

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**Μελέτη της Φυλογεωγραφίας του *Mediodactylus kotschy*
(Sauria: Gekkonidae) στο αρχιπέλαγος του Αιγαίου και τις
γειτονικές περιοχές**

ΚΑΣΑΠΙΔΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2001

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Πληθυσμιακής Γενετικής και Εξέλιξης του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας Κρήτης και υποβλήθηκε στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ε. Ζούρος (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ε. Ζούρος (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Μ. Μυλωνάς (Αν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Α. Μαγουλάς (Ερευνητής Β΄ του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας Κρήτης)

Εξεταστική Επιτροπή:

Ε. Ζούρος (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Μ. Μυλωνάς (Αν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Ν. Μοσχονάς (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Δ. Αλεξανδράκη (Αν. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης)

Γ. Ροδάκης (Αν. Καθηγητής Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών)

Α. Ελευθερίου (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Μ. Δαμανάκης (Αν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Στην επιτροπή συμμετείχε, χωρίς δικαίωμα ψήφου και ο Δρ. Α. Μαγουλάς, που ήταν μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής.

Στους ανθρώπους που ομορφαίνουν τη ζωή
μου...

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τελειώνοντας τη συγγραφή της διδακτορικής μου διατριβής νοιώθω να κλείνει ένα μεγάλο κεφάλαιο που άρχισε πριν από 10 περίπου χρόνια με την είσοδό μου ως προπτυχιακού φοιτητή στο τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Ξεκίνησα τις σπουδές μου θέλοντας να σπουδάσω Οικολογία και κατέληξα να ολοκληρώνω τη διατριβή μου στο πεδίο της Εξελικτικής Βιολογίας και πιο συγκεκριμένα της Φυλογεωγραφίας.

Χωρίς να θεωρώ ότι απέκλινα ιδιαίτερα από τον αρχικό μου στόχο, εισήλθα σε ένα γνωστικό πεδίο αυτό της επιστήμης της εξέλιξης, το οποίο με γοήτευσε βαθιά και μου πρόσφερε μια συνολική φιλοσοφική θεώρηση του κόσμου.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής Πληθυσμών και Εξέλιξης του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογία Κρήτης. Για την επιτυχή ολοκλήρωσή της βοηθήθηκα από ένα πλήθος ανθρώπων τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Κατ' αρχήν, ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Ε. Ζούρο που ήταν ο επικεφαλής της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής, για τη συνολική επίβλεψη της διατριβής, τις γόνιμες και δημιουργικές συζητήσεις που είχαμε αλλά και την αγάπη που μου εμφύσησε για την επιστήμη της εξέλιξης.

Πολλές ευχαριστίες στον αναπληρωτή καθηγητή Μ. Μυλωνά, διευθυντή του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Κρήτης, στον οποίο ανήκει και η αρχική ιδέα για το θέμα της παρούσας διατριβής, και ο οποίος μου παρείχε μεγάλο μέρος των δειγμάτων που χρησιμοποίησα, καθώς και για τις ιδιαίτερα χρήσιμες και εποικοδομητικές συζητήσεις που είχα μαζί του, ιδίως όσον αφορά το κομμάτι της βιογεωγραφικής και παλαιογεωγραφικής ερμηνείας των αποτελεσμάτων.

Τον διευθυντή του εργαστηρίου Γενετικής Πληθυσμών και Εξέλιξης, Δρ. Α. Μαγουλά, ευχαριστώ θερμά για την αμέριστη συμπαράσταση του σε όλα τα στάδια εκπόνησης της διατριβής, τις γόνιμες συζητήσεις αλλά και την παροχή της απαραίτητης υλικοτεχνικής υποδομής, που χωρίς αυτήν θα ήταν αδύνατη η εκτέλεση της παρούσας διατριβής.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω από καρδιάς όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής του Ι.Θ.Α.ΒΙ.Κ., παρόντα και παρελθόντα, τον ερευνητή Δρ. Γ. Κοτούλα, τον Δρ. Carlos Saavedra, τους τεχνικούς Σ. Δαριβιανάκη, Κ. Οικονομάκη, Β. Τερζόγλου και

Μ. Δραμουντάνη, τους συναδέλφους που πέρασαν από το εργαστήριο G. Zampriccinini, Έλενα Σαρροπούλου, Α. Colombari και Δρ. Κ. Τσιγγενόπουλο, για τη βοήθεια τους σε διάφορα επίπεδα καθώς και για την φιλία, τη συνεργασία και την ευχάριστη ατμόσφαιρα στο χώρο του εργαστηρίου. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον Γιώργο και τον Carlos για τις γόνιμες συζητήσεις και την καλή παρέα, τον Giampaolo για την καταλυτική του βοήθεια σε τεχνικά ζητήματα και τον Andrea που με μύησε στο αργεντίνικο tango!

Τα μέλη του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας Π. Λυμπεράκη, Ι. Στάθη, Α. Παρμακέλη, Γ. Μάτζιου, Μ. Νικολακάκη τους ευχαριστώ για τη συλλογή μεγάλου μέρους του βιολογικού υλικού που χρησιμοποίησα.

Τον αγαπημένο φίλο Α. Ρόκα ευχαριστώ για τη συνεργασία μαζί μου ως διπλωματικός φοιτητής, αλλά και την κατοπινή βοήθειά του στη συλλογή δειγμάτων από την Πελοπόννησο και την παροχή βιβλιογραφίας.

Την Ελληνική Ορνιθολογική Εταιρία ευχαριστώ για την καθοριστική βοήθειά της για τη συλλογή δειγμάτων από βραχονησίδες του Ν. Αιγαίου και των Δωδεκανήσων, και την αξέχαστη εμπειρία των ταξιδιών με φουσκωτό στην άγρια φύση του Αιγαίου.

Ευχαριστώ τον Δρ. Tiedemann του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας της Βιέννης, για την παροχή σημαντικών για την ολοκλήρωση της διατριβής μουσειακών δειγμάτων από τη Μ. Ασία, το Πρασονήσι και δειγμάτων *Cyrtopodion scaber* καθώς και τον Δρ. Υ. Werner για την παροχή δειγμάτων από το Ισραήλ.

