμένα σε κάθε δείγμα ιστού προστέθηκε 1ml από το παραπάνω διάλυμα και στη συνέχεια γινόταν ελαφρά ανάδευση και επώαση των δειγμάτων σε multivortex για περίπου 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (~25°C). Στις περισσότερες περιπτώσεις και ειδικότερα σε δείγματα που απαιτούσαν ιδιαίτερη μεταχείριση (δύσκολα δείγματα) έγινε πλύση του ιστού παραπάνω από 1 φορά (μέγιστο 3), αφαιρώντας το αρχικό διάλυμα και προσθέτοντας εκ νέου 1ml διαλύματος πλύσης. Η παραπάνω διαδικασία έγινε με σκοπό την αφαίρεση υπολοίπων αιθανόλης και την ενυδάτωση του ιστού (Austin & Melville, 2006).

Μετά από την πλύση του ιστού γινόταν αφαίρεση του διαλύματος πλύσης και ο ιστός κάθε δείγματος ψιλοκόβονταν σε μικρά τεμάχια με τη βοήθεια νυστεριού σε τριβλίο petri . Στη συνέχεια ο λειοτριβιμένος ιστός από κάθε δείγμα τοποθετούνταν σε νέο erpendorf. Τέλος τα erpendorfs τοποθετούνταν για 2-3 ώρες σε θερμοκρασία 37°C ώστε να εξατμιστούν πλήρως τα κατάλοιπα αιθανόλης.

2.2.2 Εξαγωγή-απομόνωση ολικού γενωμικού DNA

Για όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη η εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA έγινε με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου Holmes & Bonner (Holmes & Bonner, 1973) με κάποιες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα έγινε πέψη του ιστού κάθε δείγματος σε 500μl διαλύματος λύσης Holmes-Bonner και 10-20μl πρωτεϊνάσης K (20mg/ml). Στη συνέχεια έγινε κατακρήμνιση πρωτεϊνών με προσθήκη 200μl NaCl (6M υπερκορεσμένο) και φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 13.000rpm. Η αφαίρεση των κυτταρικών υπολειμμάτων έγινε με προσθήκη 500μl χλωροφορμίου και με φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13.000rpm (Το DNA πάρθηκε από την άνω φάση). Έπειτα έγινε προσθήκη 1ml ισοπροπανόλης (κατακρημνίζει το DNA) σε κάθε δείγμα και τοποθέτηση τους στους -80°C για 20 λεπτά. Η πελέτα του DNA που πάρθηκε μετά από νέα φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13.000rpm ξεπλύθηκε με 500μl παγωμένης αιθανόλης 70% σε κάθε περίπτωση. Το DNA κάθε δείγματος διαλύθηκε σε 50μl dd H₂O.

Στη συνέχεια για να ελεγχθεί το αποτέλεσμα της εξαγωγής και να προσδιοριστεί η ποιότητα και η ποσότητα του DNA, γινόταν ηλεκτροφόρηση 3μl από κάθε δείγμα σε πήκτωμα αγαρόζης (1)% που περιείχε 7% βρωμιούχο αιθιδίο. Ο έλεγχος της ποιότητας και της ποσότητας του DNA γινόταν στη συνέχεια με παρατήρηση σε υπεριώδες φως. Από τα περισσότερα δείγματα η εξαγόμενη ποσότητα του DNA ήταν μικρή ενώ σε κάποια δείγματα είχε τη μορφή smear που υποδηλώνει πως το DNA είχε υποστεί θραύση, γεγονός που συνδέονται με την κατάσταση διατήρησης των δειγμάτων. Αξίζει να αναφερθεί πως τα δείγματα στα οποία το DNA δεν ήταν ορατό, δεν θεωρήθηκαν άχρηστα. Αντιθέτως χρησιμοποιήθηκαν κανονικά στις περαιτέρω αναλύσεις, αφού όπως είναι γνωστό και από τη διεθνή βιβλιογραφία για την εξαγωγή DNA από δύσκολα δείγματα, το DNA δύναται να είναι παρόν σε απειροελάχιστες ποσότητες που αδυνατούν να εντοπιστούν στο πήκτωμα αγαρόζης, αλλά επαρκούν ώστε να πολλαπλασιαστούν με την εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική της PCR. Ο αναλυτικός κατάλογος των δειγμάτων από τα οποία έγινε εξαγωγή-απομόνωση ολικού γενωμικού DNA, ανεξάρτητα με το αν αυτά συμπεριλήφθηκαν στις αναλύσεις της παρούσας μελέτης φαίνεται στον πίνακα 2 του παραρτήματος.

2.2.3 Πολλαπλασιασμός των γονιδίων στόχων μέσω PCR

Στη συγκεκριμένη μελέτη τα γονίδια που επιλέχθηκαν για την διεξαγωγή των φυλογενετικών αναλύσεων ήταν δύο μιτοχονδριακά γονίδια: το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του κυτοχρώματος b η οποία συμμετέχει στην αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων-πρωτονίων, και το γονίδιο που κωδικοποιεί το 16s rRNA που συμμετέχει στη δομή της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας του μιτοχονδρίου.

Το γονίδιο του κυτοχρώματος β, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε φυλογενετικές αναλύσεις συγγενικών τάξεων αφού αποτελεί ένα από τα ταχύτερα εξελισσόμενα γονίδια (Avisé, 2000). Από την άλλη πλευρά το γονίδιο του 16s rRNA είναι πιο αργό γονίδιο που μπορεί να επιλύει βαθιές φυλογενέσεις, ενώ φέρει επίσης περιοχές που εξελίσσονται ταχύτατα κάτι που εξυπηρετεί ιδιαίτερα την διερεύνηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ πρόσφατα διαχωρισμένων ειδών (Desalle et al. ,1987).

Για τον πολλαπλασιασμό των συγκεκριμένων γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού (Polymerase Chain Reaction,

PCR), με δύο ζευγάρια εκκινητών για το κάθε γονίδιο. Πιο συγκεκριμένα και για τα δύο γονίδια χρησιμοποιήθηκε ένα ζευγάρι γενικευμένων εκκινητών (universal primers), και ένα ειδικό ζευγάρι εκκινητών για το γένος *Podarcis* (Πουλακάκης, 2005). Ο σχεδιασμός των ειδικών εκκινητών βασίστηκε σε αλληλουχίες που παράχθηκαν μέσω των γενικευμένων εκκινητών με σκοπό τον πολλαπλασιασμό ενός μικρότερου τμήματος DNA, με τη χρήση του αρχικού μεγαλύτερου τμήματος ως μήτρα. Η υβριδοποίηση των ειδικών εκκινητών γίνεται εσωτερικά της θέσης υβριδισμού των γενικευμένων εκκινητών (Poulakakis et al, 2002). Το αποτέλεσμα είναι ο πολλαπλασιασμός του μικρότερου τμήματος DNA, με τη χρήση ενός μεγαλύτερου τμήματος που έχει πολλαπλασιασθεί με τη χρήση γενικευμένων εκκινητών ως μήτρα (Poulakakis et al, 2002). Η τεχνική μέσω της οποίας γίνεται η παραπάνω διαδικασία είναι γνωστή ως nested PCR και χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες που περιλαμβάνουν την μεταχείριση αρχαίου DNA (aDNA) (Πουλακάκης, 2005).

Στη συγκεκριμένη μελέτη η παραπάνω τεχνική αποδείχθηκε ιδιαίτερα χρήσιμη, αφού όπως διαπιστώθηκε ο πολλαπλασιασμός μεγάλου τμήματος DNA από δύσκολα δείγματα ήταν πρακτικά αδύνατος. Στους πίνακες φαίνονται αναλυτικά οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων στόχων καθώς και οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR για το κάθε ζεύγος εκκινητών. Στον πίνακα 2.1 φαίνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών και το μέγεθος του προϊόντος που παράγουν, ενώ οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων δίνονται στον πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.1: το γονίδιο που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, τα ζεύγη και οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και η πηγή προέλευσης τους

Γονίδιο	Όνομα	Αλληλουχία Εκκινητή	Μέγεθος	Αναφορά
cytb	Glud-G	5'-TGA CTT GAA RAA CAA YCG TTG-3'	425bp	Palumbi 1996
	CB2	5'-CCC TCA GAA TGA TAT TTG TCC TCA-3'		
	Podcytb-L	5'-AAA ACA TCA CCC CAT SAT WA-3'	~350bp	Πουλακάκης, 2005
	Podcytb-R	5'-GGA CTC CAA TGT TTC ATG TT-3'		
16sRNA	16sBR-H	5'- CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'	530bp	Palumbi 1996
	16sAr-L	5'- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3'		
	Pod16s-L	5'-TGT CCC CTA AAT AGG GAC BRG -3'	~380bp	Πουλακάκης, 2005
	Pod16s-R	5'- GGT GTC CTG ATC CAA CAT CG-3'		

Πίνακας 2.2: οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR για κάθε ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη

Γονίδιο	Όνομα	Συνθήκες			Συγκέντρωση MgCl ₂
		Στάδιο	°C	Χρόνος	
cytb	Glud-G CB2	Αποδιάταξη	94	1min	1,5M
		Υβριδοποίηση	47	1min	
		Επιμήκυνση	72	1min	
	PodCytb-L PodCytb-H	Αποδιάταξη	94	1min	1,5M
		Υβριδοποίηση	51	1min	
		Επιμήκυνση	72	1min	
16sRNA	16sBR-H 16sAr-L	Αποδιάταξη	94	1min	3M
		Υβριδοποίηση	47	1min	
		Επιμήκυνση	72	1min	
	Pod16s-L Pod16s-R	Αποδιάταξη	94	1min	3M
		Υβριδοποίηση	55	1min	
		Επιμήκυνση	72	1min	

Ανεξάρτητα με τους εκκινητές και τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά το αποτέλεσμα της PCR ελεγχόταν με ηλεκτροφόρηση 1λ αντίδρασης από κάθε δείγμα σε πήκτωμα αγαρόζης 1% που περιείχε 7% βρωμιούχο αιθίδιο. Η ποσότητα του DNA στόχου προσδιορίστηκε κάθε φορά με παρατήρηση σε υπεριώδες φως. Πρέπει επίσης να αναφερθεί πως σε όλη τη διαδικασία πάρθηκαν τα απαραίτητα μέτρα για την αποφυγή μολύνσεων στα δείγματα (χρήση γαντιών, χρήση αποστειρωμένων strips κλπ).

2.2.4 Καθαρισμός προϊόντος της PCR

Προκειμένου το προϊόν της PCR να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας είναι απαραίτητο να απομακρυνθούν από αυτά τα υπολείμματα των εκκινητών, των νουκλεοτιδίων (dNTP's) και της πολυμεράσης. Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR έγινε με τη χρήση του kit καθαρισμού PCR, Nucleospin Extract II της εταιρείας MACHEREY-NAGEL, με τη μέθοδο της δέσμευσης και αποδέσμευσης του DNA από μεμβράνη πυριτίου, ακολουθώντας το πρωτόκολλο που προτείνεται από τους κατασκευαστές. Τέλος ακολούθησε νέα ηλεκτροφόρηση, πανομοιότυπη με αυτή που γίνεται μετά την αντίδραση PCR, με τη μόνη διαφορά πως σε αυτή χρησιμοποιούνταν και ένας μάρτυρας, ώστε να γίνεται μια ταυτοποίηση του μήκους αλλά και της ποσότητας του τελικού προϊόντος. Σε όσες

περιπτώσεις το προϊόν δεν ήταν καθαρό (εμφάνιση smear), πραγματοποιούνταν ηλεκτροφόρηση όλης της ποσότητας του DNA, κόψιμο της αντίστοιχης ζώνης από το πήκτωμα αγαρόζης και καθαρισμός του προϊόντος σύμφωνα με ένα ειδικό πρωτόκολλο που προτείνεται από τους κατασκευαστές του kit, για καθαρισμό από πήκτωμα αγαρόζης.

2.2.5 Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της PCR (sequencing)

Ο προσδιορισμός των αλληλουχιών έγινε σε αυτοματοποιημένη συσκευή προσδιορισμού νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (377 DNA SEQUENCER της ABI PRISM) με κατάλληλη επεξεργασία των προϊόντων της PCR. Συγκεκριμένα με μια διαδικασία γνωστή ως ‘cycle sequencing’ το προϊόν της PCR υπόκειται σε μια παραλλαγή της αντίδρασης PCR με τη χρήση εξειδικευμένης Taq πολυμεράσης (Big Dye Terminator v3.1), σημασμένων νουκλεοτιδίων και εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της PCR. Με τη διαδικασία αυτή συντίθεται νέα αλληλουχία από σημασμένα νουκλεοτίδια, που μπορεί να αναγνωρίσει η συσκευή αλληλούχισης, μετά την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Συνολικά προσδιορίστηκε η αλληλουχία του *cyt b* και του 16s rRNA από 12 άτομα *P. cretensis*. Επιπλέον προσδιορίστηκε η αλληλουχία μόνο για το *cyt b* από 6 άτομα του ίδιου είδους, λόγω του ότι από τα άτομα αυτά είτε δεν ήταν δυνατό να πολλαπλασιασθεί τμήμα του 16s RNA μέσω της PCR, είτε η αλληλουχία που προσδιορίστηκε δεν ήταν καλής ποιότητας.

2.3 Στοιχίση αλληλουχιών

Αφού έγινε προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος της PCR, ακολούθησε η στοιχίση των αλληλουχιών, για τον προσδιορισμό των ομόλογων θέσεων, αφού με βάση τις ομόλογες θέσεις γίνεται η σύγκριση μεταξύ των αλληλουχιών, για τον προσδιορισμό των διαφορών μεταξύ των ατόμων. Η στοιχίση των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος ClustalX 2.0 (Larkin et al, 2007) που αποτελεί αναβαθμισμένη έκδοση του ClustalX (Thompson et al., 1997)

2.4 Φυλογενετικές αναλύσεις

2.4.1 Επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου εξέλιξης

Για την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου εξέλιξης (νουκλεοτιδικής υποκατάστασης) εφαρμόστηκε η «δοκιμασία του λόγου των πιθανοφανειών» (Likelihood Ratio Test, LRT) και η αντίστοιχη του «κριτηρίου της ελάχιστης πληροφορίας» (Akaike Information Criterion, AIC) για κάθε ένα από τα δύο γονίδια χωριστά. Πιο συγκεκριμένα η επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου για κάθε γονίδιο έγινε με την εφαρμογή της δοκιμασίας LRT σε ένα σύνολο 56 διαφορετικών πιθανών μοντέλων. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των υπολογιστικών προγραμμάτων jmodeltest v.0.1.1 (Posada, 2008) και PAUP* v.4.0b10 (Swofford, 2002).

2.4.2 Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων

Η εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση έγινε με το μοντέλο των Tamura & Nei (1993) με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος MEGA v.5 (Tamura et al., 2011). Πιο συγκεκριμένα έγινε υπολογισμός των γενετικών αποστάσεων για κάθε γονίδιο ξεχωριστά καθώς και συνδυασμένη εκτίμηση με βάση και τα δύο γονίδια. Με τις ίδιες μεθόδους έγινε ξεχωριστή και συνδυασμένη εκτίμηση για τα δύο γονίδια των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των κύριων κλάδων που προέκυψαν από τη φυλογενετική ανάλυση.