Ευχαριστώ το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την υποτροφία που μου παρείχε από τον Ιανουάριο του 1998 μέχρι το Μάρτιο του 2001.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, και σ' όλα τα άλλα αγαπημένα μου πρόσωπα για την συμπαράσταση, την αγάπη τους και τις όμορφες στιγμές που μου χάρισαν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. ΓΕΝΙΚΑ	1
1.1.1. Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΙΣ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ	1
1.1.2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΝΗΣΙΩΝ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΚΑΙ ΤΟ ΑΡΧΙΠΕΛΑΓΟΣ ΤΟΥ ΑΙΓΑΙΟΥ	3
1.1.3. Η ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ <i>MEDIODACTYLUS KOTSCHYI</i> ΩΣ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	4
1.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΜΕΛΕΤΟΥΜΕΝΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ	5
1.2.1. ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗΣ	5
1.2.2. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ	6
1.2.3. Η ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ - ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ	10
1.3. ΠΑΛΑΙΟΓΕΩΓΡΑΦΙΑ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	15
1.4. ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA (MTDNA) ΤΩΝ ΜΕΤΑΖΩΩΝ: ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ..	28
1.5. ΦΥΛΟΓΕΩΓΡΑΦΙΑ	33
1.5.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΥΛΟΓΕΩΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΕΙΔΩΝ ΖΩΩΝ.	40
1.5.3. ΦΥΛΟΓΕΩΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΑΛΛΑ ΝΗΣΙΩΤΙΚΑ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΑΙΓΑΙΟΥ	42
1.6. ΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΡΟΛΟΙ	44
1.7. ΠΕΡΙΓΡΑΜΜΑ ΚΑΙ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	48
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
2.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	49
2.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	53
2.2.1. ΕΞΑΓΩΓΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA	53
2.2.2. Η ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ	54
2.2.3. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ	60
2.2.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ (SEQUENCING)	61
2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	63
2.3.1. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΠΟΣΤΑΣΕΩΝ	63
2.3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	67
2.3.3. ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΟΜΟΠΛΑΣΙΑ	75
2.3.4. ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΟΥ ΡΥΘΜΟΥ (RELATIVE RATE TESTS)	76
2.3.5. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ	79
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	81
3.1. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ	81
3.2. ΛΟΓΟΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΤΑΣΤΡΟΦΕΣ	85
3.3. ΈΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	86
3.4. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΠΟΣΤΑΣΕΩΝ	91
3.5. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΔΡΩΝ	94
3.5.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΠΟΣΤΑΣΕΩΝ	94
3.5.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΓΙΣΤΗΣ ΦΕΙΔΩΛΟΤΗΤΑΣ	95
3.5.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΓΙΣΤΗΣ ΦΕΙΔΩΛΟΤΗΤΑΣ	96
3.5.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΓΙΣΤΗΣ ΦΕΙΔΩΛΟΤΗΤΑΣ	97

3.5.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΤΟΠΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΔΕΝΔΡΩΝ	99
3.6. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΕΝΤΟΣ ΚΑΘΕ ΝΗΣΙΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΤΑΣΗ ΤΟΥ ΝΗΣΙΟΥ.	103
3.7. ΈΛΕΓΧΟΙ ΣΧΕΤΙΚΟΥ ΡΥΘΜΟΥ	105
<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	107
4.1. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΠΟΣΤΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ	107
4.2. ΦΥΛΟΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ	108
4.3. ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ	121
4.4. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΕΝΤΟΣ ΤΩΝ ΝΗΣΙΩΝ	124
4.5. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΒΙΟΓΕΩΓΡΑΦΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	128
4.6. ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΟΣ ΡΥΘΜΟΣ	133
4.7. ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΡΟΛΟΓΙΟΥ	136
4.7.1. ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΡΟΛΟΓΙΟΥ ΓΙΑ ΤΟ <i>MEDIODACTYLUS KOTSCHYI</i> ...	136
4.7.2. ΆΛΛΕΣ ΦΥΛΟΓΕΩΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΚΑΙ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΡΟΛΟΓΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΑΙΓΑΙΟΥ	143
4.8. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ <i>TARENTOLA</i> ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ <i>M. KOTSCHYI</i>	150
4.9. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΥΠΟΕΙΔΗ.....	152
4.10. ΤΕΛΙΚΑ ΕΝΑ ΕΙΔΟΣ Η ΕΝΑ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΕΙΔΩΝ;.....	156
4.11. ΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΤΟΥ <i>M.KOTSCHYI</i> ΩΣ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ	159
4.12. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	161
<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</u>	165
<u>ABSTRACT</u>	169
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</u>	173
<u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ</u>	185
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ	185
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ.....	190
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3. ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ ΘΕΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ.....	196
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4: ΠΙΝΑΚΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΠΟΣΤΑΣΕΩΝ	197

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ

1.1.1. Η συμβολή της μοριακής βιολογίας στις εξελικτικές μελέτες

Η μελέτη της εξελικτικής ιστορίας των οργανισμών αποτελεί ένα από τα βασικότερα θέματα της επιστήμης της Εξέλιξης. Μέχρι σχετικά πρόσφατα, η αναπαράσταση των φυλογενετικών σχέσεων των οργανισμών προσεγγιζόταν με βάση τις μορφολογικές τους ομοιότητες και με τη βοήθεια των απολιθωματικών καταγραφών. Τα δεδομένα αυτά δεν ήταν πάντοτε επαρκή ώστε να προσδιοριστούν με ακρίβεια οι φυλογενετικές σχέσεις των οργανισμών, αφού οι μορφολογικοί χαρακτήρες δεν αντικατοπτρίζουν πάντοτε πιστά τη φυλογενετική συγγένεια επειδή υπόκεινται στη δράση της φυσικής επιλογής και επιπλέον η ποικιλότητά τους καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Όσον αφορά την διαφοροποίηση των ειδών σε ενδοειδικό επίπεδο, οι σχετικές μελέτες περιορίζονταν στην καταγραφή του μορφολογικού πολυμορφισμού και τον προσδιορισμό μορφολογικά διαφοροποιημένων υποειδών που καταλαμβάνουν διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Τα υποείδη θεωρούνται ως ενδιάμεσα στάδια στην διαδικασία της ειδογένεσης, αλλά μόνο με βάση τη μορφολογική τους διαφοροποίηση ήταν δύσκολο να θεμελιωθούν βιογεωγραφικές υποθέσεις που να ερμηνεύουν το διαχωρισμό τους και το βαθμό διαφοροποίησής τους.

Έτσι, για πολλά χρόνια, οι βιοχημικοί και οι μοριακοί βιολόγοι θεωρούσαν τις εξελικτικές μελέτες ως ένα σύνολο αστήρικτων υποθέσεων και ασυνεπούς μεθοδολογίας. Παρότι μια τέτοια άποψη ήταν σίγουρα υπερβολική, η εισαγωγή μοριακών τεχνικών τοποθέτησε την Εξέλιξη σε μια πιο στερεή βάση και τη μετέτρεψε σε μια επιστήμη όπου οι διάφορες παράμετροι μπορούν να μετρηθούν ή να υπολογιστούν από τα εμπειρικά δεδομένα και οι διάφορες θεωρίες να ελεγχθούν σε σχέση με την αντικειμενική πραγματικότητα (Graur & Li, 2000).

Η ανάπτυξη νέων μοριακών τεχνικών, όπως οι τεχνικές προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing) και η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR), προκάλεσαν επανάσταση στην εξελικτική βιολογία. Η ανάγνωση των μορίων του DNA αποκάλυψε ότι πέρα από το ρόλο τους ως φορείς της κληρονομικότητας, αποτελούν ντοκουμέντα της εξελικτικής ιστορίας των

οργανισμών. Το DNA κάθε οργανισμού περιέχει καταγραφές της εξελικτικής του ιστορίας κατ' αναλογία με έναν αρχαίο παλίμψηστο: η πληροφορία αυτή είναι συγκαλυμμένη και αποσπασματική, κάποια κομμάτια μπορεί να λείπουν ενώ κάποια άλλα είναι παραπονημένα και δυσανάγνωστα. Ο κλάδος της μοριακής εξέλιξης έχει σκοπό να αποκαλύψει αυτές τις ιστορικές καταγραφές, να συμπληρώσει τα κενά, να βάλει σε τάξη την πληροφορία και να την αποκρυπτογραφήσει. Με τη βοήθεια λοιπόν των σύγχρονων μοριακών εργαλείων και των μεθόδων φυλογενετικής ανάλυσης μπορεί να αναπαρασταθούν με μεγαλύτερη ακρίβεια οι φυλογενετικές σχέσεις των οργανισμών και η εξελικτική τους ιστορία.

Ένα από τα πιο χρήσιμα εργαλεία για φυλογενετικές μελέτες αποδείχθηκε ότι είναι το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) των ζώων, ιδιαίτερα όσον αφορά στις μελέτες μεταξύ συγγενικών ειδών. Διαθέτει μια σειρά χαρακτηριστικών, (μητρική κληρονομικότητα, απουσία ανασυνδυασμού, ταχύτερη εξέλιξη σε σχέση με το πυρηνικό DNA, ομοπλασμία εντός κάθε ατόμου) που επιτρέπουν μια αρκετά ακριβή καταγραφή της εξελικτικής ιστορίας των οργανισμών. Επιπλέον, η παρατήρηση ότι το mtDNA παρουσιάζει μεγάλη ενδοπληθυσμιακή και διαπληθυσμιακή ποικιλότητα, και ότι οι μιτοχονδριακές γενεαλογικές γραμμές των οργανισμών, παρουσιάζουν σαφείς γεωγραφικές κατανομές, οδήγησε στη δημιουργία ενός νέου κλάδου, της Φυλογεωγραφίας. Η Φυλογεωγραφία είναι το πεδίο έρευνας που μελετά τις αρχές και τις διαδικασίες που καθορίζουν τις γεωγραφικές κατανομές των γενεαλογικών γραμμών σε ενδοειδικό και διαειδικό επίπεδο. Είναι μια συνθετική επιστήμη καθώς βρίσκεται στο σταυροδρόμι διαφορετικών μικροεξελικτικών και μακροεξελικτικών κλάδων, όπως η μοριακή βιολογία, η πληθυσμιακή γενετική, η ηθολογία, η δημογραφία, η φυλογενετική βιολογία, η παλαιοντολογία, η γεωλογία και η παλαιογεωγραφία (Avisé 2000) . Από το 1987, που πρωτοεισήχθηκε ο όρος, έχουν γίνει δεκάδες μελέτες που σταδιακά αποκαλύπτουν τις αρχές και τα πρότυπα της γεωγραφικής διαφοροποίησης των πληθυσμών.

1.1.2. Ο ρόλος των νησιών στη μελέτη της εξέλιξης και το αρχιπέλαγος του Αιγαίου

Τα νησιωτικά συμπλέγματα είχαν προσελκύσει από νωρίς το ενδιαφέρον των βιολόγων, καθώς διαθέτουν μια σειρά χαρακτηριστικών που τα καθιστούν ιδανικά για τη μελέτη των εξελικτικών διαδικασιών. Οι οργανισμοί που απαντώνται σε ένα νησιωτικό σύμπλεγμα είναι συνήθως δομημένοι σε καλά καθορισμένους πληθυσμούς, με σαφή γεωγραφικά όρια, χωρίζονται από καλά καθορισμένα γεωγραφικά φράγματα και συχνά εμφανίζουν σαφή πρότυπα διαφοροποίησης. Δεν είναι τυχαίο ότι ο Δαρβίνος και ο Wallace συνέλαβαν την ιδέα της εξέλιξης των ειδών μελετώντας νησιωτικά συμπλέγματα. Αλλά και πολλές από τις θεμελιώδεις αρχές της σύγχρονης εξελικτικής θεωρίας, όπως η αρχή του ιδρυτή και η γενετική παρέκκλιση διατυπώθηκαν χάρη στην μελέτη νησιωτικών πληθυσμών.

Μέχρι σήμερα, το μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον για εξελικτικές μελέτες έχει επικεντρωθεί σε ωκεάνια νησιωτικά συμπλέγματα, όπως τα Γκαλάπαγκος, τα νησιά της Χαβάης και οι Κανάριες νήσοι, λόγω της απλής γεωλογικής ιστορίας τους και του σαφούς τρόπου με τον οποίο εποίκηθηκαν από τους οργανισμούς, μέσω διασποράς, αλλά και της μικρής ανθρωπογενούς παρέμβασης που είχαν υποστεί μέχρι πρόσφατα.

Αντιθέτως, το αρχιπέλαγος του Αιγαίου δεν είχε προσελκύσει το ενδιαφέρον των εξελικτικών βιολόγων μέχρι πρόσφατα, ίσως λόγω του λιγότερου εξωτικού χαρακτήρα του και της πολύπλοκης γεωλογικής ιστορίας του. Όμως, η περιοχή αυτή είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσα καθώς περιέχει ένα πλήθος νησιών με διαφορετική έκταση και παλαιογεωγραφική ιστορία, αποτελεί περιοχή έντονης διαφοροποίησης για πολλούς οργανισμούς, και διαθέτει μεγάλη βιοποικιλότητα. Όλα σχεδόν τα σημερινά νησιά του Αιγαίου έχουν ηπειρωτικό χαρακτήρα και είχαν αποτελέσει στο παρελθόν τμήματα ηπειρωτικών περιοχών που διαχωρίστηκαν λόγω τεκτονικών συμβάντων και μεταβολών της στάθμης της θάλασσας (ευστατισμός). Η εξάπλωση και διαφοροποίηση των φυτικών και ζωικών οργανισμών στο χώρο αυτό είναι αποτέλεσμα ενός συνδυασμού βικαριανιστικών γεγονότων και γεγονότων διασποράς. Οι διάφοροι οργανισμοί, ανάλογα με την ικανότητα διασποράς τους και το χρόνο παρουσίας τους στην περιοχή, είτε ακολούθησαν μια καθαρά βικαριανιστική κατανομή είτε μπόρεσαν και διασπάρθηκαν σε άλλες περιοχές ξεπερνώντας τα θαλάσσια φράγματα. Επιπλέον, ο άνθρωπος με την παρουσία του στο χώρο αυτό για αρκετές χιλιάδες χρόνια, μετέβαλε τις κατανομές των ειδών, με το να εισάγει νέα είδη σε περιοχές που δεν υπήρχαν πριν και να οδηγήσει σε εξαφάνιση άμεσα ή έμμεσα άλλα είδη ή πληθυσμούς ειδών. Έτσι η

ερμηνεία των κατανομών και της διαφοροποίησης των οργανισμών της περιοχής είναι πολλές φορές δύσκολη και αινιγματική. Η μοριακή βιολογία προσφέρει πλέον τα εργαλεία για να μελετηθούν με αρκετή σαφήνεια οι φυλογενετικές σχέσεις των πληθυσμών και να αποκαλυφθεί η φυλογενετική τους ιστορία.