2.4.3 Φυλογενετικές μέθοδοι

Το σύνολο των αλληλουχιών για όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη υποβλήθηκαν σε συνδυασμένη φυλογενετική ανάλυση και για τα δύο γονίδια (*cyt b* και 16s rRNA) με τη χρήση των παρακάτω μεθόδων φυλογενετικής ανάλυσης:

1. Σύνδεση γειτόνων (Neighbor Joining, NJ) (Saitou & Nei, 1987)
2. Μέγιστης Φειδωλότητας (Maximum Parsimony, NJ) (Swofford et al., 1996)
3. Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood, ML) (Felsenstein, 1981)
4. Μπευζιανή Συμπερασματολογία (Bayesian Inference, BI) (Rannala & Yang 1996, Mau & Newton, 1997; Yang & Rannala 1997, Mau et al., 1999)

Η φυλογενετική ανάλυση της σύνδεσης γειτόνων πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος MEGA με βάση το μοντέλο νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων των Tamura & Nei (1993).

Για την κατασκευή του δέντρου της ΜΦ χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PAUP*, ενώ η φυλογενετική ανάλυση της μεθόδου ML έγινε μέσω του online υπολογιστικού αλγορίθμου RAxML BlackBox (Stamatakis et al., 2008) το οποίο χρησιμοποιεί το μοντέλο GTR+G (General Time Reversible model με κατανομή Γ, Rodriguez et al., 1990) ως προεπιλογή.

Η BI πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) τρέχοντας 4 ανεξάρτητες αναλύσεις (runs) με 8 αλυσίδες (chains) για την κάθε μία, πραγματοποιώντας 10^7 επαναλήψεις (generations) και εφαρμόζοντας διαφορετικό μοντέλο για κάθε γονίδιο (partition). Τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν με το Tracer v.1.5 (Rambaut & Drummond, 2003)

Για τη στατιστική υποστήριξη των κλάδων που προέκυψαν από τη φυλογενετική ανάλυση με τη μέθοδο της σύνδεσης γειτόνων (NJ), καθώς και εκείνων που προέκυψαν μέσω της μέγιστης φειδωλότητας (MP) και μέγιστης πιθανοφάνειας (ML) χρησιμοποιήθηκε η στατιστική μέθοδος bootstrap (Felsenstein, 1985). Το πλήθος των ψευδοδειγμάτων bootstrap ήταν 1000 όλες τις μεθόδους, εκτός από την ΜΣ η οποία δεν απαιτεί την εφαρμογή της δοκιμασίας bootstrap (Πουλακάκης, 2005). Τα φυλογενετικά προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις φυλογενετικές αναλύσεις είναι τα εξής: MEGA5 (Tamura et al., 2011), PAUPv.4.b10 (Swofford, 2002) και MrBayes v.3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003).

2.5 Εκτίμηση χρόνων απόσχισης

Η χρονοφυλογενετική ανάλυση υπό το πλαίσιο της Μπευζιανής Συμπερασματολογίας πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος Beast v.1.7.2 (Drummond & Rambaut, 2007). Το σύνολο των δεδομένων χωρίστηκε στα επί μέρους γονίδια και η ανάλυση έτρεξε για $75 \cdot 10^6$ επαναλήψεις (generations) συλλέγοντας ένα δέντρο κάθε 1000 επαναλήψεις και αποβάλλοντας το 10% αυτών ως ασταθείς. Τα μοντέλα και οι εκ των προτέρων παράμετροι ήταν (αλλιώς ότι έχει εξ ορισμού το πρόγραμμα): cyt *b* - TrN+G; 16S rRNA - HKY+G; lognormal relaxed

clock; Yule process of speciation; random starting tree. Για όλες τις αναλύσεις που έγιναν στο BEAST, τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στο Tracer (Rambaut & Drummond, 2003) ώστε να εκτιμηθεί η σύγκλιση και τα effective sample sizes (ESSs) για όλες τις παραμέτρους. Το τελικό δέντρο (δέντρο με χρόνους απόσχισης και 95% επίπεδο εμπιστοσύνης) εκτιμήθηκε στο TreeAnnotator v.1.7.2 (Drummond & Rambaut, 2007). Το δέντρο οπτικοποιήθηκε με το FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

Για τη βαθμονόμηση του δέντρου χρησιμοποιήθηκε η απομόνωση της Κρήτης από την Πελοπόννησο στα 5 - 5.5 εκ. χρ. (Meulenkaamp 1985, Schüle, 1993).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μήκος αλληλουχιών και νουκλεοτιδική σύσταση

3.1.1 Κυτόχρωμα β

Το μήκος των αλληλουχιών για το γονίδιο του κυτοχρώματος β κυμαινόταν από 242-412 ζεύγη βάσεων (bp). Η μέση νουκλεοτιδική σύσταση των παραπάνω αλληλουχιών είναι θυμίνη (T) 31,7 %, κυτοσίνη (C) 27,1 %, αδενίνη (A) 28,0 % και γουανίνη (G) 13,2 %.

3.1.2 16s rRNA

Το μήκος των αλληλουχιών για το γονίδιο του 16s RNA κυμαινόταν από 320-499 ζεύγη βάσεων. Η μέση νουκλεοτιδική σύσταση των αλληλουχιών του 16s RNA είναι θυμίνη (T) 24,4 %, κυτοσίνη (C) 23,0 %, αδενίνη (A) 34% και γουανίνη (G) 18,7%.

3.2 Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων μεταξύ των αλληλουχιών

Η εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων για το γονίδιο του κυτοχρώματος β μεταξύ όλων των ατόμων του είδους *P. cretensis* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη φαίνεται αναλυτικά στον πίνακα 3 του παραρτήματος. Η μεγαλύτερη τιμή για το κυτόχρωμα β ισούται με 9,3% και παρατηρείται μεταξύ του απλοτύπου από την Αγ. Ειρήνη και ενός από τους δύο απλοτύπους από τη Σούγια (Sougia_35) που χρησιμοποιήθηκαν. Η μέση γενετική απόσταση μεταξύ όλων των ατόμων για το συγκεκριμένο γονίδιο υπολογίστηκε στην τιμή του 4,0%.

Όσον αφορά το γονίδιο του 16s rRNA οι γενετικές αποστάσεις όλων των ατόμων φαίνονται στον πίνακα 4 του παραρτήματος. Η μέγιστη απόσταση για το συγκεκριμένο γονίδιο υπολογίστηκε στην τιμή του 4,4%, μεταξύ του ίδιου απλοτύπου από τη Σούγια και εκείνου από το Κουφονήσι, ενώ η μέση γενετική απόσταση στην τιμή του 1,4%.

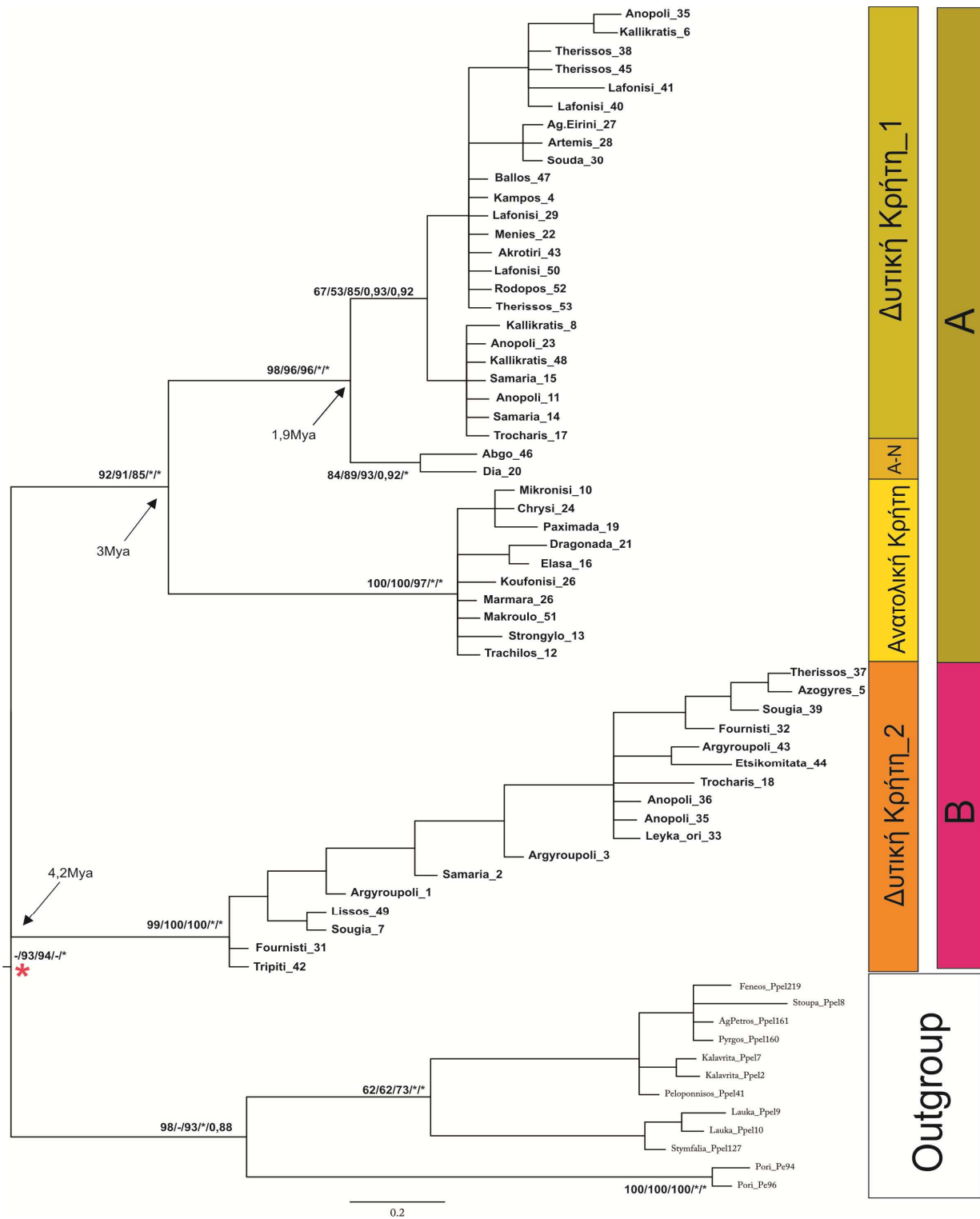
Τέλος η εκτίμηση των συνδυασμένων γενετικών αποστάσεων και για τα δύο γονίδια φαίνεται αναλυτικά στον πίνακα 5 του παραρτήματος. Η μέγιστη γενετική

απόσταση και για τα δύο γονίδια υπολογίστηκε στην τιμή του 8,7% ενώ η μέση τιμή στο 3,4%. Η τιμή του 8,7% αντιστοιχεί στη διαφορά μεταξύ του παραπάνω απλοτύπου από τη Σούγια (Sougia_35) και ενός απλοτύπου από τα Λευκά Όρη (Trocharis_17).

3.3 Φυλογένεση

Τα μοντέλα νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων που κρίθηκαν κατάλληλα μέσω του προγράμματος Modeltest ήταν τα TrN+G (Tamura & Nei, 1993) και HKY+G (Hasegawa et al., 1985), για τα γονίδια του *cyt b* και 16s rRNA αντίστοιχα.

Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις (NJ, MP, ML, BI) οδήγησαν σε δέντρα με παρόμοια τοπολογία. Τα αποτελέσματα της συνδυασμένης φυλογενετικής ανάλυσης των 53 ατόμων του είδους *P. cretensis* και για τα δύο γονίδια φαίνονται στο φυλογενετικό δέντρο της εικόνας 3.3.1. 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 10000 δέντρων, που είναι το διάστημα μέχρι να σταθεροποιηθεί η τιμή της πιθανότητας ($-lnL$). Συνολικά ευθυγραμμίστηκαν 911 ομόλογες νουκλεοτιδικές θέσεις (412 για το γονίδιο του *cyt b* και 499 για το γονίδιο του 16s rRNA) από τις οποίες οι 82 ήταν πολυμορφικές εντός της ενδοομάδας. Συγκεκριμένα 54 από τις 412 νουκλεοτιδικές θέσεις του *cyt b* που ήταν πολυμορφικές, ενώ από τις 499 του γονιδίου του 16s rRNA, μόλις οι 18 ήταν πολυμορφικές εντός της ενδοομάδας. Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο με βάση τη διαφορά στο ρυθμό εξέλιξης των δύο γονιδίων.



Εικόνα 3.3.1: Φυλογενετικό δέντρο BI της συνδυασμένης ανάλυσης των γονιδίων (*cyt b* και 16S rRNA) για τα 53 άτομα του είδους *Podarcis cretensis*. Οι αριθμοί στους κύριους κλάδους αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (1000 αντίγραφα) για τις μεθόδους NJ, MP, ML και στις εκ των υστέρων πιθανότητες για την BI με το MrBayes και το Beast (NJ/MP/ML/BI/BI). Οι παύλες αντιστοιχούν σε τιμές μικρότερες του 50%. Τα * αντιστοιχούν σε εκ των υστέρων πιθανότητες μεγαλύτερες του 0,95. Με τα βέλη σημειώνονται οι εκτιμήσεις των χρόνων απόσχισης μέσω του Beast (σε εκ. χρόνια, Mya). Το * αντιπροσωπεύει το σημείο στο οποίο έγινε η βαθμονόμηση του δέντρου στα 5,3 εκ. χρόνια πριν.

3.4 Περιγραφή της τοπολογίας των δέντρων

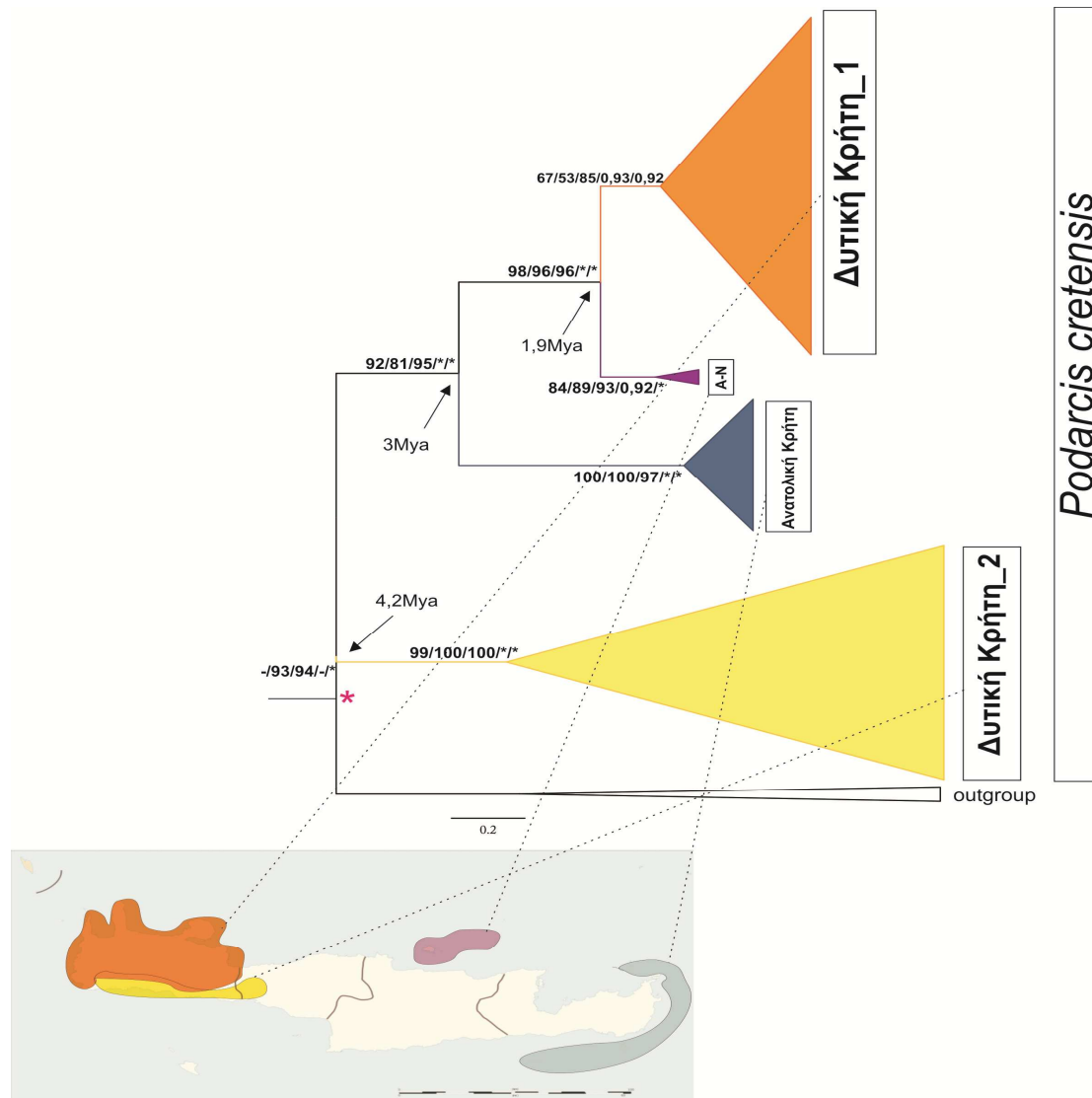
Τα αποτελέσματα της συνδυασμένης φυλογενετικής ανάλυσης έδειξαν ότι οι απλότυποι των ατόμων του είδους *P. cretensis* σχηματίζουν δύο κύριους κλάδους, τους κλάδους και Α και Β (εικόνα 3.3.1). Εντός του κλάδου Α δημιουργούνται τρεις υποκλάδοι, η τοπολογία των οποίων δεν διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων φυλογενετικής ανάλυσης. Συνολικά οι κύριοι κλάδοι και υποκλάδοι που προκύπτουν από την φυλογενετική ανάλυση των απλοτύπων 53 ατόμων του είδους *P. cretensis* είναι οι εξής:

1. Ο κλάδος Α (όλη η Κρήτη) που περιλαμβάνει απλοτύπους από τη δυτική Κρήτη, τις νησίδες Δία και Αυγό και τις νησίδες της Ανατολικής Κρήτης.
2. Ο κλάδος Β (Δυτική Κρήτη 2) που περιλαμβάνει απλοτύπους από τη δυτική Κρήτη.
3. Ο υποκλάδος Δυτική Κρήτη 1 (κλάδος Α) που περιλαμβάνει απλοτύπους από τη Δυτική Κρήτη.
4. Ο υποκλάδος Α-Ν (κλάδος Α) που περιλαμβάνει τους απλοτύπους από τις νησίδες Δία και Αυγό.
5. Ο υποκλάδος Ανατολική Κρήτη (κλάδος Α) που περιλαμβάνει απλοτύπους από τις νησίδες της Ανατολικής Κρήτης.

Το σημείο ασυμφωνίας μεταξύ των διαφορετικών αναλύσεων είναι στην σχετική τοπολογία των απλοτύπων μέσα στους παραπάνω κλάδους. Πιο συγκεκριμένα εντός του κλάδου Β (Δυτική Κρήτη 2) δημιουργούνται πολλοί υποκλάδοι οι οποίοι δεν έχουν ισχυρή στατιστική υποστήριξη και η τοπολογία των οποίων διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών αναλύσεων. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται εντός του υποκλάδου Ανατολική Κρήτη όπου οι απλότυποι σχηματίζουν ομάδες που διαφέρουν μεταξύ των αναλύσεων. Επιπλέον εντός του υποκλάδου Δυτική Κρήτη 1 δημιουργούνται δύο υποκλάδοι σε όλες τις φυλογενετικές αναλύσεις οι οποίοι όμως έχουν μικρή στατιστική υποστήριξη και οι σχετικές θέσεις των απλοτύπων μεταξύ των δύο αυτών υποκλάδων διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων.

3.5 Εκτίμηση των χρόνων απόσχισης

Ως χρονικό συμβάν για τη βαθμονόμηση του δέντρου BI που προέκυψε μέσω του προγράμματος Beast (Likelihood= -2235,925) χρησιμοποιήθηκε το καλά γνωστό γεγονός απομόνωσης της Πελοποννήσου από την Κρήτη που χρονολογείται στα 5-5,5 εκ. χρόνια πριν. (Meulenkamp et al., 1985).



Εικόνα 3.5.1: Απλοποιημένο φυλογενετικό δέντρο BI για τους κύριους κλάδους που προέκυψαν από τις φυλογενετικές αναλύσεις και η γεωγραφική κατανομή του κάθε κλάδου. Οι αριθμοί στους κύριους κλάδους αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap (1000 αντίγραφα) για τις μεθόδους NJ, MP, ML και στις εκ των υστέρων πιθανότητες για την BI με το MrBayes και το BEAST (NJ/MP/ML/BI/BI). Οι παύλες αντιστοιχούν σε τιμές μικρότερες του 50%. Τα * αντιστοιχούν σε εκ των υστέρων πιθανότητες μεγαλύτερες του 0,95. Με τα βέλη σημειώνονται οι εκτιμήσεις των χρόνων απόσχισης μέσω του BEAST (σε εκ. χρόνια, Mya). Το * αντιπροσωπεύει το σημείο στο οποίο έγινε η βαθμονόμηση του δέντρου στα 5,3 εκ.χρόνια πριν.

Στην εικόνα 3.5.1 φαίνεται το απλοποιημένο φυλογενετικό δέντρο για του κύριους κλάδους που προέκυψαν από τη φυλογενετική ανάλυση καθώς και η γεωγραφική κατανομή των απλοτύπων κάθε κλάδου. Όπως φαίνεται στα φυλογενετικά δέντρα των εικόνων 3.3.1 και 3.5.1 η απόσχιση του κλάδου Δυτική Κρήτη 2 από τους υπόλοιπους απλοτύπους της Κρήτης χρονολογείται περίπου στα 4,2 εκ. χρόνια πριν. Η απομόνωση των απλοτύπων του κλάδου Ανατολική Κρήτη από τον κλάδο Δυτική Κρήτη 1 και από εκείνον της Δίας με το Αυγό υπολογίστηκε περίπου στα 3 εκ. χρόνια πριν. Τέλος η απόσχιση των απλοτύπων Δυτική Κρήτη 1 από εκείνους από το Αυγό και την Δία υπολογίστηκε στα 1,9 εκ. χρόνια πριν.

3.6 Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων μεταξύ των κλάδων

3.6.1 Cyt *b*

Η εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων για το *cyt b* μεταξύ των κύριων κλάδων που προέκυψαν από τη φυλογενετική ανάλυση φαίνεται στον πίνακα 3.6.1. Η μεγαλύτερη απόσταση ισούται με 6,4% και παρατηρείται μεταξύ του κλάδου Δυτική Κρήτη 2 και κάθε ενός από τους άλλους κλάδους. Η μικρότερη απόσταση ισούται με 1,8% και παρατηρείται μεταξύ των κλάδων Δυτική Κρήτη 1 και Αυγό-Δία.

Πίνακας 3.6.1: Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων (%) μεταξύ των κλάδων για το γονίδιο του *cyt b* με τη χρήση του μοντέλου των Tamura & Nei (1993)

<i>Κλάδοι - υποκλάδοι</i>	1	2	3
<i>Δυτική Κρήτη 2</i>	---		
<i>Δυτική Κρήτη 1</i>	6,4	---	
<i>Αυγό-Δία (A-N)</i>	6,4	1,8	---
<i>Ανατολική Κρήτη</i>	6,4	4,7	4,7

3.6.2 16s rRNA

Η εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων για το 16s RNA μεταξύ των κύριων κλάδων που προέκυψαν από τη φυλογενετική ανάλυση φαίνεται στον πίνακα 3.6.2. Η μεγαλύτερη απόσταση ισούται με 2,8% και παρατηρείται μεταξύ του κλάδου Δυτική Κρήτη 2 και του κλάδου Ανατολική Κρήτη. Η μικρότερη απόσταση ισούται με 0,5% και παρατηρείται μεταξύ των κλάδων Δυτική Κρήτη 1 και Δυτική Κρήτη 2.

Πίνακας 3.6.2: Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων (%) μεταξύ των κλάδων για το γονίδιο του 16s rRNA με τη χρήση του μοντέλου των Tamura & Nei (1993)

<i>Κλάδοι - υποκλάδοι</i>	1	2	3
<i>Δυτική Κρήτη 2</i>	---		
<i>Δυτική Κρήτη 1</i>	2,3	---	
<i>Αυγό-Δία (A-N)</i>	2,2	0,5	---
<i>Ανατολική Κρήτη</i>	2,8	1,5	1,4

3.6.3 Συνδυασμένη εκτίμηση γενετικών αποστάσεων μεταξύ των κλάδων

Οι αντίστοιχες γενετικές αποστάσεις και για τα δύο γονίδια μεταξύ των κύριων κλάδων δίνονται στον πίνακα 3.6.3. Η μεγαλύτερη απόσταση ισούται με 5,7 % και παρατηρείται μεταξύ του κλάδου Δυτική Κρήτη 2 και του κλάδου Ανατολική Κρήτη. Η μικρότερη απόσταση ισούται με 1,2 % και παρατηρείται μεταξύ των κλάδων Δυτική Κρήτη 1 και Αυγό-Ντία.

Πίνακας 3.6.3: Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων (%) μεταξύ των κλάδων και για τα δύο γονίδια με τη χρήση του μοντέλου των Tamura & Nei (1993)

<i>Κλάδοι - υποκλάδοι</i>	1	2	3
<i>Δυτική Κρήτη 2</i>	---		
<i>Δυτική Κρήτη 1</i>	5,4	---	
<i>Αυγό-Δία (A-N)</i>	4,9	1,2	---
<i>Ανατολική Κρήτη</i>	5,7	3,9	3,6

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Φυλογένεση

4.1.1 Ενδοειδική ποικιλομορφία και διαφοροποίηση μεταξύ των κλάδων

Τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης έδειξαν ότι οι απλότυποι των ατόμων του είδους *P. cretensis* από όλο το εύρος της κατανομής του τάξου σχηματίζουν δύο διακριτές γενεαλογικές γραμμές (κλάδος A και B) που απέχουν μεταξύ τους 5,4%. Η διαφοροποίηση αυτή είναι σχετικά υψηλή όπως και οι υπόλοιπες εκτιμήσεις για τη διαφοροποίηση μεταξύ των υποκλάδων εντός του κλάδου A, καθώς και η μέση διαφοροποίηση μεταξύ όλων των απλοτύπων (3,4%, μέγιστο 8,7%). Η παραπάνω πρόταση γίνεται ακόμα πιο εμφανής αν σκεφτεί κανείς πως η γενετική απόσταση μεταξύ των ειδών *P. cretensis* και *P. peloponnesiaca* (που αποτελεί το πιο συγγενικό του είδος) είναι 7,97 % και για τα δύο γονίδια (Lymberakis et al., 2008). Ωστόσο η εκτίμηση αυτή δεν μπορεί να είναι απολύτως ακριβής καθώς για 18 από τα 53 άτομα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη η εκτίμηση έγινε μόνο με βάση την αλληλουχία του γονιδίου του κυτοχρώματος β, το οποίο έχει γρηγορότερο ρυθμό εξέλιξης.

Παρόλα αυτά η υψηλή ενδοειδική γενετική ποικιλότητα και διαφοροποίηση μεταξύ των κλάδων για κάποια από τα είδη του γένους *Podarcis* έχει καταγραφεί και στο παρελθόν. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί πως τα είδη *P. melisselensis*, *P. sicula*, *P. tiliguerta* και *P. taurica* χαρακτηρίζονται από υψηλή γενετική ποικιλότητα στο επίπεδο του μιτοχονδριακού DNA και την παρουσία πολυάριθμων διακριτών γενετικά ομάδων εντός του είδους (Podnar et al., 2004; Podnar et al., 2005; Harris et al., 2005; Roulakakis et al., 2005β). Παρόλα αυτά κάθε περίπτωση υψηλής ενδοειδικής διαφοροποίησης εξαρτάται σαφέστατα από το χρησιμοποιούμενο γενετικό δείκτη και πρέπει να εξετάζεται σε συνδυασμό με τις εκάστοτε τοπικές και χρονικές συνθήκες που οδήγησαν στην διαφοροποίηση ή και τον διαχωρισμό των διαφόρων ομάδων απλοτύπων. Άλλωστε τα μέλη της οικογένειας Lacertidae παρουσιάζουν συχνά το φαινόμενο της γρήγορης διαφοροποίησης (Oliverio et al., 2000).

4.1.2 Κλάδος A: Δυτική Κρήτη 1 – AN - Ανατολική Κρήτη

Ο κλάδος A περιλαμβάνει τους απλότυπους 24 ατόμων από τη δυτική Κρήτη καθώς και τους απλότυπους από τη Δία, το Αυγό και όλους τους απλότυπους των νήσων της ανατολικής Κρήτης. Οι υψηλές εκ των υστέρων πιθανότητες για τις αναλύσεις BI (μεγαλύτερες του 0,95) καθώς και η σχετικά υψηλή τιμή bootstrap για τη μέθοδο ML (85%) μας οδηγούν στην υπόθεση πως οι 36 απλότυποι των ατόμων εντός του κλάδου A μοιράζονται έναν κοινό πρόγονο, ο οποίος τοποθετείται χρονικά μετά από την διάσπαση της δεξαμενής των προγονικών απλότυπων του είδους, από την οποία προέκυψαν οι δύο κύριες γενεαλογικές γραμμές (κλάδος A και κλάδος B).

Οι απλότυποι της δυτικής Κρήτης εντός του πρώτου κλάδου σχηματίζουν ένα υποκλάδο (Δυτική Κρήτη 1) που τοποθετείται στο δέντρο μαζί με τους απλότυπους από τη Δία και το Αυγό (υποκλάδος A-N). Με άλλα λόγια οι απλότυποι του κλάδου Δυτική Κρήτη 1 είναι περισσότερο κοντινοί γενετικά με τους πληθυσμούς από το Αυγό και την Δία (1,2%) παρά με τους απλότυπους των νήσων της Ανατολικής Κρήτης (3,9%) ή με τους υπόλοιπους απλότυπους από τη Δυτική Κρήτη (5,4%) με ισχυρή μάλιστα στατιστική υποστήριξη (NJ/MP/ML/BI/BI: 98/96/96/1.00/1.00) .

Οι απλότυποι από τη Δία και το Αυγό είναι σχεδόν πανομοιότυποι και σχηματίζουν μια μονοφυλετική ομάδα (84/89/93/0.92/1.00). Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν πως οι πληθυσμοί από τα δύο αυτά νησιά μοιράζονται έναν κοινό προγονικό απλότυπο, ο οποίος μάλιστα απέχει αρκετά από τον προγονικό απλότυπο των νήσων της ανατολικής Κρήτης (3,6%). Επομένως μπορούμε να πούμε με αρκετά μεγάλη σιγουριά πως οι πληθυσμοί *P. cretensis* από τα δορυφορικά νησιά της Κρήτης δεν έχουν κοινή προέλευση.

Εντός του κλάδου A τοποθετούνται επίσης όλοι οι απλότυποι (10) των ατόμων από τα νησιά της Ανατολικής Κρήτης (υποκλάδος Ανατολική Κρήτη). Οι απλότυποι της Ανατολικής Κρήτης σχηματίζουν μια μονοφυλετική ομάδα με ισχυρή στατιστική υποστήριξη (100/100/97/1.00/1.00), ενισχύοντας την υπόθεση πως όλοι οι πληθυσμοί των νήσων της ανατολικής Κρήτης προέρχονται από ένα κοινό προγονικό απλότυπο, πιθανόν από την περιοχή της ανατολικής Κρήτης.