Μέχρι σήμερα, η μελέτη της διαφοροποίησης των ειδών και των πληθυσμών τους στην περιοχή του Αιγαίου περιορίζεται αποκλειστικά σε παραδοσιακές προσεγγίσεις με βάση τη διαφοροποίηση των μορφολογικών χαρακτήρων και τις βιογεωγραφικές κατανομές τους. Οι προσεγγίσεις αυτές, συχνά αδυνατούν λόγω της αναλυτικής ικανότητας των μεθόδων που χρησιμοποιούν, να προσφέρουν ασφαλείς ερμηνείες της εξελικτικής ιστορίας των οργανισμών και να καθορίσουν με σχετική ακρίβεια τους παράγοντες που διαμόρφωσαν τα σημερινά πρότυπα κατανομής και διαφοροποίησης τους. Η μόνη ολοκληρωμένη μελέτη σε σχέση με την παρούσα, είναι η διδακτορική διατριβή του Δρ. Β. Δουρή που μελέτησε τη μοριακή εξέλιξη και φυλογεωγραφία των χερσαίων σαλιγκαριών του γένους *Albinaria* στην ίδια περιοχή. Η μελέτη αυτή συνέβαλε ως ένα βαθμό στην κατανόηση των προτύπων διαφοροποίησης της *Albinaria* στην περιοχή του Αιγαίου, αλλά δεν μπόρεσε να συσχετίσει τους διαχωρισμούς των διαφόρων ειδών με συγκεκριμένα παλαιογεωγραφικά γεγονότα.

1.1.3. Η επιλογή του *Mediodactylus kotschy* ως αντικείμενο της παρούσας μελέτης

Το *Mediodactylus kotschy* επιλέχθηκε ως αντικείμενο της παρούσας διατριβής γιατί διαθέτει μια σειρά χαρακτηριστικών που το καθιστούν έναν ιδανικό οργανισμό για τη μελέτη των εξελικτικών διεργασιών στην περιοχή του Αιγαίου και ειδικότερα, για την επίδραση των παλαιογεωγραφικών γεγονότων στη διαμόρφωση των φυλογεωγραφικών προτύπων των οργανισμών. Εμφανίζει ευρεία γεωγραφική εξάπλωση που καλύπτει όλα σχεδόν τα νησιά του Αιγαίου, από τα πιο μεγάλα μέχρι και κάποια από τα πιο μικρά, καθώς και τις γειτονικές ηπειρωτικές περιοχές. Η παρουσία του σε ολόκληρο το Αιγαίο επιτρέπει να ελεγχθεί η επίδραση διαφόρων παλαιογεωγραφικών γεγονότων στη γεωγραφική διαφοροποίηση των πληθυσμών του. Επιπλέον, εμφανίζει μεγάλη μορφολογική διαφοροποίηση με πολλά προσδιορισμένα υποείδη, γεγονός που φανερώνει ότι η παρουσία του στην περιοχή είναι αρκετά παλαιά και οι απομονώσεις κάποιων πληθυσμών του μεγάλης διάρκειας.

1.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΜΕΛΕΤΟΥΜΕΝΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ

Το *Mediodactylus kotschy* είναι ένα μικρό σαμιαμίδι της οικογένειας των Gekkonidae. Η οικογένεια περιλαμβάνει περίπου 1018 είδη που απαντώνται κυρίως σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Ο αριθμός των ειδών μεταβάλλεται συνεχώς, καθώς η συστηματική τους βρίσκεται υπό συνεχή αναθεώρηση. Τα μέλη της οικογένειας Gekkonidae είναι σαύρες μικρού μεγέθους, με μεγάλο κεφάλι και μάτια και έχουν μαλακό δέρμα με κοκκία, το οποίο μπορεί να φέρει και διογκωμένα φυμάτια. Τα περισσότερα είναι νυκτόβια, αν και σε θερμότερες περιοχές μπορεί να είναι δραστήρια και κατά τη διάρκεια της ημέρας. Είναι πολύ καλοί αναρριχητές, αφού εκτός από νύχια φέρουν συνήθως και μια σειρά από κολλώδη εξογκώματα στα άκρα των ποδιών τους.

Το *M. kotschy* φθάνει τα 135mm μέγιστο συνολικό μήκος σώματος. Η ουρά έχει μήκος λίγο μεγαλύτερο από το κυρίως σώμα. Έχει κεφάλι πλατύ και επίπεδο που ξεχωρίζει από το λαιμό. Τα δάκτυλά του είναι λεπτά και κυρτά και δεν φέρουν κολλώδη εξογκώματα. Στην πλάτη έχει συνήθως 8-12 επιμήκειες σειρές από καρινωτές φολίδες που συνεχίζουν στην ουρά. Ο χρωματισμός του ποικίλλει από ανοιχτό γκρι, κιτρινοκαφέ έως σκούρο καφέ και γκρι μαύρο. Συνήθως στην πλάτη έχει εγκάρσιες κυματιστές σκούρες ραβδώσεις. Το ζώο μπορεί να αλλάζει το χρωματισμό του ανάλογα με τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Τη νύχτα είναι συνήθως ανοιχτόχρωμα, ενώ κάτω από τον ήλιο σκουρόχρωμα. Επίσης, όταν αψιμαχούν για λόγους χωροκρατικότητας αλλάζουν χρώμα. Η κοιλιακή πλευρά είναι άσπρη γκρι έως έντονα κίτρινη ή πορτοκαλί (Beutler, 1981).

1.2.1. Περιοχή Εξάπλωσης

Η περιοχή εξάπλωσης του είδους (εικόνα 1.1), ξεκινώντας από τα Δυτικά, περιλαμβάνει, τη ΝΑ Ιταλία, τα Νότια Βαλκάνια (Αλβανία, π.Γ.Δ. Μακεδονίας, Βουλγαρία, Ελλάδα), τα νησιά του Αιγαίου πελάγους, τις νότιες ακτές της Κριμαίας, την Τουρκία μέχρι τα σύνορα με την Γεωργία στα βόρεια και μέχρι τα σύνορα με Ιράν στα ΝΑ, τη Συρία, το Λίβανο, το Ισραήλ και την Κύπρο (Beutler, 1981). Η εξάπλωση του είδους δεν είναι συνεχής σε όλη την περιοχή κατανομής. Στα Βαλκάνια εξαπλώνεται κυρίως σε παράκτιες και χαμηλού υψομέτρου περιοχές. Απαντάται σε παράκτιες περιοχές της Αλβανίας και της Δυτικής Ελλάδας και παρακάμπτοντας τον ορεινό όγκο

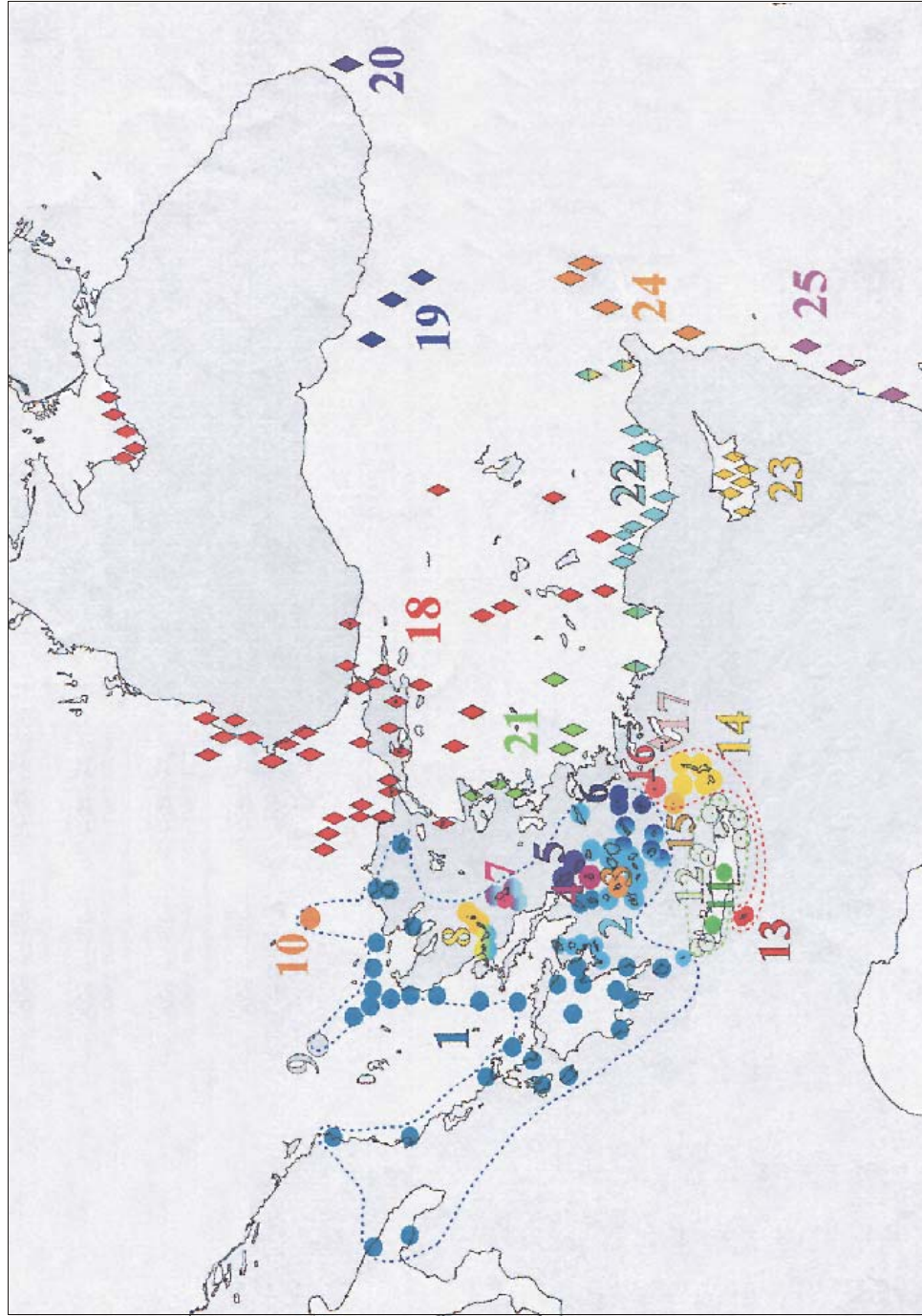
της Πίνδου συνεχίζει στις ανατολικές ακτές των Βαλκανίων μέχρι τη Βάρνα της Βουλγαρίας. Στις κοιλάδες των ποταμών Έβρου, Στρυμόνα και Αξιού φθάνει βορειότερα, έως τα βουνά των Κεντρικών Βαλκανίων (Beutler & Gruber, 1977 και αναφορές εντός). Νότια, απαντάται σε πολλές περιοχές της Πελοποννήσου. Οι περιοχές εύρεσης του είδους στη Βαλκανική είναι γενικά απομονωμένες και χρειάζονται περισσότερες πανιδικές μελέτες ώστε να συμπληρωθεί με περισσότερη ακρίβεια ο χάρτης κατανομής.

Τελείως διαφορετική από τη χέρσο εμφανίζεται η κατάσταση στα νησιά του Αιγαίου, για τα οποία υπάρχουν πάρα πολλές αναφορές. Εδώ η εξάπλωση είναι σχεδόν χωρίς απουσία (Gruber & Fuchs, 1977; Beutler & Gruber, 1977). Στα μικρά και μεσαίου μεγέθους νησιά το είδος αφθονεί. Στα μεγάλα νησιά εμφανίζει αραιούς και εντοπισμένους πληθυσμούς ή απουσιάζει. Αυτό οφείλεται προφανώς σε οικολογικούς λόγους (παρουσία θηρευτών και ανταγωνιστών, απουσία κατάλληλων βιοτόπων). Έτσι, σε μεγάλα νησιά όπως η Κρήτη, τα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου (Ρόδος, Κως, κτλ) και τα νησιά του Ιονίου, το είδος εμφανίζει αραιούς και εντοπισμένους πληθυσμούς ή απουσιάζει, ενώ σε πολλές γειτονικές προς αυτά βραχονησίδες απαντάται σε πυκνούς συνήθως πληθυσμούς. Στην Κύπρο, σε αντίθεση με τα άλλα μεγάλα νησιά το είδος αφθονεί.

Στην Τουρκία και τη Μέση Ανατολή η εικόνα είναι κάπως αντίστοιχη με της Βαλκανικής. Υπάρχουν απομονωμένες περιοχές εξάπλωσης και χρειάζονται επισταμένες πανιδικές μελέτες για να διαπιστωθούν τα όρια της κατανομής. Το είδος εξαπλώνεται στη ΒΔ και Δυτική Τουρκία, στις νότιες περιοχές, στην περιοχή των κεντρικών λιμνών και σε μια περιοχή στη ΒΑ Τουρκία στα σύνορα με Γεωργία (Baran & Gruber, 1982)

1.2.2. Στοιχεία Οικολογίας

Βιότοπος: Ο κύριος βιότοπός του είναι μέρη ξηρά, πετρώδη ή βραχώδη με αραιή φρυγανική ή μακκία βλάστηση. Τέτοιοι βιότοποι είναι εκτεταμένοι στα νησιά του Αιγαίου όπου το είδος αφθονεί. Όμως, το *M. kotschyi* καταλαμβάνει μια ποικιλία βιοτόπων σε όλο το εύρος της κατανομής του. Στα βόρεια της κατανομής του απαντάται κυρίως σε ανθρώπινα κτίσματα (σπίτια, αποθήκες). Η συγκεκριμένη επιλογή βιοτόπου έχει παρατηρηθεί στην Κριμαία, Βουλγαρία, π. Γιουγκοσλαβική Δημοκρατία της Μακεδονίας (Beutler 1981 και αναφορές εντός), στη Βόρεια Ελλάδα (Πιερία, Κιλκίς)



ομάδα kotschy

1. *M.k. bibroni*
2. *M.k. saronicus*
3. *M.k. buchholzi*
4. *M.k. kotschy*
5. *M.k. tinensis*
6. *M.k. solerti*
7. *M.k. schultzevstrumi*
8. *M.k. fuchsi*
9. *M.k. skopjensis*
10. *M.k. rumelicus*

ομάδα bartoni

11. *M.k. bartoni*
12. *M.k. wetsteini*

ομάδα oertzeni

13. *M.k. kalypsae*
14. *M.k. oertzeni*
15. *M.k. stepaneki*
16. *M.k. adelphiensis*

17. *M.k. bileki*

ομάδα danilewskii

18. *M.k. danilewskii*
19. *M.k. ponticus*
20. *M.k. colchicus*
21. *M.k. beutleri*
22. *M.k. ciliciensis*
23. *M.k. fitzingeri*
24. *M.k. syriacus*
25. *M.k. orientalis*

Εικόνα 1.1: Χάρτης εξάπλωσης του *Mediodactylus kotschy* και των υποειδών του. Τα υποείδη ομαδοποιούνται σε τέσσερις ομάδες σύμφωνα με τον Beutler (1981). Το υποείδος *M.k. bileki* δεν έχει συμπεριληφθεί σε κάποια από τις ομάδες. Τα σύμβολα αντιστοιχούν σε περιοχές για τις οποίες υπάρχουν αναφορές για την ύπαρξη των αντιστοιχών υποειδών. Σύμβολα με δύο χρώματα αντιστοιχούν σε πληθυσμούς που θεωρούνται ταξινομικά ενδιάμεσοι μεταξύ γειτονικών υποειδών.