4.1.3 Κλάδος B: Δυτική Κρήτη 2

Ο κλάδος B (Δυτική Κρήτη 2) που περιλαμβάνει 17 απλότυπους από την Δυτική Κρήτη έχει ισχυρή στατιστική υποστήριξη για όλες τις φυλογενετικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν (99/100/100/1.00/1.00) γεγονός που υποδεικνύει πως όλοι οι απλότυποι εντός του κλάδου προέρχονται από ένα κοινό προγονικό απλότυπο από την περιοχή της Δυτικής Κρήτης.

4.2 Φυλογεωγραφία

4.2.1 Διερεύνηση της γεωγραφικής κατανομής των γενεαλογικών γραμμών

Οι απλότυποι του υποκλάδου Δυτική Κρήτη_1 φαίνεται να καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος της Δυτικής Κρήτης εκτός από ένα μικρό κομμάτι στο νοτιοδυτικό τμήμα του νησιού.

Από την άλλη πλευρά ο υποκλάδος A-N τοποθετείται γεωγραφικά βόρεια της Κεντρικής Κρήτης στις νήσους Αυγό και Δία, ενώ ο υποκλάδος Ανατολική Κρήτη περιλαμβάνει ένα σύνολο νησιών τα οποία κατανέμονται σχεδόν συμμετρικά γύρω από τις ανατολικές ακτές του κυρίως νησιού. Τέλος ο κλάδος Δυτική Κρήτη_2 κατανέμεται γεωγραφικά στο νοτιοδυτικό τμήμα του κυρίως νησιού της Κρήτης

Το πρώτο ενδιαφέρον στοιχείο που προκύπτει από τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης είναι ότι σε αντίθεση με ότι θα περίμενε κανείς οι απλότυποι της δυτικής Κρήτης φαίνονται να τοποθετούνται σε δύο διακριτές γενεαλογικές γραμμές που απέχουν αρκετά μεταξύ τους (5,4%), υποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο ένα φράγμα στη γονιδιακή ροή μεταξύ των δύο ομάδων πληθυσμών. Το παραπάνω φαινόμενο υποδηλώνει πως ο κοινός πρόγονος των πληθυσμών του είδους *P. cretensis* στη δυτική Κρήτη έδωσε γένεση σε πληθυσμούς που απέχουν πολύ γεωγραφικά από τη δυτική Κρήτη. Οι Avise et al. (1987) και Avise (1994) πρότειναν αρκετές υποθέσεις για τα δέντρα του μιτοχονδριακού DNA μία από τις οποίες ήταν ότι οι ενδοειδικές μονοφυλετικές ομάδες που χωρίζονται με μεγάλα γενεαλογικά κενά συνήθως προκύπτουν από παλαιά βιογεωγραφικά φράγματα στη γονιδιακή ροή.

Το δεύτερο ενδιαφέρον στοιχείο προκύπτει από την παρατήρηση της θέσης των απλοτύπων από τη δυτική Κρήτη πάνω στο χάρτη (Εικ.2 παράρτημα). Συγκεκριμένα παρατηρείται το φαινόμενο της παρουσίας διαφορετικών απλοτύπων της δυτικής Κρήτης από την ίδια τοποθεσία η πολύ κοντινές τοποθεσίες σε διαφορετικούς κλάδους. Για παράδειγμα 3 απλότυποι από την Σαμαριά διαφέρουν ως προς την σχετική τους τοποθέτησή στους κλάδους του δέντρου (1 απλότυπος τοποθετείται στον κλάδο Δυτική Κρήτη_2 και 2 απλότυποι στον υποκλάδο Δυτική Κρήτη_1 εντός του κλάδου A). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται για 4 απλοτύπους από τον Θέρισσο και 2 απλοτύπους από την Τρόχαρη που μοιράζονται μεταξύ των δύο κύριων κλάδων του δέντρου. Με άλλα λόγια κάποιοι από τους απλοτύπους που ανήκουν σε διαφορετικούς κλάδους είναι σχεδόν συμπάτριοι ενώ απέχουν περισσότερο από 5% στο επίπεδο του μιτοχονδριακού DNA. Με μια προσεκτική άλλωστε παρατήρηση της γεωγραφικής προέλευσης των απλοτύπων των δύο αυτών κλάδων φαίνεται πως υπάρχει ένα σημείο στο οποίο οι κατανομές των κλάδων αλληλεπικαλύπτονται, στην περιοχή της νοτιοδυτικής Κρήτης.

Η τοποθέτηση των απλοτύπων από το Αυγό και τη Δία ως μια αδερφή ομάδα των απλοτύπων της Δυτικής Κρήτης 1 είναι ένα θέμα που χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση δεδομένου του ότι δεν υπάρχουν στοιχεία για πρόσφατη επικοινωνία των νήσων αυτών με το κυρίως νησί της Κρήτης.

Το τρίτο στοιχείο είναι η μονοφυλετικότητα των απλοτύπων από τα νησιά της ανατολικής Κρήτης, τα οποία διαφέρουν ως προς την παλαιογραφική τους ιστορία, και η τοποθέτηση αυτών των απλοτύπων εντός του ίδιου κλάδου με άτομα από πληθυσμούς που απέχουν πολύ γεωγραφικά. Κατά μία έννοια η παρουσία του είδους στα ανατολικά νησιά, η διαφορετική παλαιογεωγραφία των νησιών αυτών (τα οποία δεν συνδέονταν ποτέ όλα μεταξύ τους) και η απουσία του από την ανατολική πλευρά του νησιού σε συνδυασμό πάντα με την μεγάλη γενετική τους απόσταση από τα άτομα του γένους *Podarcis* από τις Κυκλάδες και τη Πελοπόννησο (Πουλακάκης, 2005) υποδηλώνουν πως η παρούσα κατανομή του τάξου είναι υπολειματική μιας άλλοτε ευρύτερης κατανομής. Στην περίπτωση αυτή μπορούμε να υποθέσουμε ότι το είδος ήταν κάποτε παρόν σε όλη την έκταση του κυρίως νησιού και πως ο προγονικός απλότυπος των σημερινών απλοτύπων των ανατολικών νησιών προέρχεται από τη ανατολική Κρήτη.

Στην παρούσα μελέτη προκύπτουν τρία στοιχεία που είναι καινούρια σε σχέση με προηγούμενες μελέτες πάνω στη φυλογεωγραφία του γένους *Podarcis* στην

περιοχή της Κρήτης (βλ. Πουλακάκης, 2005). Πρώτον η γεωγραφική κατανομή του κλάδου B φαίνεται να είναι πιο ευρεία τουλάχιστον προς τα δυτικά του όρια (μέχρι την περιοχή των Αζογύρων δίπλα στο Ελαφονήσι), δεύτερον υπάρχουν όπως προαναφέρθηκε περισσότερες από 1 περιοχές (Θέρισσος, Τρόχαρις, Σαμαριά) των οποίων οι απλότυποι τοποθετούνται σε διαφορετικούς κλάδους και τρίτον είναι σαφές πλέον ότι δεν υπάρχει κάποιο εμφανές γεωγραφικό φράγμα μεταξύ των δύο ομάδων πληθυσμών της δυτικής Κρήτης.

4.2.2 Υποθετικά σενάρια εποίκισης της Κρήτης και των δορυφορικών νησιών της

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η οριστική απομόνωση Κρήτης-Πελοποννήσου χρονολογείται στα 5-5,5 εκ χρόνια πριν (Meulenkamp, 1985). Το χρονικό αυτό συμβάν αντιστοιχεί και στην πλήρη απομόνωση των προγονικών απλοτύπων *Podarcis* από την περιοχή της Κρήτης. Αυτό διότι το φράγμα της γονιδιακής ροής μεταξύ Κυκλάδων και Κρήτης τοποθετείται ακόμα πιο πριν από το παραπάνω συμβάν (8,7-8,2 εκ χρόνια πριν) όπως προκύπτει από σύγκριση των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των διαφόρων ομάδων πληθυσμών *Podarcis* από Κρήτη, Πελοπόννησο και Κυκλάδες (Πουλακάκης, 2005). Με βάση τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό πως η αρχική εποίκιση του νησιού έγινε στην δυτική του πλευρά από πληθυσμούς της Πελοποννήσου πριν από την πλήρη απομόνωση των 2 αυτών περιοχών.

Στη συνέχεια οι απομονωμένοι πληθυσμοί της Κρήτης εποίκισαν όλη τη δυτική πλευρά του νησιού και πιθανώς την ανατολική πλευρά. Η εκτίμηση των χρόνων απόσχισης που πραγματοποιήθηκε με βάση την απομόνωση Κρήτης-Πελοποννήσου μας δείχνει ότι το πρώτο φράγμα στη γονιδιακή ροή που οδήγησε στην δημιουργία δύο διακριτών κλάδων χρονολογείται περίπου στα 4,2 εκ χρόνια πριν. Αυτό σημαίνει πως αρχικά υπήρχε μια κοινή δεξαμενή απλοτύπων στην Δυτική Κρήτη, η οποία στη συνέχεια κατακερματίστηκε σε δύο ομάδες κάθε μία από τις οποίες έδωσε γένεση στους απλοτύπους των κλάδων A και B. Ωστόσο πέρα από το γεγονός του κατακερματισμού του νησιού σε μικρότερα νησιά λόγω της ανόδου της στάθμης της θάλασσας στο κατώτερο και μέσο Πλειόκαινο δεν είναι γνωστό κάποιο άλλο ιστορικό γεγονός που να εξηγεί τη δημιουργία ενός τέτοιου φράγματος. Είναι αλήθεια πως το ύψος και η έκταση του νησιού αυξήθηκε μέσα στο Πλειόκαινο ωστόσο τα γεγονότα αυτά τοποθετούνται αργότερα χρονικά στο τέλος του Πλειοκαίνου και τις αρχές του

Πλειστοκαίνου (2-1,5 εκ χρόνια πριν). Επομένως το σενάριο είναι το εξής: οι προγονικοί απλότυποι *Podarcis* της Πελοποννήσου εποίκησαν μια ενιαία χερσαία μάζα της δυτικής Κρήτης η οποία έσπασε στη συνέχεια σε δύο νησιά. Το γεγονός όμως ότι οι γενετικές αποστάσεις του κλάδου Β από εκείνους του υποκλάδου Δυτική Κρήτη_1 και Ανατολική Κρήτη είναι περίπου ίσες (5,4% και 5,7% αντίστοιχα) ενισχύουν την υπόθεση πως η εποίκηση της ανατολικής Κρήτης έγινε πριν τη δημιουργία αυτού του φράγματος.

Το δεύτερο φράγμα στη γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών του είδους *P. cretensis* φαίνεται να είναι στα 3 εκ. χρόνια πριν μεταξύ των πληθυσμών του κλάδου Δυτική Κρήτη_1-Αυγό-Δία και εκείνου της Ανατολικής Κρήτης. Ο διαχωρισμός των απλοτύπων της Δυτικής Κρήτης από εκείνους της ανατολικής μπορεί να αποδοθεί και πάλι σε γεγονότα απομόνωσης των δύο περιοχών μέσω θαλάσσιων φραγμάτων, καθώς οι γνώσεις μας πάνω στην παλαιογεωγραφική εικόνα της Κρήτης κατά τη διάρκεια αυτών των εποχών είναι περιορισμένες. Όσον αφορά τα νησιά της ανατολικής Κρήτης οι διαδικασίες εποίκισής τους είναι πιθανό να διαφέρουν λόγω της σχετικής τους ιστορίας. Για παράδειγμα οι πληθυσμοί από τη Χρυσή, το Μικρονήσι και την ομάδα του Κουφονησιού ίσως αποτελούν παραδείγματα πρόσφατου εποικισμού με παθητική διασπορά. Άλλωστε η ομάδα του Κουφονησιού δεν ήταν ποτέ συνδεδεμένη με την Κρήτη (Parmakelis et al., 2003) ενώ η Χρυσή χωρίζεται από την ανατολική Κρήτη με μεγάλα βάθη (Κασαπίδης, 1996). Ωστόσο οι πληθυσμοί των νησιών στην Βορειοανατολική πλευρά της Κρήτης θα μπορούσαν να έχουν προκύψει μέσω πρόσφατων βικαριανιστικών γεγονότων (αφού η δημιουργία συνδέσεων με την Κρήτη από το Πλειόκαινο και μετά είναι πιθανή) ή και γεγονότων διασποράς. Επομένως θα λέγαμε πως η εποίκηση των νήσων της ανατολικής Κρήτης μπορεί να αποδοθεί σε συνδυασμό ανεξάρτητων βικαριανιστικών γεγονότων και γεγονότων διασποράς, από την περιοχή της ανατολικής Κρήτης.

Τέλος η πιο πρόσφατη απομόνωση μεταξύ ομάδων πληθυσμών χρονολογείται στα 1,9 εκ χρόνια μεταξύ Δυτικής Κρήτης_1 και Δίας με Αυγό. Λόγω του ότι δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για την επικοινωνία μεταξύ της Κρήτης και των νησιών αυτών τουλάχιστον από το Πλειόκαινο και μετά, και του γεγονότος ότι χωρίζονται από την Κρήτη με μεγάλα βάθη (Κασαπίδης, 1996) μπορούμε να υποθέσουμε ότι η εποίκισή τους έγινε από κάποιο πληθυσμό της δυτικής Κρήτης μέσω παθητικής διασποράς. Ωστόσο δεν μπορεί να αποκλειστεί η δημιουργία κάποιας χερσαίας γέφυρας πριν του παραπάνω υπολογιζόμενου χρόνου διαχωρισμού, καθώς τα είδη του

γένους δεν διαθέτουν σημαντικές ικανότητες να ξεπερνούν θαλάσσια φράγματα (Πουλακάκης, 2005). Μια σαφέστερη εικόνα για την παλαιογεωγραφία της περιοχής μπορεί να ρίξει φως στην εγκυρότητα των παραπάνω υποθέσεων. Παλαιότερες μελέτες πάνω στο είδος *Cyrtodactylus kotschy* (Sauria: Gekkonidae) έδειξαν ότι η εποίκισή του στην Χρυσή και το Αυγό έγιναν επίσης μέσω γεγονότων διασποράς από το κεντρικό νησί της Κρήτης (Κασαπίδης, 1996).

Ένα σημαντικό ερώτημα που προκύπτει είναι πως οι αρχικά απομονωμένοι πληθυσμοί της δυτικής Κρήτης κατέληξαν να είναι σχεδόν συμπατριοί. Το φράγμα που φαίνεται να χώριζε αυτές τις δύο ομάδες απλοτύπων δεν φαίνεται να υπάρχει πλέον και το πιο πιθανό σενάριο είναι πως οι πληθυσμοί της δυτικής Κρήτης βρήκαν την ευκαιρία να διευρύνουν την κατανομή τους. Αυτό που δεν είναι δυνατό να ελεγχθεί τουλάχιστον μέσω της παρούσας εργασίας είναι το ποια ακριβώς ήταν η επίδραση των φαινομένων ορογένεσης (στις αρχές του Πλειστοκαίνου) στις μετακινήσεις των υπό μελέτη ζώων στη δυτική Κρήτη.

4.3 Προοπτικές για μελλοντικές μελέτες

Με βάση τα δεδομένα που έχουμε σήμερα, η κατανόησή μας για την παρούσα γενετική δομή των πληθυσμών και των ειδών προέρχεται κυρίως από τα ευρήματα της Φυλογεωγραφίας (Avise, 2000). Παρόλα ταύτα η πλειονότητα των Φυλογεωγραφικών μελετών έχει βασιστεί κυρίως σε δεδομένα του μη ανασυνδυαζόμενου mtDNA, γεγονός που εμπεριέχει περιορισμούς οι οποίοι πλέον είναι ευρέως αποδεκτοί (Godinho et al., 2008). Το μιτοχονδριακό DNA εξελίσσεται ως ένας γενετικός τύπος, μονογονεϊκά κληρονομούμενος και ως εκ τούτου η μελέτες που βασίζονται σε αυτό μπορεί να μας αποκαλύπτουν ένα μικρό μόνο τμήμα της εξελικτικής ιστορίας των πληθυσμών (Zhang & Hewitt 2003). Για παράδειγμα στην παρούσα μελέτη οι πληθυσμοί *P. cretensis* της Κρήτης εμφανίζονται διακριτοί στο επίπεδο του μιτοχονδριακού DNA, ωστόσο η εξέταση ενός δείκτη που κληρονομείται διγονεϊκά και εξελίσσεται ταχύτερα (ταχύτερα από το mtDNA) μπορεί να μας δώσει μια διαφορετική εικόνα για την πρόσφατη ιστορία των υπό μελέτη πληθυσμών, κάτι το οποίο αδυνατεί να κάνει το μιτοχονδριακό DNA. Ένα παράδειγμα τέτοιων δεικτών είναι οι μικροδορυφορικές πυρηνικές αλληλουχίες. Μάλιστα η χρήση των μικροδορυφορικών αλληλουχιών σε συνδυασμό με τα ευρήματα άλλων πυρηνικών και μιτοχονδριακών τύπων έχει αποδειχτεί ιδιαίτερα χρήσιμη στην μελέτη

πρόσφατων εξελικτικών γεγονότων εντός του είδους (Godinho et al., 2008; Pinho et al., 2011). Η φυλογένεση που προέκυψε μέσω της μελέτης του μιτοχονδριακού DNA αποκάλυψε ένα παλιό φράγμα στη γονιδιακή ροή μεταξύ των δύο ομάδων πληθυσμών. Η μελέτη των μικροδορυφορικών αλληλουχιών δεν θα μπορούσε να ανιχνεύσει αυτό το φράγμα αλλά πιο πρόσφατα εξελικτικά γεγονότα, όπως για παράδειγμα ποια ήταν η επίδραση των φαινομένων ορογένεσης στους πληθυσμούς της δυτικής Κρήτης, ποιος ήταν τρόπος εποίκισης των ανατολικών νησιών και γενικότερα ποιος ήταν ο τρόπος που κινήθηκαν τα υπό εξέταση ζώα στο χώρο της Κρήτης σε περιόδους πρόσφατες στο παρελθόν.

Ένας άλλος πιθανός στόχος για μελλοντικές μελέτες αποτελεί η εξήγηση της υπολειμματικής κατανομής του τάξου στην Κρήτη. Οι ασυνεχείς κατανομές οφείλονται σε ιστορικούς ή οικολογικούς παράγοντες. Ωστόσο δεν υπάρχει κάποιος προφανής ιστορικός λόγος που να εξηγεί την απουσία του τάξου από την ανατολική Κρήτη. Επομένως η απάντηση πρέπει να αναζητηθεί στους άγνωστους για την ώρα οικολογικούς-περιβαλλοντικούς παράγοντες που οδήγησαν στην συγκεκριμένη κατανομή του τάξου. Άλλωστε η αποσαφήνιση των λόγων που οδήγησαν στον περιορισμό της κατανομής παρουσιάζουν ενδιαφέρον και για λόγους που άπτονται του τομέα της Διαχειριστικής Βιολογίας.

Τέλος η αποσαφήνιση των γεωλογικών γεγονότων που έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της μορφής του νησιού της Κρήτης μπορεί να διευκολύνει την εφαρμογή ή και την επιβεβαίωση υποθέσεων πάνω στα χωρικά πρότυπα εμφάνισης των οργανισμών.

4.4 Συμπεράσματα

- Το είδος *P. cretensis* χαρακτηρίζεται από την παρουσία διακριτών γενετικά κλάδων και σχετικά υψηλή ενδοειδική ποικιλομορφία στο επίπεδο του μιτοχονδριακού DNA.
- Οι πληθυσμοί του είδους *P. cretensis* τοποθετούνται φυλογενετικά σε δύο κύριες γενεαλογικές γραμμές (που απέχουν αρκετά γενετικά μεταξύ τους) ο διαχωρισμός των οποίων συνέβη στο μέσο Πλειόκαινο (4,2 εκ. χρόνια πριν) και μπορεί να αποδοθεί σε γεγονότα κατακερματισμού της δυτικής πλευράς του κυρίως νησιού σε μικρότερα νησιά.

- Τα άτομα από τη δυτική Κρήτη δεν φαίνονται να μοιράζονται ένα κοινό πρόγονο παρά το γεγονός πως πολλοί από τους δυτικούς απλοτύπους εμφανίζονται συμπατριοί. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί μέσω διαδικασιών πρόσφατης διεύρυνσης της κατανομής των πληθυσμών λόγω εξαφάνισης των φραγμάτων στη γονιδιακή ροή.
- Οι πληθυσμοί από το Αυγό και τη Δία μοιράζονται έναν κοινό πρόγονο ο οποίος προήλθε πιθανόν από κάποια περιοχή της βορειοδυτικής Κρήτης μέσω κάποιου γεγονότος διασποράς στο τέλος του Πλειοκαίνου.
- Οι πληθυσμοί των νησίδων της ανατολικής Κρήτης μοιράζονται ένα κοινό πρόγονο πιθανώς από την περιοχή της ανατολικής Κρήτης. Η εποίκιση των νήσων αυτών μπορεί να αποδοθεί σε συνδυασμό ανεξάρτητων βικαριανιστικών γεγονότων και γεγονότων διασποράς από την ανατολική Κρήτη.
- Η χρήση ενός δείκτη με μεγαλύτερη ευαισθησία στα πρόσφατα εξελικτικά γεγονότα, καθώς και η βελτίωση των γνώσεών μας για την παλαιογεωγραφική ιστορία της εν λόγω περιοχής μπορούν να ρίξουν φως στην κατανόηση των γεγονότων και των διαδικασιών που οδήγησαν στα παρατηρούμενα φυλογεωγραφικά πρότυπα του είδους *P. cretensis* στην περιοχή της Κρήτης.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική

Κασαπίδης, Π. (1996) Μελέτη της Φυλογεωγραφίας του *Cyrtodactylus kotschy* (Sauria: Gekkonidae) στο χώρο του Νότιου Αιγαίου, με ανάλυση μιτοχονδριακού DNA. Μεταπτυχιακή διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο

Κορνήλιος, Π. (2007) Φυλογεωγραφία του *Chalcides ocellatus* (Sauria: Scincidae) στην περιοχή της Μεσογείου, με τη χρήση μοριακών μεθόδων. Μεταπτυχιακή διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο

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

Ξενόγλωσση

Arnold, E.N. (1973) Relationships of the Palaearctic lizards assigned to the genera *Lacerta*, *Algyroides* and *Psammodromus* (Reptilia, Lacertidae). *Bulletin of the British Museum of Natural History* **25**: 291–366.

Arnold, E. N. (1987) Resource partition among lacertid lizards in southern Europe. *Journal of Zoology* (B) **1**: 739–782.

Arnold, E.N. (1989) Towards the phylogeny and biogeography of the Lacertidae. Relationships within an Old-World family of lizards derived from morphology. *Bulletin of the British Museum of Natural History (Zoology)* **55**: 209–257.

Arnold, E.N. (2002) *A Field Guide to the Reptiles and Amphibians of Britain and Europe*. Collins, London.

Arnold E.N. (2004) Overview of morphological evolution and radiation in the Lacertidae. In Perez-Mellado, V., Riera, N., Perera, A. (Eds.), *The Biology of*

Lacertid Lizards Evolutionary and Ecological Perspectives, Institut Menorquí d'Estudis, Recerca, Menorca

Arnold, E.N., Arribas O., Carranza S. (2007) Systematic of the palearctic and oriental lizard tribe Lacertini (Squamata: Lacertidae: Lacertinae), with description of eight new genera, *Zootaxa*, **1430**: 1 – 86.

Arnold, E.N., Burton, J.A. (1978) A Field Guide to the Reptiles and Amphibians of Britain and Europe. Collins, London

Austin, J.J. Melville, J. (2006) Incorporating historical museum specimens into molecular systematic and conservation genetics research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 1089-1092

Avise, J.C. (1994) Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, New York.

Avise, J.C. (2000) Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Avise, J. C., Arnold, J., Ball Jr., 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. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **18**:489–522.

Avise, J.C., Giblin-Davidson, C., Laerm, J., Patton, J.C., Lansman, R.A. (1979) Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proceedings of California Academy of Science* **76**: 6694-6698.

Camargo, A., Sinerva, B., and Sites Jr., J.W. (2010) Lizards as Model Organisms for linking phylogeographic and speciation studies. *Molecular Ecology* **19**: 3250-3270.

Carranza, S., Arnold, E.N., Amat, F. (2004) DNA phylogeny of *Lacerta* (*Iberolacerta*) and other lacertine lizards (Reptilia: Lacertidae): did competition cause long-term mountain restriction? *Systematics and Biodiversity* **2**: (1), 57–77.

Chatzaki, M., Lymberakis, P., Markakis, G., Mylonas, M. (2005) The distribution of ground spiders (Araneae, Gnaphosidae) along the altitudinal gradient of Crete, Greece: species richness, activity and altitudinal range. *Journal of Biogeography* **32**: 813–831.

Creutzburg, N. (1963) Paleogeographic evolution of Crete from Miocene till our days. *Cretan Annals* 15/16, 336–342.

Cole, C.J. (1966) Femoral glands in lizards. A review. *Herpetologica* **22**: 199–206.

Dermitzakis, D.M. (1990) Paleogeography, Geodynamic Processes and event Stratigraphy during the Late Cenozoic of the Aegean area. International Symposium on: Biogeographical Aspects of Insularity, Roma 1987. *Accad. Naz. Lincei* **85**: 263–288.

Dermitzakis M.D. (1994) Late Cenozoic paleogeography and faunal succession of mammals in Crete.- *Bulletin de la Société Spéléologique de Grèce*, Athènes, v. XXI, p. 301-317.

Dermitzakis, D.M., Papanikolaou, D.J. (1981) Paleogeography and geodynamics of the Aegean region during the Neogene. *Ann. Geol. Pays Hellen.* **30**: 245–289.

De Salle, R., Freedman, T., Prager, E.M., Wilson, A.C. (1987) Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution* **26**:157-164

Drummond AJ, Rambaut A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**:214.

Estes, R., de Queiroz, K., Gauthier, J. (1988) Phylogenetic relationships within Squamata. In *Phylogenetic relationships of the Lizard families* (R. Estes and G. Pregill, eds.). Stanford University Press, Stanford, California, USA, pp.119–281

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.

Fu, J. (2000) Toward the phylogeny of the family Lacertidae – Why 4708 base pairs of mtDNA sequences cannot draw the picture. *Biological Journal of the Linnean Society* **71**: 203–217.

Godinho R., Crespo, E.G., Ferrand, N. (2008) The limits of mtDNA phylogeography: complex patterns of population history in a highly structured Iberian lizard are only revealed by the use of nuclear markers. *Molecular Ecology* **17**:4670–4683

Good, D., Wake, D. (1993) Systematic studies of the Costa Rican Moss Salamanders, genus *Nototriton*, with descriptions of three new species. *Herpetological Monographs* **7**: 131–159.

Harris, D.J., Arnold, E.N. (1999) Relationships of wall lizards, *Podarcis* (Reptilia: Lacertidae) based on mitochondrial DNA sequences. *Copeia* **3**: 749–754.

Harris, D.J., Arnold, E.N., Thomas, R.H. (1998) Relationships of lacertid lizards (Reptilia; Lacertidae) estimated from mitochondrial DNA sequences and morphology. *Proceedings of the Royal Society of London* **265**: 1939–1948.

Harris, D.J., Pinho, C., Carretero, M.A., Corti, C., Böhme, W. (2005) Determination of genetic diversity within the insular lizard *Podarcis tiliguerta* using mtDNA sequence data, with a reassessment of the phylogeny of *Podarcis*. *Amphibia-Reptilia* **26**:401–407

- Harris, D.J., Sa-Sousa, P. (2002) Molecular phylogenetics of Iberian wall lizards *Podarcis*: Is *Podarcis hispanica* a species complex? *Molecular Phylogenetics and Evolution* **23** (1): 75–81.
- Hasegawa, M., Kishino, H. Yano, T. (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **21**: 160–174.
- Holmes D. S., Bonner J. (1973) Preparation, molecular weight, base composition, and secondary structure of giant ribonucleic acid. *Biochemistry* **12**: 2330–2338.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F. (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**:754–755
- Larkin M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948
- Legakis, A., Kypriotakis Z. (1994) A biogeographic analysis of the island of Crete (Greece). *Journal of Biogeography* **21**: 441-445.
- Le Pichon, X., Angelier, J. (1981) The Aegean Sea. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **300**: 357–372.
- Lymberakis, P. & Poulakakis, N. (2010) Three continents claiming an archipelago: The evolution of Aegean's herpetofaunal diversity. *Diversity* **2**: 233-255.
- Lymberakis, P., Poulakakis., N., Kaliontzopoulou, A., Valakos, E., Mylonas, M. (2008) Two new species of *Podarcis* (Squamata; Lacertidae) from Greece. *Systematics and Biodiversity* **6**(3):307-318
- Mau, B., Newton, M.A. (1997) Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov chain Monte Carlo. *J. Comput. Graph. Stat.* **6**:122–131.

Mau, B., Newton, M., Larget, B. (1999) Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics* **55**:1–12.

Mayer, W., Benyr, G. (1994) Albumin-Evolution und Phylogense in der Familie Lacertidae. *Ann. Naturhist. Mus. Wien* **96**: 621–648.

Meulenkamp, J.E. (1985) Aspects of the Late Cenozoic evolution of the Aegean Region. In: Stanley, D.J. & Wezel, F.C.(Eds.), *Geological Evolution of the Mediterranean Basin*. Springer, New York, pp. 307–321.

Meulenkamp, J., Wortel, M., Van Wamel, W., Spakman, W., Hoogerduyn Strating, E. (1988) On the Hellenic subduction zone and the geodynamic evolution of Crete since the late Middle Miocene. *Tectonophysics* **146**: 203–215.

Michel-Salzat A., Bouchon D. (2000) Phylogenetic analysis of mitochondrial LSU rRNA in oniscids. *Comptes rendus de l'Académie des sciences - Series III - Sciences de la Vie* **323** (9): 827–837.

Oliverio, M., Bologna, A.M., Marinniti, P. (2000) Molecular biogeography of the Mediterranean lizards *Podarcis* (Wagler, 1830) and *Teira* (Gray, 1838) (Reptilia, Lacertidae). *Journal of Biogeography* **27**: 1403–1420.

Palumbi, S.R. (1996) Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer, Sunderland, MA, pp. 205–248.

Parmakelis, A., Spanos, E., Papagiannakis, G., Louis, C., Mylonas, M. (2003) Mitochondrial DNA phylogeny and morphological diversity in the genus *Mastus* (Beck, 1837): a study in a recent (Holocene) island group (Koufonisi, south-east Crete). *Biological Journal of the Linnean Society* **78**:383–399

Peters, M.J (1985) Late cenozoic tectono-stratigraphic development of eastern Crete. *Gua papers of Geology* **23**: 62–212.

Pinho, C., Kaliontzopoulou, A., Harris, D.J., Ferrand, N. (2011) Recent evolutionary history of the Iberian endemic lizards *Podarcis bocagei* (Seoane, 1884) and *Podarcis carbonelli* (Pérez-Mellado, 1981) (Squamata: Lacertidae) revealed by allozyme and microsatellite markers. *Zoological Journal of the Linnean Society* **162**: 184–200.

Podnar, M., Mayer, W., Tvrtković, N. (2004) Mitochondrial phylogeography of the Dalmatian wall lizard —*Podarcis melisellensis* (Lacertidae). *Organisms Diversity and Evolution* **4**: 307–317.