και την Πελοπόννησο (προσωπικές παρατηρήσεις), αλλά και σε κάποιες περιοχές της Μέσης Ανατολής. Ειδικά σε περιοχές που απουσιάζουν κατάλληλοι φυσικοί βιότοποι απαντάται αποκλειστικά σε ανθρώπινα κτίσματα. Στην Κριμαία και τη Βουλγαρία απαντάται και εκτός ανθρώπινων ενδιατημάτων, όπως σε περιοχές με φραγκοσυκιές στα νησιά της Μαύρης Θάλασσας. Στις Κυκλάδες εμφανίζει μεγάλες πληθυσμιακές πυκνότητες στις πέτρινες αναβαθμίδες που είναι κατασκευασμένες σε επικλινείς περιοχές για να συγκρατούν το χώμα για καλλιέργειες. Παρ' ότι αποφεύγει περιοχές με δένδρα, στο Ισραήλ (Werner 1966) και τα Άδανα (Beutler 1981) απαντάται σχεδόν αποκλειστικά πάνω σε κορμούς δένδρων (ελιές, χαρουπιές, συκιές, ευκαλύπτους κτλ) αλλά και σε ξύλινους τηλεφωνικούς στύλους. Γενικά, πάντως, χαρακτηρίζεται ως ανθρωπόφοβο είδος (Beutler & Gruber, 1977), σε αντίθεση με τα άλλα είδη σαμιαμιθιών της Ελλάδας (*Hemidactylus turcicus* και *Tarentola mauritanica*) που είναι κυρίως ανθρωπόφιλα.

Δραστηριότητα: Ενώ τα περισσότερα μέλη της οικογένειας των Gekkonidae είναι νυκτόβια (Avery 1982), το *M. kotschy* δραστηριοποιείται κυρίως κατά τη διάρκεια της ημέρας. Για την περιοχή του Κεντρικού και Νότιου Αιγαίου οι Valakos (1989) και Valakos & Vlachopoulos (1989) αναφέρουν ότι το καλοκαίρι το *M. kotschy* δραστηριοποιείται σε δύο περιόδους κατά τη διάρκεια της ημέρας, μία από την ανατολή του ηλίου (6:30 π.μ.) μέχρι τις 10:00 π.μ. και μια δεύτερη λίγο πριν τη δύση του ηλίου (7:00 μ.μ.) έως τις 10:00 μ.μ. Τους μήνες από Νοέμβριο μέχρι Μάρτιο εμφανίζει μία περίοδο δραστηριότητας από τις 10:00 μ.μ. μέχρι τις 4:30 μ.μ.

Το *M. kotschy* όπως όλα σχεδόν τα ερπετά είναι εξώθερμο ζώο και ρυθμίζει τη θερμοκρασία του σώματός του απορροφώντας θερμότητα από το περιβάλλον. Απορροφάει θερμότητα είτε από το υπόστρωμα (κυρίως πέτρες) πάνω στο οποίο κινείται, είτε με την έκθεσή του στον ήλιο (γι αυτό το λόγο μεγάλο μέρος της δραστηριότητας του αναλύσκεται στο να λιάζεται πάνω σε πέτρες). Είναι ευρυθερμικό ζώο καθώς μπορεί να είναι δραστήριο σε θερμοκρασίες σώματος από 9° – 37° C. Η θερμοκρασία του σώματος βρίσκεται σε γραμμική συσχέτιση με τη θερμοκρασία του υποστρώματος και του αέρα και γι αυτό το λόγο κατατάσσεται στην κατηγορία των θερμοπροσαρμοστών (thermoconformer). Έτσι, η θερμοκρασία του περιβάλλοντος καθορίζει άμεσα τη δραστηριότητα του ζώου.

Διατροφή: Το *M. kotschy* τρέφεται κυρίως με αρθρόποδα και ειδικότερα με προνύμφες εντόμων, ισόποδα, αράχνες, θυσάνουρα, κολεόπτερα και μυρμηγκία. (Valakos & Vlachopoulos 1989, Valakos & Polymeni 1990). Η σύνθεση της τροφής του αλλάζει ανάλογα με την εποχή, κυρίως μεταξύ ξηρής και υγρής περιόδου και φανερώνει έναν τροφικό ομοιομορφισμό (Valakos & Vlachopoulos 1989). Την άνοιξη και το καλοκαίρι κύρια τροφή (> 80%) αποτελούν οι προνύμφες εντόμων, ενώ το φθινόπωρο και το χειμώνα το ποσοστό αυτό μειώνεται και αυξάνει η συμμετοχή αραχνών, μυρμηγκιών, ισόποδων. Το *M. kotschy* είναι κυρίως παθητικός θηρευτής (sit and wait predator) όπως φανερώνει το μεγάλο ποσοστό κινητικών ατόμων που αποτελούν τη λεία του.

Αναπαραγωγή: Η περίοδος αναπαραγωγής στην περιοχή του Αιγαίου διαρκεί από το Μάιο έως τον Οκτώβριο και το θηλυκό γεννάει μία φορά, δύο συνήθως αυγά. Τα αυγά έχουν ασβεστολιθικό κέλυφος και εναποτίθενται ελεύθερα ανάμεσα σε πέτρες. Στο Ισραήλ τα αυγά εκκολάπτονται από τον Ιούλιο μέχρι τον Οκτώβριο και η περίοδος επώασης είναι 78-83 μέρες. Στα νησιά του Αιγαίου η επώαση διαρκεί περισσότερο και τα αυγά εκκολάπτονται κυρίως τον Οκτώβριο, αλλά αν επικρατούν κακές καιρικές συνθήκες η εκκόλαση μπορεί να γίνει και την επόμενη άνοιξη (Beutler 1981). Τα νεογέννητα έχουν μήκος 19-22 mm και βάρος 0,2 – 0,4 gr (Beutler 1981, Valakos & Vlachopoulos 1989). Ωριμάζουν σεξουαλικά σε 1-1,5 χρόνο ενώ τον τρίτο χρόνο της ζωής τους φθάνουν το μέγεθος ενήλικου ατόμου. Στο Ισραήλ τα νεογέννητα φθάνουν μέχρι το φθινόπωρο σε μήκος 23-33 mm, το χειμώνα σταματάει η ανάπτυξή τους, το Φλεβάρη ξαναρχίζει και μέχρι το επόμενο φθινόπωρο έχουν μήκος 37-43 mm. Ζώα 3 χρονών έχουν μήκος 43 + mm. Στην Ελλάδα τον πρώτο Απρίλιο μετά τη γέννησή τους φθάνουν σε μήκος μέχρι τα 28 mm ενώ ζώα 1,5 χρόνου έχουν μήκος μεταξύ 32-36 mm. Η μέγιστη διάρκεια ζωής σε αιχμαλωσία υπολογίστηκε ότι είναι 9 χρόνια (Werner 1966, Beutler 1981). Η μακροβιότητα σε φυσικές συνθήκες είναι προφανώς μικρότερη.

Ανταγωνισμός-Θήρευση: Οι κύριοι θηρευτές του *M. kotschy* είναι άλλες πιο μεγαλόσωμες σαύρες (όπως η *Podarcis erhardii* που σε πολλά μέρη στο Αιγαίο βρίσκεται σε συμπατρία με το *M. kotschy*) καθώς και φίδια (όπως η οχιά *Vipera ammodytes*) (Valakos & Vlachopoulos 1989, Beutler 1981). Ως θηρευτές αναφέρονται και οι γάτες όπως και αράχνες της οικογένειας Lycosidae.

Ανταγωνισμός υπάρχει μεταξύ *M. kotschy* και *Hemidactylus turcicus*. Στα νησιά του Αιγαίου το *M.kotschy* βρίσκεται μακριά από ανθρώπινους οικισμούς, ενώ το *Hemidactylus turcicus* απαντάται σχεδόν αποκλειστικά εκεί. Σε περιοχές όπου απουσιάζει το *Hemidactylus turcicus* (Κριμαία, Βουλγαρία, μερικά μέρη της Βόρειας Ελλάδας και της Ανατολίας), το *M. kotschy* απαντάται και σε ανθρώπινα ενδιαιτήματα. Οι Beutler & Gruber (1979) αναφέρουν ότι υπάρχει ανταγωνισμός και με την *Podarcis erhardii* αλλά και με την *Tarentola mauritanica*. Το γεγονός ότι το *M. kotschy* εμφανίζει πολύ μεγάλες πληθυσμιακές πυκνότητες σε μικρά νησιά, απ' όπου απουσιάζουν άλλες σαύρες και φίδια, ενώ σε μεγάλα νησιά και ηπειρωτικές περιοχές εμφανίζει χαμηλές πυκνότητες ή απουσιάζει, ακόμα και όταν υπάρχουν οι κατάλληλοι βιότοποι, φανερώνει ότι ο ανταγωνισμός και η θήρευση είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες που καθορίζουν την κατανομή και την αφθονία του μέσα στα όρια εξάπλωσής του.

Άλλα στοιχεία: Το *M. kotschy*, όπως και άλλα σαμιαμίδια, έχει την ικανότητα να παράγει ήχους. Όταν συλληφθεί παράγει ήχους κινδύνου («ικικ»), ενώ κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής δραστηριότητας και το αρσενικό και το θηλυκό παράγουν ερωτικούς ήχους που συνίστανται από μια σειρά γρήγορα επαναλαμβανόμενων «κλικ» (κλικ-κλικ-κλικ-κλικ-κλικ-κλικ.....) (Frankenberg, 1977).

1.2.3. Η Συστηματική του είδους - Μορφολογική διαφοροποίηση

Η συστηματική θέση του είδους είναι η ακόλουθη:

Φύλο: Χορδωτά (Chordata), Υποφύλο: Σπονδυλόζωα (Vertebrata), Ομοταξία: Ερπετά (Reptilia), Υφομοταξία: Lepidoasauria, Τάξη: Squamata, Υπόταξη: Sauria, Οικογένεια: Gekkonidae, Υποοικογένεια: Gekkoninae, Γένος: *Mediodactylus*, Είδος: *Mediodactylus kotschy*.

Το *M. kotschy*, τις τελευταίες δεκαετίες, έχει καταταγεί διαδοχικά στα γένη *Gymnodactylus*, *Cyrtodactylus*, *Cyrtopodion*. Πολύ πρόσφατα, οι Macey et al. (2000), με τη χρήση αλλοενζυμικών δεδομένων, υποστήριξαν τη μονοφυλία των γενών *Cyrtodactylus*, *Cyrtopodion* και *Mediodactylus* και κατέταξαν το *kotschy* στο γένος *Mediodactylus*. Το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν πολύ λίγα είδη από κάθε γένος ενώ

δεν χρησιμοποιήθηκαν καθόλου άτομα *M. kotschyi*, δεν αποκλείει μια νέα αναθεώρηση του γένους στο άμεσο μέλλον, όταν συγκεντρωθούν περισσότερα μοριακά δεδομένα.

Οι διάφοροι πληθυσμοί του *M. kotschyi* παρουσιάζουν μεγάλη μορφολογική ποικιλομορφία ιδιαίτερα στο χώρο του Αιγαίου. Πολλά νησιά και νησίδες, κυρίως στο νότιο Αιγαίο, φέρουν από έναν ιδιαίτερο πληθυσμό. Διάφοροι ερευνητές έχουν ασχοληθεί με τα συστηματικά προβλήματα του είδους και έχουν προχωρήσει στην περιγραφή υποειδών (Boettger, 1888; Stepanek, 1934, 1937b, 1939; Beutler & Gruber, 1977 κ.ά). Η περιγραφή των υποειδών στηρίζεται κυρίως σε αριθμητικούς χαρακτήρες που αφορούν τη φολίδωση του ζώου. Οι χαρακτήρες αυτοί παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία και επικάλυψη μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών και έτσι καθιστούν τον προσδιορισμό των υποειδών επισφαλή. Κατά καιρούς διάφοροι ερευνητές προχώρησαν σε περιγραφή νέων υποειδών και αναθεώρηση παλαιότερων και έτσι κανείς δεν μπορεί να πει με ακρίβεια πόσα ακριβώς είναι τα προσδιορισμένα υποείδη σήμερα. Οι ερευνητές που ασχολήθηκαν πιο πρόσφατα και πιο συνολικά με τα συστηματικά προβλήματα του είδους είναι οι Beutler & Gruber (1977) και Beutler (1981), που ασχολήθηκαν με τα ευρωπαϊκά υποείδη και οι Baran & Gruber (1982), που ασχολήθηκαν με τα μικρασιατικά υποείδη.

Οι Beutler & Gruber μελέτησαν ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων από 147 πληθυσμούς από την ευρωπαϊκή περιοχή κατανομής του είδους και κατέληξαν στο ότι υπάρχουν 17 ευρωπαϊκά υποείδη. Τα συστηματικά γνωρίσματα στα οποία στηρίχθηκαν αφορούσαν κυρίως το μήκος του σώματος, την απουσία ή παρουσία μηριαίων πόρων στα αρσενικά, τον αριθμό διαφόρων φυματίων και φολίδων της κεφαλής και του σώματος και τη μορφολογία των δακτυλίων της αναγεννημένης ουράς. Ο διαχωρισμός σε υποείδη στηρίχθηκε στην εσωτερική ποικιλότητα κάθε δείγματος. Αν δεν υπήρχε επικάλυψη μεταξύ της εσωτερικής μεταβλητότητας δύο δειγμάτων σε έναν ή περισσότερους χαρακτήρες, κατατάσσονταν ως διαφορετικά υποείδη. Εάν υπήρχε επικάλυψη έστω και σε έναν χαρακτήρα, τα δείγματα τοποθετούνταν στο ίδιο υποείδος. Κάποιοι πληθυσμοί θεωρήθηκαν ως μεταβατικές μορφές μεταξύ γειτονικών υποειδών. Ο Beutler (1981) κατάταξε τα ευρωπαϊκά υποείδη σε τέσσερις ομάδες.

Οι Baran & Gruber (1982), μελέτησαν τους μικρασιατικούς πληθυσμούς του *M. kotschyi* και τελικά αναγνώρισαν την ύπαρξη 7 διαφορετικών υποειδών, που εξαπλώνονται στην Τουρκία και Κύπρο και 2 ομάδων πληθυσμών που θεωρούνται μεταβατικές μορφές. Ο Beutler (1981) αναφέρει ότι όλα τα ασιατικά υποείδη μπορούν να συμπεριληφθούν στην ομάδα υποειδών *danilewskii*.