Podnar, M., Mayer, W., Tvrtkovic, N. (2005) Phylogeography of the Italian Wall lizard, *Podarcis sicula*, as revealed by mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* **14**: 575–588.

Posada, D., (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1253–1256.

Poulakakis, N., Theodorou, G.E., Zouros, E., Mylonas, M. (2002) Molecular phylogeny of the extinct Pleistocene dwarf elephant *Palaeoloxodon antiquus falconeri* from Tilos Island, Dodekanisa, Greece. *Journal of Molecular Evolution* **55**: 364–374.

Poulakakis, N., Lymberakis, P., Antoniou, A., Chalkia, D., Zouros, E., Mylonas, M., Valakos, E. (2003) Molecular phylogeny and biogeography of the wall-lizard *Podarcis erhardii* (Squamata: Lacertidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **28**: 38–46.

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. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **37**: 845–857.

Poulakakis, N., Lymberakis, P., Valakos, E., Pafilis, P., Zouros, E., Mylonas, M. (2005b) Phylogeography of Balkan wall lizard (*Podarcis taurica*) and its relatives inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* **14**: 2433–2443.

Rambaut, A. (2009) FigTree v1.3.1: Tree Figure Drawing Tool. Available from <http://treebioedacuk/software/figtree/>.

Rambaut, A., Drummond, A.J. (2003) Tracer [computer program]. [<http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer>].

Rannala, B., Yang, Z. (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* **43**: 304–311.

Rodriguez, F., Oliver, J.F., Marin, A., Medina, J.R. (1990) The general stochastic model of nucleotide substitutions. *Journal of Theoretical Biology* **142**: 485-501

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

Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**:406–425.

S α -Sousa, P., Harris, D.J. (2002) *Podarcis carbonelli* (Perez-Mellado, 1981) is a distinct species. *Amphibia-Reptilia* **23**: 459–468.

Schilthuizen, M., Gutteling, E., Van Moorsel, C.H.M., Welter-Schultes, F.W. , Haase, M., Gittenberger, E., (2004) Phylogeography of the land snail *Albinaria hippolyti* (Pulmonata: Clausiliidae) from Crete, inferred from *ITS-1* sequences. *Biological Journal of the Linnean Society* **83**: 317–326

Schüle, W. (1993) Mammals, vegetation and the initial human settlement of the Mediterranean islands: a palaeoecological approach. *Journal of Biogeography* **20**: 399–412.

Sindaco, R., Jeremenko, V.K. (2008) The Reptiles of the Western Palearctic. 1. Annotated Checklist and Distributional atlas of the turtles, crocodiles, amphisbaenians

and lizards of Europe, North Africa, Middle East and Central Asia. Edizioni Belvedere, Latina (Italy).

Sondaar, P.Y., Dermitzakis, M.D., De Vos, J. (1996) The palaeogeography and faunal evolution of the land mammals of Crete. In: Reese, D.S. (ed.), Pleistocene and Holocene fauna of Crete and its first settlers, Prehistory Press, Philadelphia, pp. 61-67

Stamatakis, A., Hoover, J., Rougemont, (2008) A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web-Servers, *Systematic Biology* **75**(5): 758-771

Swofford, D.L. (2002) PAUP 4.0b10a. Phylogenetic Analysis using Parsimony (and other Methods). Sinauer, Sunderland, MA.

Swofford, D. L., Olsen, G. J., Waddell, P. J., Hillis, D. M. (1996) Phylogenetic inference. In Hillis, D. M., Moritz, C., Mable, B. K., (eds.) *Molecular systematics*. 2nd edition. Sinauer, Sunderland, Mass, pp. 407–514

Tamura, K., Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**: 512-526.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731-2739.

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.

Townsend, T.M., Larson, A., Louis, E.J., Macey, J.R. (2004) Molecular phylogenetics of Squamata: the position of snakes, amphisbaenians, and dibamids, and the root of the squamate tree. *Systematic Biology* **53**:735– 757.

Valakos, E.D., Maragou, P., Mylonas, M. (1999) Geographical distribution: *Podarcis erhardii*. *SSAR Herp. Rev.* **30**: 52–53.

Yang, Z., Rannala, B. (1997) Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution* **14**: 717–724.

Zhang, D.X, Hewitt G.M. (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* **12**: 563–584

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1: Το σύνολο των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη όπου φαίνονται κατά σειρά ο αύξων αριθμός (A/A) με τον οποίο παρουσιάζονται στις αναλύσεις, ο μοναδικός κωδικός του κάθε δείγματος στη συλλογή του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης (NHMC), ο κωδικός δειγματοληψίας (FC), η ακριβής τοποθεσία, η ημερομηνία δειγματοληψίας και η αναφορά για την αλληλουχία των δύο γονιδίων (cyt *b* και 16s rRNA) χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις.

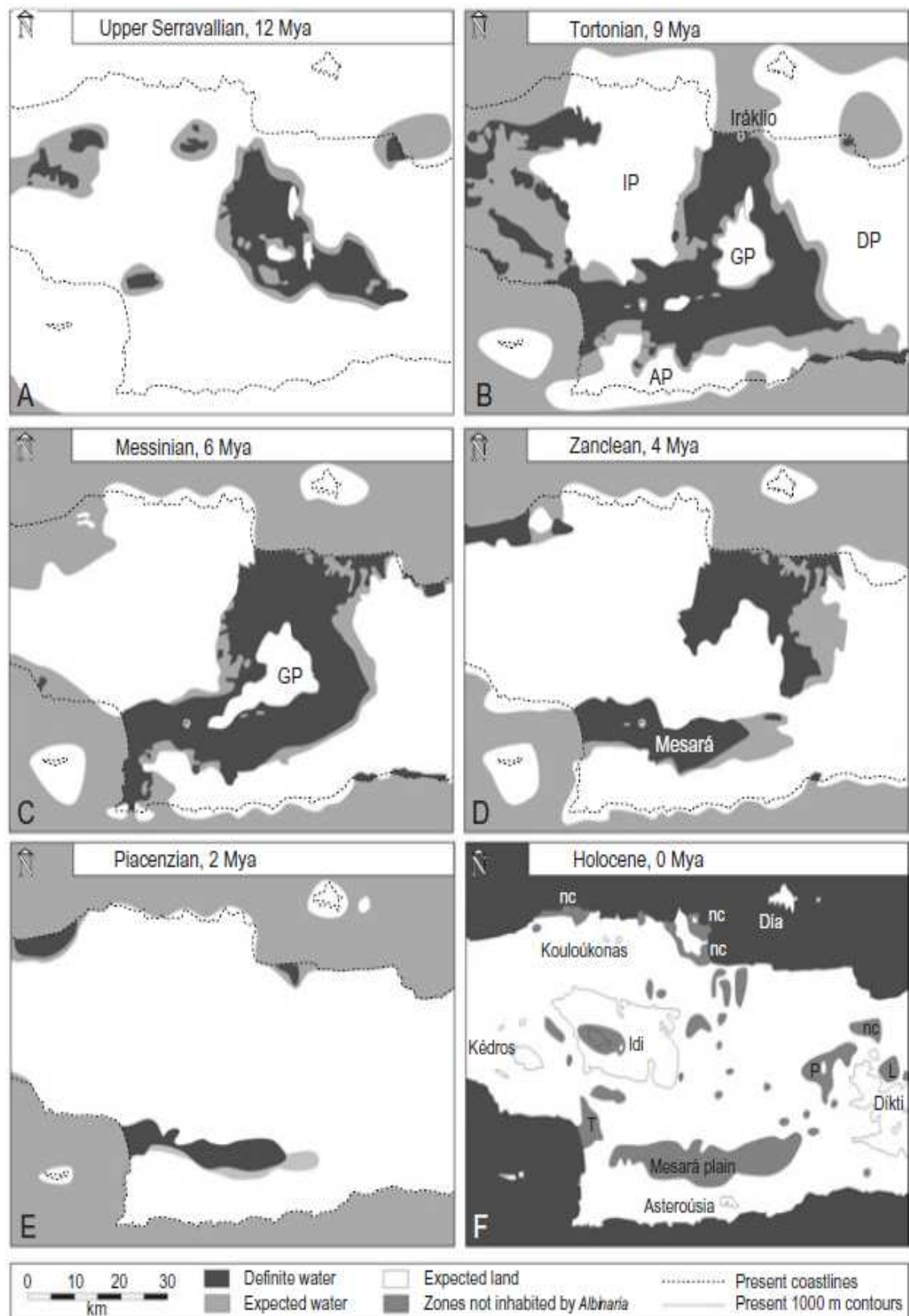
A/A	Κωδικός NHMC	FC	Ακριβής τοποθεσία	Ημερ. Δειγματοληψίας	Αναφορά	
					cytb	16s RNA
1	NHMC80.3.51.1	1691	Argyroupoli Rethymnou	13/5/1995	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
2	NHMC80.3.51.3	1863	Samaria gorge village	1/5/1995	Πουλακακης, 2005	-
3	NHMC80.3.51.4	1691	Argyroupoli Rethymnou	13/5/1995	Παρούσα εργασία	Παρούσα εργασία
4	NHMC80.3.51.5	1857	Kampos Kissamou	11/5/1996	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
5	NHMC80.3.51.6	1689	Azogyres	12/5/1996	Παρούσα εργασία	Παρούσα εργασία
6	NHMC80.3.51.7	1694	Kallikratis after, oak forest	26/5/1995	Παρούσα εργασία	Παρούσα εργασία
7	NHMC80.3.51.13	1860	Sougia	12/5/1996	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
8	NHMC80.3.51.14	1865	Kallikratis before, fern prairie	26/5/1995	Παρούσα εργασία	Παρούσα εργασία
9	NHMC80.3.51.43	318	Gkouverno, Strongylo Kefali	9/3/1997	Πουλακακης, 2005	-
10	NHMC80.3.51.100	1858	Mikronisi isl.	26/3/1994	Poulakakis et al. 2005a	Poulakakis et al. 2005a
11	NHMC80.3.51.143	1887	Lefka Ori , Anopoli Sfakion to Pachnes peak, - 1850 m alt	17/10/1990	Πουλακακης, 2005	-
12	NHMC80.3.51.155	556	Trachilos isl.	15/1/1998	Πουλακακης, 2005	-
13	NHMC80.3.51.157	2999	Strongylo isl.	25/6/2001	Πουλακακης, 2005	-
14	NHMC80.3.51.176	1859	Samaria	19/4/1998	Πουλακακης, 2005	-
15	NHMC80.3.51.177	1859	Samaria	19/4/1998	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
16	NHMC80.3.51.198	1641	Elasa isl.	2/5/1998	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
17	NHMC80.3.51.199	1862	Lefka Ori mt., Trocharis peak	20/4/1991	Πουλακακης, 2005	-
18	NHMC80.3.51.200	1862	Lefka Ori mt., Trocharis peak	20/4/1991	Παρούσα εργασία	-
19	NHMC80.3.51.235	1441	Paximada isl.	14/4/2000	Πουλακακης, 2005	-
20	NHMC80.3.51.237	1331	Dia isl.	13/4/2000	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
21	NHMC80.3.51.241	1442	Dragonada isl.	15/4/2000	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
22	NHMC80.3.51.318	3788	Spatha cape, Diktyna archeological site	9/19/2001	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005
23	NHMC80.3.51.310	3783	Anopoli	9/29/1999	Poulakakis et al. 2005a	Poulakakis et al. 2005a
24	NHMC80.3.51.260	1492	Chrysi isl.	17/4/2000	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
25	NHMC80.3.51.277	1552	Marmara isl.	1/5/1999	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
26	NHMC80.3.51.327	2998	Koufonisi isl.	25/6/2001	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
27	NHMC80.3.51.504	2552	Gramvousa peninsula, Agia Eirini church	9/5/1999	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
28	NHMC80.3.51.515	2553	Prasonisi isl.	6/6/1999	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
29	NHMC80.3.51.537	2555	Elafonisi	7/6/1999	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
30	NHMC80.3.51.542	2556	Big island of Souda	14/10/1999	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
31	NHMC80.3.51.567	4683	Lefka Ori mt., Fournoti	18/8/1996	Poulakakis et al. 2005	Poulakakis et al. 2005a
32	NHMC80.3.51.569	4683	Lefka Ori mt., Fournoti	18/8/1996	Παρούσα εργασία	-
33	NHMC80.3.51.702	4618	Lefka Ori mt, over Anopolis 2.200m	29/6/1990	Παρούσα εργασία	-
34	NHMC80.3.51.1723	8480	Anopoli, Cupressus forest, 1300m	22/7/2006	Παρούσα εργασία	Παρούσα εργασία
35	NHMC80.3.51.1919	8481	Anopoli, phrygana plateau,	22/7/2006	Παρούσα εργασία	Παρούσα εργασία

			1780m			
36	NHMC80.3.51.1921	8481	Anopoli, phrygana plateau, 1780m	22/7/2006	Παρούσα εργασία	-
37	NHMC80.3.51.2092	10401	Therissos gorge	7/6/2007	Παρούσα εργασία	Παρούσα εργασία
38	NHMC80.3.51.2120	10402	Therissos gorge	8/6/2007	Παρούσα εργασία	Παρούσα εργασία
39	NHMC80.3.51.2246	10928	Sougia, Lissos gorge	7/8/2007	Παρούσα εργασία	Παρούσα εργασία
40	NHMC80.3.51.2014	10345	Elafonisi	2/5/2007	Παρούσα εργασία	Παρούσα εργασία
41	NHMC80.3.51.2021	10345	Elafonisi	2/5/2007	Παρούσα εργασία	Παρούσα εργασία
42	NHMC80.3.51.284	1316	Trypiti gorge	2/4/2000	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
43	NHMC80.3.51.44	1691	Argyroupoli Rethymnou	13/5/1995	Παρούσα εργασία	-
44	NHMC80.3.51.403	4577	Lefka Ori., Etsikomitata	1/8/2002	Παρούσα εργασία	-
45	NHMC80.3.51.2270	10937	Therissos gorge	15/7/2007	Παρούσα εργασία	Παρούσα εργασία
46	NHMC80.3.51.663	4865	Avgo islet	2/3/1997	Poulakakis et al. 2005a	Poulakakis et al. 2005a
47	NHMC80.3.51.501	2557	Gramvousa peninsula, Balos	9/5/1999	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
48	NHMC80.3.51.291	2185	Kallikratis, plateau over Kallikratis village, 950m alt	6/2/2001	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
49	NHMC80.3.51.545	4518	Lissos gorge, next to Sougia	9/6/2002	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
50	NHMC80.3.51.516	2554	Elafonisi (opposite shore)	6/6/1999	Πουλακακης, 2005	-
51	NHMC80.3.51.309	3000	Makroulo isl.	25/6/2001	Πουλακακης, 2005	-
52	NHMC80.3.51.319	3787	Spatha cape, Rodopos 4km north	18/9/2001	Πουλακακης, 2005	-
53	NHMC80.3.51.311	1330	Therissos gorge	9/4/2000	Πουλακακης, 2005	-
54	NHMC80.3.51.288	2409	Prasonisi isl. (Pori isl.)	27/3/2001	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
55	NHMC80.3.51.279	2409	Prasonisi isl. (Pori isl.)	27/3/2001	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
56	NHMC80.3.54.2	775	Kalavryta 15 km before from Stymfalia lake	7/5/1999	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
57	NHMC80.3.54.20	615	Lafka, earthroad west of the village - 750 m alt -	8/7/1998	Poulakakis et al.,2003	-
58	NHMC80.3.54.25	5660	Pyrgos (ZMFK 41690)	20/4/1984	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
59	NHMC80.3.54.27	5662	Peloponnisos (ZMFK 12345)		Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
60	NHMC80.3.54.26	5661	Agios Petros, Parnonas (ZMFK 31272)		Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
61	NHMC80.3.54.9	3826	Stymfalia lake	1/4/2000	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
62	NHMC80.3.54.7	780	Stoupa 8 km south	9/5/1999	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
63	NHMC80.3.54.19	615	Lafka, earthroad west of the village - 750 m alt -	8/7/1998	Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
64	NHMC80.3.54.29	5801	Feneos		Poulakakis et al.,2003	Poulakakis et al. 2005a
65	NHMC80.3.54.15	610	Kalavryta 750 m alt Vouraikos to Tachlorou	6/7/1998	Πουλακακης, 2005	-

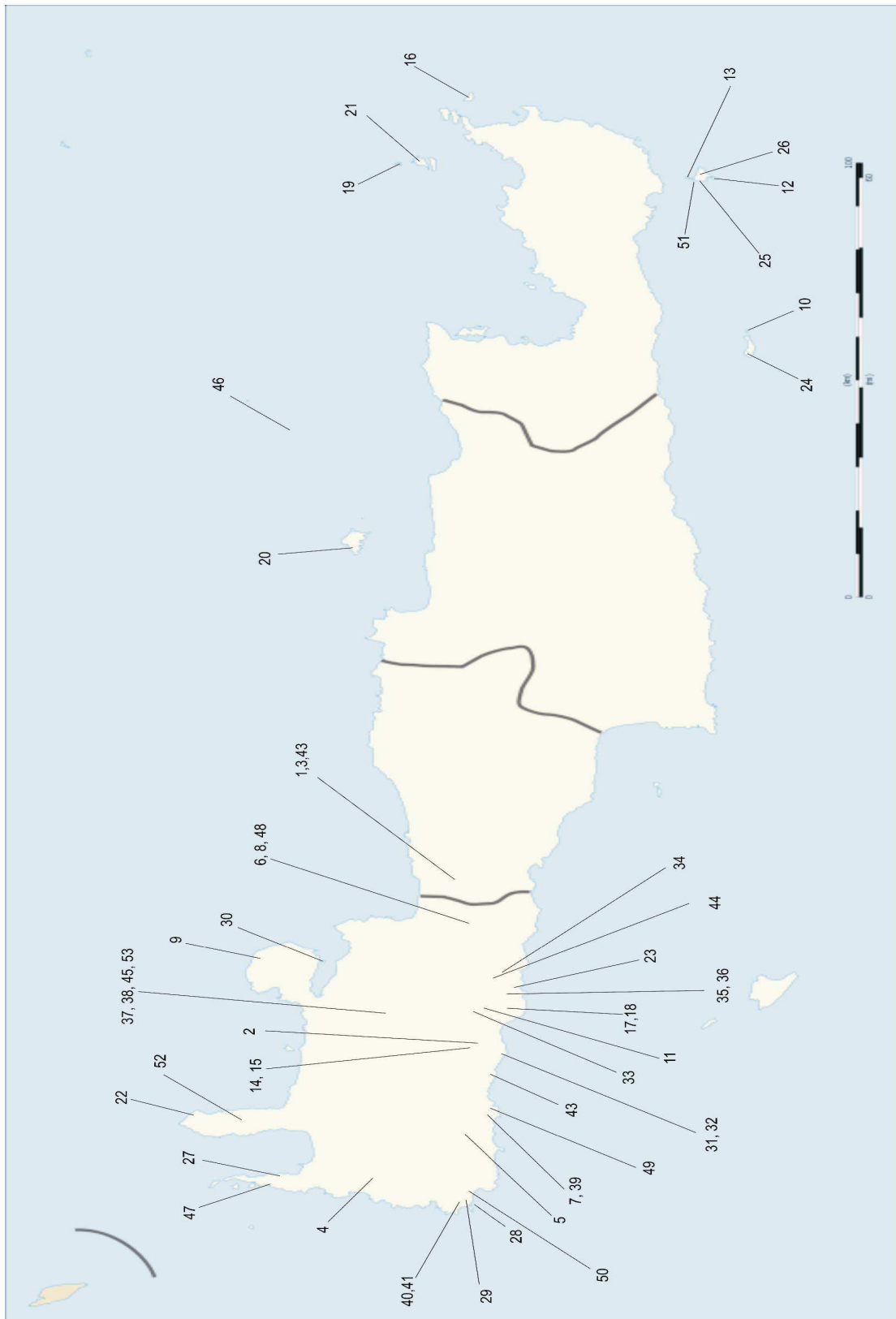
Πίνακας 2: Το σύνολο των δειγμάτων *P. cretensis* από τα οποία έγινε εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA, ανεξάρτητα με το αν τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις. Στον πίνακα φαίνονται κατά σειρά ο μοναδικός κωδικός του κάθε δείγματος στη συλλογή του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης (NHMC), ο κωδικός δειγματοληψίας (FC), η ακριβής τοποθεσία και η ημερομηνία δειγματοληψίας

Κωδικός NHMC	FC	Ακριβής τοποθεσία	Ημερ. Δειγματοληψίας
NHMC80.3.51.3	1863	Samaria gorge village	1/5/1995
NHMC80.3.51.4	1691	Argyroupoli Rethymnou	13/5/1995
NHMC80.3.51.5	1857	Kampos Kissamou	11/5/1996
NHMC80.3.51.6	1689	Azogyres	12/5/1996
NHMC80.3.51.7	1694	Kallikratis after, oak forest	26/5/1995
NHMC80.3.51.14	1865	Kallikratis before, fern praire	26/5/1995
NHMC80.3.51.44	1691	Argyroupoli Rethymnou	13/5/1995
NHMC80.3.51.65	435	Souda island	14/7/1997
NHMC80.3.51.80	491	Elafonisi island	1/9/1997
NHMC80.3.51.116	1808	Lefka Ori mt., Anopoli Sfakion to Pachnes peak - 800 m alt	6/11/1991
NHMC80.3.51.176	1859	Samaria	19/4/1998
NHMC80.3.51.177	1859	Samaria	19/4/1998
NHMC80.3.51.200	1862	Lefka Ori mt., Trocharis peak	20/4/1991
NHMC80.3.51.201	4581	Lefka Ori., end of the road from Anopoli	1/8/2002
NHMC80.3.51.248	1742	Moni Chrysoskalitissa - phrygana by the shore	15/1/1991
NHMC80.3.51.284	1316	Trypiti gorge	2/4/2000
NHMC80.3.51.292	2190	Kallikratis, plateau over Kallikratis village, 950m alt	29/5/2001
NHMC80.3.51.318	3788	Spatha cape, Diktyna archeological site	19/9/2001
NHMC80.3.51.346	1330	Therissos gorge	9/4/2000
NHMC80.3.51.347	3847	Dia isl.	5/2/2002
NHMC80.3.51.398	4577	Lefka Ori., Etsikomitata	1/8/2002
NHMC80.3.51.399	4577	Lefka Ori., Etsikomitata	1/8/2002
NHMC80.3.51.400	4577	Lefka Ori., Etsikomitata	1/8/2002
NHMC80.3.51.401	4577	Lefka Ori., Etsikomitata	1/8/2002
NHMC80.3.51.403	4577	Lefka Ori., Etsikomitata	1/8/2002
NHMC80.3.51.404	4577	Lefka Ori., Etsikomitata	1/8/2002
NHMC80.3.51.405	4577	Lefka Ori., Etsikomitata	1/8/2002
NHMC80.3.51.406	4577	Lefka Ori., Etsikomitata	1/8/2002
NHMC80.3.51.407	4577	Lefka Ori., Etsikomitata	1/8/2002
NHMC80.3.51.421	4518	Lissos gorge, next to Sougia	9/6/2002
NHMC80.3.51.543	2208	Ossa mt., Spilia 10 km after to Karytsa	30/7/2001
NHMC80.3.51.569	4683	Lefka Ori mt., Fournoti	18/8/1996
NHMC80.3.51.648	4760	Katholiko cave	10/6/2003
NHMC80.3.51.702	4618	Lefka Ori mt, over Anopolis 2.200m	29/6/1990
NHMC80.3.51.751	5561	Nomos Irakleiou V.C.	11/2/2002
NHMC80.3.51.850	5861	Rodopos cape	31/10/2004
NHMC80.3.51.881	7758	Sougia, Lissos gorge	2/10/2001
NHMC80.3.51.1723	8480	Anopoli, Cupressus forest, 1300m	22/7/2006
NHMC80.3.51.1916	8481	Anopoli, phrygana plateau, 1780m	22/7/2006
NHMC80.3.51.1921	8481	Anopoli, phrygana plateau, 1780m	22/7/2006

NHMC80.3.51.2014	10345	Elafonisi	2/5/2007
NHMC80.3.51.2021	10345	Elafonisi	2/5/2007
NHMC80.3.51.2068	10335	Balos Gramvousas	15/5/2007
NHMC80.3.51.2078	10332	Agia Eirini Gramvousas	11/5/2007
NHMC80.3.51.2092	10401	Therissos gorge	7/6/2007
NHMC80.3.51.2120	10402	Therissos gorge	8/6/2007
NHMC80.3.51.2129	10405	Mouri, over Anopolis	26/5/2007
NHMC80.3.51.2139	10406	Mouri, over Anopolis	27/5/2007
NHMC80.3.51.2156	10406	Mouri, over Anopolis	27/5/2007
NHMC80.3.51.2160	10406	Mouri, over Anopolis	27/5/2007
NHMC80.3.51.2240	10924	Sougia, Lissou gorge	29/5/2007
NHMC80.3.51.2242	10926	Sougia, Lissos gorge)	11/8/2007
NHMC80.3.51.2246	10928	Sougia, Lissos gorge	7/8/2007
NHMC80.3.51.2311	11988	Kouroupitos XYTA	17/5/2009
NHMC80.3.51.2312	11988	Kouroupitos XYTA	17/5/2009



Εικόνα 1: Αναμενόμενη κατανομή ξηράς και περιοχών καλυμμένων με νερό στην περιοχή της κεντρικής Κρήτης για έξι διαφορετικές περιόδους κατά τα τελευταία 12 εκ χρόνια (Schilthuitzen et al., 2004)



Εικόνα 2: Η γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων του είδους *P. cretensis* τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις της παρούσας μελέτης με βάση τον αύξων αριθμό (A/A) του πίνακα 1.

Πίνακας 3: Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων μεταξύ των ατόμων *P. cretensis* για το γονίδιο του *cyt b* με το μοντέλο των Tamura & Nei (1993).

Therissos_38	
Therissos_37	6.3
Argyroupoli_3	6.2 1.5
Argyroupoli_43	6.2 1.5 0.7
Kaikkiratis_8	1.1 6.7 5.5 6.6
Abgo_46	1.8 6.6 5.5 6.5 1.5
AgEtrini_27	0.7 7.2 6.1 7.1 1.0 2.0
Anopoli_23	1.1 6.7 5.5 6.6 0.0 1.5 1.0
Argyroupoli_1	6.2 1.5 0.0 0.7 5.5 5.4 6.0 5.4
Artemis_28	1.1 7.1 6.1 7.0 1.0 2.0 0.0 1.0 6.0
Balios_47	0.4 6.7 5.8 6.6 0.8 1.7 0.2 0.7 5.7 0.5
Dia_20	1.9 6.7 5.5 6.6 1.5 1.0 2.0 1.5 5.4 2.0 1.7
Dragonada_21	4.2 6.1 6.7 6.9 5.0 4.8 5.2 4.9 6.5 5.4 5.1 4.9
Elassa_16	3.8 5.7 6.4 6.5 4.7 4.6 5.2 4.6 6.2 5.1 4.9 4.6 0.2
Fournisli_31	6.2 0.7 0.8 1.5 5.3 5.1 5.8 5.2 0.7 5.7 5.4 5.2 5.7 5.4
Kaikkiratis_48	1.1 6.7 5.5 6.6 0.0 1.5 1.0 0.0 5.4 1.0 0.7 1.5 4.9 4.6 5.2
Kamboa_4	0.4 6.6 5.8 6.6 0.8 1.7 0.2 0.7 5.7 0.5 0.0 1.7 5.1 4.8 5.4 0.7
Koufonisi_26	3.8 5.7 6.6 6.5 5.0 4.8 5.4 4.8 6.5 5.4 5.1 4.8 0.5 0.2 5.7 4.8 5.1
Lafonisi_29	0.4 6.7 5.8 6.6 0.8 1.7 0.2 0.7 5.7 0.5 0.0 1.7 5.1 4.9 5.4 0.7 0.0 5.1
Lissos_49	6.6 0.4 0.8 1.8 5.9 5.7 6.3 5.7 0.7 6.3 6.0 5.7 6.3 6.0 0.5 5.7 6.0 6.2 6.0
Marmara_25	3.8 5.7 6.4 6.5 4.7 4.6 5.2 4.6 6.2 5.1 4.9 4.6 0.2 0.0 5.4 4.8 0.2 4.9 6.0
Menies_22	0.4 6.6 5.8 6.6 0.8 1.7 0.2 0.7 5.7 0.5 0.0 1.7 5.1 4.8 5.4 0.7 0.0 5.1 0.0 6.0 4.8
Mikronisi_10	4.2 5.7 6.4 6.5 5.0 4.8 5.4 4.9 6.2 5.4 5.1 4.9 0.5 0.2 5.4 4.9 5.1 0.5 5.1 6.0 0.2 5.1
Samaria_15	1.1 6.7 5.5 6.6 0.0 1.5 1.0 0.0 5.4 1.0 0.7 1.5 4.9 4.6 5.2 0.0 0.7 4.8 0.7 5.7 4.6 0.7 4.9
Soussa_30	1.1 7.1 6.1 7.0 1.0 2.0 0.0 1.0 6.0 0.0 0.5 2.0 5.4 5.1 5.7 1.0 0.5 5.4 0.5 6.3 5.1 0.5 5.4 1.0
Sougia_7	6.6 0.4 1.8 5.9 5.7 6.3 5.7 0.7 6.3 6.0 5.7 6.3 6.0 0.5 5.7 6.0 6.2 6.0 6.0 6.0 6.0 5.0 6.3
Tripliti_42	6.2 0.7 0.8 1.5 5.3 5.1 5.8 5.2 0.7 5.7 5.4 5.2 5.7 5.4 0.0 5.2 5.4 5.7 5.4 0.5 5.4 5.4 5.2 5.7 0.5
Xynsi_24	4.2 5.7 6.4 6.5 5.0 4.8 5.4 4.9 6.2 5.4 5.1 4.9 0.5 0.2 5.4 4.9 5.1 0.5 5.1 6.0 0.2 5.1 0.0 4.9 5.4 6.0 5.4
Trocharis_18	5.8 1.5 1.1 1.6 6.2 6.7 6.2 1.1 6.7 6.2 6.2 7.0 6.6 1.5 6.2 6.2 6.6 6.2 1.9 6.6 6.2 6.6 6.2 6.7 1.9 1.5 6.6
Fournisli_32	5.5 0.4 1.1 1.1 5.8 5.8 6.3 5.8 1.1 6.3 5.9 5.8 5.8 5.4 0.4 5.8 5.8 5.4 5.9 0.7 5.4 5.8 5.4 5.8 6.3 0.7 0.4 5.4 1.1
Anopoli_36	6.0 0.8 1.5 0.4 7.5 7.9 8.1 7.5 1.5 8.0 7.5 8.0 7.8 7.4 1.9 7.5 7.5 7.4 7.5 2.4 7.4 7.5 7.4 7.5 8.0 2.4 1.9 7.4 0.8 0.4
Therissos_45	0.0 6.3 6.2 6.2 1.1 1.8 0.7 1.1 6.2 1.1 0.4 1.9 4.2 3.8 6.2 1.1 0.4 3.8 0.4 6.6 3.8 0.4 4.2 1.1 1.1 6.6 6.2 4.2 5.8 6.5 6.0
Azogyrea_5	7.4 0.0 2.1 1.7 8.1 8.5 8.7 8.1 2.1 8.6 8.1 8.6 7.0 6.5 1.2 8.1 8.1 6.5 8.1 0.8 6.5 8.1 6.5 8.1 8.6 0.8 1.2 6.5 1.7 0.4 0.8 7.4
Anopoli_34	0.8 7.0 7.2 6.8 0.8 2.4 2.0 0.8 7.2 2.0 1.6 2.4 4.5 4.1 7.3 0.8 1.6 4.1 1.6 4.5 0.8 2.0 7.8 7.3 4.5 6.5 6.1 6.0 0.8 7.3
Anopoli_35	6.0 1.1 1.1 0.4 7.0 7.3 7.5 7.0 1.1 7.4 7.0 7.4 7.3 6.9 1.8 7.0 6.9 7.0 2.2 6.9 7.0 6.9 7.0 7.4 2.2 1.8 6.9 0.8 0.8 0.0 6.0 1.2 6.3
Iafonisi_41	0.8 6.1 7.2 6.9 2.3 3.1 1.9 2.3 7.2 2.3 1.5 3.1 3.9 3.5 6.4 2.3 1.5 3.5 1.5 6.6 3.5 1.5 3.9 2.3 6.8 6.4 3.9 7.0 5.7 6.4 0.8 6.8 1.6 6.4
Iafonisi_40	0.0 6.3 6.2 6.2 1.1 1.9 0.7 1.1 6.2 1.1 0.4 1.9 4.2 3.8 6.3 1.1 0.4 3.8 0.4 6.7 3.8 0.4 4.2 1.1 1.1 6.7 6.3 4.2 5.9 5.5 6.0 0.0 7.4 0.8 6.0 0.8
Sougia_39	6.7 0.0 3.4 1.4 8.7 9.1 9.3 8.7 3.4 9.2 8.7 9.2 8.5 8.0 2.5 8.7 8.0 8.7 2.5 8.0 8.7 8.0 8.7 9.2 2.5 2.5 8.0 1.4 0.0 0.4 6.7 0.0 6.6 0.8 6.1 6.7
Kaikkiratis_6	0.7 6.3 6.2 6.2 0.4 1.8 1.5 0.4 6.2 1.5 1.1 1.9 4.2 3.8 6.2 0.4 1.1 3.8 1.1 6.7 3.8 1.1 4.2 0.4 1.5 6.7 6.2 4.2 5.8 5.5 6.0 0.7 7.4 0.0 6.0 1.5 0.7 6.7
Anopoli_11	1.1 6.7 5.5 6.6 0.0 1.5 1.0 0.0 5.4 1.0 0.7 1.5 4.9 4.6 5.2 0.0 0.7 4.8 0.7 5.7 4.6 0.7 4.9 0.0 1.0 5.7 5.2 4.9 6.2 5.8 7.5 1.1 8.1 0.8 7.0 2.3 1.1 8.7 0.4
Akrotiri_9	0.4 6.6 5.5 6.6 0.5 1.5 0.5 5.4 0.7 0.2 1.5 4.9 4.6 5.2 0.5 0.2 4.8 0.2 5.7 4.6 0.2 4.9 0.5 0.7 5.7 5.2 4.9 6.2 5.8 7.5 0.4 8.1 1.6 7.0 1.5 0.4 8.7 1.1 0.5
Iafonisi_50	0.4 6.3 5.6 6.2 0.5 1.5 0.2 0.5 5.4 0.2 0.0 1.5 4.9 4.6 5.2 0.5 0.0 4.9 0.0 5.7 4.6 0.0 4.9 0.5 0.2 5.7 5.2 4.9 5.9 5.7 1.1 0.4 7.7 1.2 6.6 1.5 0.4 8.3 0.7 0.5 0.2
Makroulio_51	3.8 5.7 6.4 6.5 4.7 4.6 5.2 4.6 6.2 5.1 4.9 4.6 0.2 0.0 5.4 4.6 0.8 0.2 4.9 6.0 0.0 4.8 0.2 4.6 5.1 6.0 5.4 0.2 6.6 5.4 7.4 3.8 6.5 4.1 6.9 3.5 3.8 8.0 3.8 4.6 4.6
Paximada_19	4.2 5.7 6.1 6.5 4.7 4.6 5.2 4.6 5.9 5.1 4.9 4.6 0.7 0.5 5.1 4.6 4.8 0.7 4.9 5.7 0.5 4.8 0.2 4.6 5.1 5.7 5.1 0.2 6.6 5.4 7.4 4.2 6.5 4.5 6.9 3.9 4.2 8.0 4.2 4.8 4.6 4.6 0.5
Rodopos_52	0.4 6.6 5.8 6.6 0.8 1.7 0.2 0.7 5.7 0.5 0.0 1.7 5.1 4.8 5.4 0.7 0.0 5.1 0.0 6.0 4.8 0.0 5.1 0.7 0.5 6.0 5.4 5.1 6.2 5.8 7.5 0.4 8.1 1.6 7.0 1.5 0.4 8.7 1.1 0.7 0.2 0.0 4.8 4.8
Samaria_2	6.2 1.5 0.0 0.7 5.5 5.4 6.0 5.4 0.0 6.0 5.7 5.4 6.5 6.2 0.7 5.4 6.5 6.2 0.7 5.4 6.0 0.7 6.2 1.1 1.1 1.5 6.2 2.1 7.2 1.1 7.2 6.2 3.4 6.2 5.4 5.4 5.4 6.2 6.0 5.7
Samaria_14	1.1 6.7 5.5 6.6 0.0 1.5 1.0 0.0 5.4 1.0 0.7 1.5 4.9 4.6 5.2 0.0 0.7 4.8 0.7 5.7 4.6 0.7 4.9 0.0 1.0 5.7 5.2 4.9 6.2 5.8 7.5 1.1 8.1 0.8 7.0 2.3 1.1 8.7 0.4 0.0 0.5 0.5 4.6 6.7 5.4
Strogylio_13	4.1 6.1 6.6 6.9 5.0 4.8 5.4 4.8 6.5 5.4 5.1 4.8 0.5 0.2 5.7 4.8 5.1 6.2 0.2 5.1 0.5 4.8 5.4 6.2 5.7 0.5 7.0 5.7 7.8 4.1 6.9 4.5 7.3 3.8 4.2 8.5 4.1 4.8 4.8 4.9 0.2 0.7 5.1 6.5 4.8
Therissos_53	0.4 6.6 5.5 6.6 0.5 1.5 0.5 5.4 0.7 0.2 1.5 4.9 4.6 5.2 0.5 0.2 4.8 0.2 5.7 4.6 0.2 4.9 0.5 0.7 5.7 5.2 4.9 6.2 5.8 7.5 0.4 8.1 1.6 7.0 1.5 0.4 8.7 1.1 0.5 0.0 0.2 4.6 4.6 0.2 5.4 0.5 4.8
Traxilos_17	3.8 5.7 6.4 6.5 4.7 4.6 5.2 4.6 6.2 5.1 4.9 4.6 0.2 0.0 5.4 4.6 0.8 0.2 4.9 6.0 0.0 4.8 0.2 4.6 5.1 6.0 5.4 0.2 6.6 5.4 7.4 3.8 6.5 4.1 6.9 3.5 3.8 8.0 3.8 4.6 4.6 0.0 5.4 8.6 2.4 6.2 4.6
Troxaris_12	1.1 6.7 5.5 6.6 0.0 1.5 1.0 0.0 5.4 1.0 0.7 1.5 4.9 4.6 5.2 0.0 0.7 4.8 0.7 5.7 4.6 0.7 4.9 0.0 1.0 5.7 5.2 4.9 6.2 5.8 7.5 1.1 8.1 0.8 7.0 2.3 1.1 8.7 0.4 0.0 0.5 0.5 4.6 4.6 0.7 5.4 0.0 4.8 0.5 4.6
Etsikomitata_44	5.9 1.9 1.4 0.4 6.4 6.3 6.8 6.4 1.4 6.8 6.4 6.4 7.1 6.7 2.2 6.4 6.4 6.7 6.4 2.5 6.7 6.4 6.7 6.4 6.6 2.5 2.2 6.7 1.5 1.5 0.8 5.9 2.2 6.5 0.8 6.5 5.9 1.8 5.9 6.4 6.0 6.7 6.7 6.4 1.4 6.4 7.1 6.4 6.7 6.4
Leyka_ori_33	5.8 1.1 0.3 0.4 5.9 5.8 6.3 5.9 0.3 6.3 5.9 5.9 6.2 5.8 1.0 5.9 5.9 5.8 5.9 1.4 5.8 5.9 5.8 5.9 6.3 1.4 1.0 5.8 0.7 0.7 0.0 5.8 1.3 6.4 0.0 6.5 5.9 5.8 5.9 0.3 5.9 6.2 5.9 5.8 5.9 0.7

Πίνακας 4: Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων μεταξύ των ατόμων *P. cretensis* για το γονίδιο του 16s rRNA με το μοντέλο των Tamura & Nei (1993).

Thetissas_36	
Thetissas_37	2.3
Argyroupoli_3	2.5 0.0
Argyroupoli_43	nie nie nie
Kalikratis_8	0.2 2.5 2.7 nie
Aggo_46	0.4 2.3 2.5 nie 0.6
AgElimi_27	0.0 2.3 2.4 nie 0.2 0.4
Acoptoli_23	0.0 2.3 2.4 nie 0.2 0.4 0.0
Agjiropoli_1	1.4 1.2 1.3 nie 1.7 1.4 1.4 1.4
Atarnas_28	0.0 2.3 2.4 nie 0.2 0.4 0.0 0.0 1.4
Balios_47	0.0 2.3 2.4 nie 0.2 0.4 0.0 0.0 1.4 0.0
Dia_30	0.4 2.3 2.5 nie 0.6 0.0 0.4 1.4 0.4 0.4
Diagnosada_21	1.9 3.1 3.4 nie 2.1 1.8 1.8 2.0 1.8 1.8 1.8
Elaas_16	1.9 3.1 3.4 nie 2.1 1.8 1.8 2.0 1.8 1.8 1.8 0.0
Fournisi_31	1.4 1.2 1.3 nie 1.7 1.4 1.4 0.0 1.4 1.4 2.0 2.0
Kalikratis_48	0.0 2.3 2.4 nie 0.2 0.4 0.0 0.0 1.4 0.0 0.0 0.4 1.8 1.8 1.4
Kambox_4	0.0 2.3 2.4 nie 0.2 0.4 0.0 0.0 1.4 0.0 0.0 0.4 1.8 1.8 1.4 0.0
Kofonisi_26	1.2 3.1 3.4 nie 1.5 1.2 1.2 1.8 1.2 1.2 0.8 0.8 1.8 1.2 1.2
Lafonisi_29	0.0 2.3 2.4 nie 0.2 0.4 0.0 0.0 1.4 0.0 0.0 0.4 1.8 1.8 1.4 0.0 0.0 1.2
Lissos_40	1.4 1.2 1.3 nie 1.7 1.4 1.4 0.0 1.4 1.4 2.0 2.0 1.4 1.4 1.8 1.4
Marmara_35	1.2 3.1 3.4 nie 1.5 1.2 1.2 1.8 1.2 1.2 0.8 0.8 1.8 1.2 1.2 0.0 1.2 1.8
Mentis_22	0.0 2.3 2.4 nie 0.2 0.4 0.0 0.0 1.4 0.0 0.0 0.4 1.8 1.8 1.4 0.0 0.0 1.2 0.0 1.4 1.2
Mikronisi_10	1.2 3.1 3.4 nie 1.5 1.2 1.2 1.8 1.2 1.2 0.8 0.8 1.8 1.2 1.2 0.0 1.2 1.8 0.0 1.2
Samarina_15	0.0 2.3 2.4 nie 0.2 0.4 0.0 0.0 1.4 0.0 0.0 0.4 1.8 1.8 1.4 0.0 0.0 1.2 0.0 1.4 1.2 0.0 1.2
Soada_30	0.0 2.3 2.4 nie 0.2 0.4 0.0 0.0 1.4 0.0 0.0 0.4 1.8 1.8 1.4 0.0 0.0 1.2 0.0 1.4 1.2 0.0 1.2 0.0
Soqgia_7	1.4 1.2 1.3 nie 1.7 1.4 1.4 0.0 1.4 1.4 2.0 2.0 1.4 1.8 1.4 0.0 1.8 1.4 0.0 1.8 1.4 1.4
Tripti_42	1.4 1.2 1.3 nie 1.7 1.4 1.4 0.0 1.4 1.4 2.0 2.0 1.4 1.8 1.4 0.0 1.8 1.4 0.0 1.8 1.4 1.4 0.0
Xyssi_PelI	1.2 3.1 3.4 nie 1.5 1.2 1.2 1.8 1.2 1.2 0.8 0.8 1.8 1.2 1.2 0.0 1.2 1.8 0.0 1.2 0.0 1.2 1.2 1.8 1.8
Trochanis_18	nie nie
Fournisi_32	nie nie
Acoptoli_36	nie nie
Thetissas_45	0.0 3.3 3.3 nie 0.0 0.6 0.0 0.0 2.1 0.0 0.0 0.6 2.1 2.1 0.0 0.0 1.5 0.0 2.1 1.5 0.0 1.5 0.0 0.0 2.1 2.1 1.5 nie nie nie
Acogrynes_5	2.8 0.0 0.0 nie 2.8 2.8 2.8 1.5 2.8 2.8 2.8 3.8 1.5 2.8 2.8 2.8 1.5 3.8 2.8 1.5 1.5 3.8 2.8 1.5 3.8 2.8 1.5 3.8
Acoptoli_34	0.0 3.4 3.4 nie 0.0 0.8 0.0 0.0 2.2 0.0 0.0 0.8 2.2 2.2 0.0 0.0 1.5 0.0 2.2 1.5 0.0 1.5 0.0 0.0 2.2 2.2 1.5 1.5
Acoptoli_35	3.4 0.0 0.0 nie 3.4 3.5 3.4 1.9 3.4 3.4 3.5 4.1 4.1 1.9 3.4 3.4 4.4 3.4 1.9 4.4 3.4 1.9 4.4 3.4 3.4 1.9 4.4 3.4
lafonisi_41	0.0 2.9 2.9 nie 0.0 0.8 0.0 0.0 1.0 0.0 0.0 0.8 2.3 1.9 0.0 0.0 1.8 0.0 1.8 0.0 1.8 0.0 0.0 1.8 1.8 0.0 1.8 1.8
lafonisi_40	0.0 3.4 3.4 nie 0.0 0.8 0.0 0.0 2.2 0.0 0.0 0.8 2.2 2.2 0.0 0.0 1.5 0.0 2.2 1.5 0.0 1.5 0.0 0.0 2.2 2.2 1.5 1.5
Soqgia_39	3.4 0.0 0.0 nie 3.4 3.4 3.4 1.8 3.4 3.4 3.4 4.1 4.1 1.8 3.4 3.4 4.4 3.4 1.8 4.4 3.4 1.8 4.4 3.4 3.4 1.8 4.4 3.4
Kalikratis_6	0.0 3.4 3.4 nie 0.0 0.6 0.0 0.0 2.1 0.0 0.0 0.6 2.2 2.2 0.0 0.0 1.5 0.0 2.1 1.5 0.0 1.5 0.0 0.0 2.1 2.1 1.5 1.5
Acoptoli_11	nie nie
Aivroti_9	nie nie
Lafonisi_50	nie nie
Makrodia_51	nie nie
Paxinosada_19	nie nie
Rodopos_52	nie nie
Samarina_2	nie nie
Samarina_14	nie nie
Stroggylo_53	nie nie
Thetissas_13	nie nie
Trafolia_12	nie nie
Trouaria_17	nie nie
Elikonitida_44	nie nie
Leyka_oi_33	nie nie