Παρακάτω δίνονται οι ομάδες υποειδών με τα υποείδη που περιλαμβάνει η κάθε μία και τις περιοχές που αυτά εξαπλώνονται:

1. ομάδα *kotschy*

M. k. kotschy (Steindachner, 1870): Κυκλάδες: Σύρος, Γάιδaros και Ασπρονήσι (κοντά στη Σύρο).

M. k. fuchsi (Beutler & Gruber, 1977): Βόρειες Σποράδες.

M. k. schultzewestrumi (Beutler & Gruber, 1977): Βάλαξα (κοντά στη Σκύρο).

M. k. tinensis (Beutler & Frör, 1980): Τήνος, Άνδρος.

M. k. saronicus (Werner, 1937): Νησιά Αργοσαρωνικού, Δυτικές και Κεντρικές Κυκλάδες, Ικαρία, Αντικύθηρα.

M. k. buchholzi (Beutler & Gruber, 1977): Σίφνος, Κιτριανή (κοντά στη Σίφνο).

M. k. solerii (Wettstein, 1937): Δωδεκάνησα: Αστυπάλαια, Οφιδούσα (Δυτικά της Αστυπάλαιας), Λιβιάδι, Κίναρος, Λεβίθα και Σύρνα.

M. k. rumelicus (Müller, 1939): Plovdiv (Νότια Βουλγαρία).

M. k. bibroni (Beutler & Gruber, 1977): Απουλία (ΝΑ Ιταλία), νότια ηπειρωτικά Βαλκάνια, Κύθηρα, Κύθνος.

M. k. skopjensis (Karaman, 1965): Σκόπια.

2. ομάδα *danilewskii*

M. k. danilewskii (Strauch, 1887): ΒΔ Τουρκία, περιοχή Κιουτάχειας, Αφιόν, Άγκυρας, περιοχή κεντρικών λιμνών, περιοχή Ικονίου (Konya), Κριμαία, Βουλγαρία, Θράκη.

M. k. beutleri (Baran & Gruber, 1981): Δυτική Τουρκία από Αϊβαλί στα βόρεια μέχρι Bodrum στα νότια καθώς και στις γειτονικές νησίδες του Αιγαίου.

M. k. ciliciensis (Baran & Gruber, 1981): Νότια Τουρκία από Antalya στα Δυτικά μέχρι τη Σελεύκεια στα Ανατολικά.

M. k. ponticus (Baran & Gruber, 1982): Βόρεια Τουρκία, περιοχή Tokat, Amasya, Sivas

M. k. colchicus (Nikolskij, 1902): ΒΑ Τουρκία στα σύνορα με Γεωργία στην περιοχή Atvin.

M. k. syriacus (Stepanek, 1937a): Νότια Τουρκία στα σύνορα με Συρία, Συρία.

M. k. fitzingeri (Stepanek, 1937a): Κύπρος

M. k. orientalis (Stepanek, 1937a): Νότια Συρία, Λίβανος, Ισραήλ.

3. ομάδα *bartoni*

M. k. bartonii (Stepanek, 1934): Κρήτη: Ψηλορείτης, Λευκά Όρη.

M. k. wettsteini (Stepanek, 1937a): Μικρονήσι (Κόλπος Μιραμπέλου, Ανατολική Κρήτη), Χρυσή, Μικρονήσι και Κουφονήσι (ΝΑ της Κρήτης).

4. ομάδα *oertzeni*

M. k. oertzeni (Boettger, 1888): Δωδεκάνησα: Κάρπαθος, Σαρία, Κάσος και Αρμάθια (κοντά στην Κάσο).

M. k. stepaneki (Wettstein, 1937): Δωδεκάνησα: Μεγάλο Σοφράνο (Νότια της Αστυπάλαιας).

M. k. adelphiensis (Beutler & Gruber, 1977): Δωδεκάνησα: Δύο Αδελφές και Τρία Νησιά (ΝΑ της Αστυπάλαιας).

M. k. kalypsae (Stepanek, 1939): Γαύδος.

Επιπλέον, στις νησίδες Στρογγυλή και Μάκρη μεταξύ Χάλκης και Ρόδου, περιγράφηκε ένα νέο υποείδος το *M.k. bileki* (Tiedemann & Häupl, 1980).

Με βάση τα όσα αναφέραμε, μπορούν να διακριθούν 25 διαφορετικά υποείδη. Αλλά και αυτός ο αριθμός δεν πρέπει να θεωρείται βέβαιος καθώς ο προσδιορισμός κάποιων από τα υποείδη έχει στηριχθεί σε μικρό αριθμό δειγμάτων, ενώ υπάρχουν και πολλοί πληθυσμοί οι οποίοι δεν έχουν εξεταστεί από ταξινομική άποψη. Επιπλέον υπάρχουν πολλές περιοχές, κυρίως στη Μικρά Ασία, οι οποίες δεν έχουν εξεταστεί με λεπτομέρεια από πανιδική άποψη και έτσι δεν γνωρίζουμε την πλήρη κατανομή του

είδους, όπως και τα γεωγραφικά όρια εξάπλωσης πολλών από τα υποείδη. Στην εικόνα 1.1 φαίνεται η εξάπλωση των υποειδών του *M. kotschy*.

1.3. ΠΑΛΑΙΟΓΕΩΓΡΑΦΙΑ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

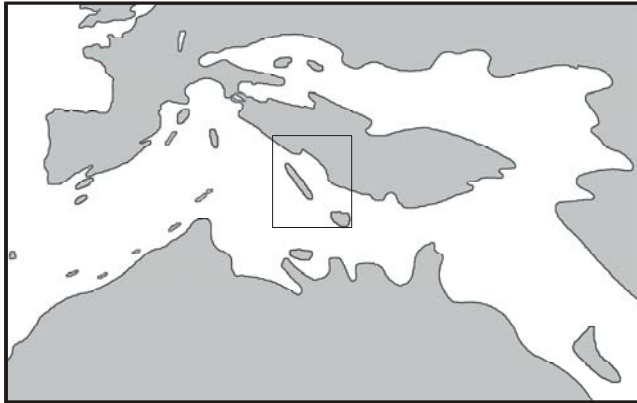
Σ' αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζεται συνοπτικά η παλαιογεωγραφική εξέλιξη της περιοχής των Νοτίων Βαλκανίων, του Αιγαίου και της Μικράς Ασίας, με έμφαση στα γεγονότα που πιθανώς επηρέασαν την κατανομή και τη γεωγραφική διαφοροποίηση των πληθυσμών του *Mediodactylus kotschyi*. Οι γεωλογικές και παλαιοντολογικές πληροφορίες που υπάρχουν μας παρέχουν μια γενική εικόνα της παλαιογεωγραφίας της περιοχής, από το Μειόκαινο μέχρι σήμερα, αλλά δεν είναι επαρκείς ώστε να γνωρίζουμε με βεβαιότητα τις συνδέσεις και τη μορφή των νησιωτικών σχηματισμών στο χώρο του Αιγαίου κατά τις διαδοχικές γεωλογικές περιόδους. Οι παλαιογεωγραφικοί χάρτες που παρουσιάζονται προέρχονται κυρίως από τις εργασίες των Steininger & Rögl (1984), για ότι αφορά την παλαιογεωγραφική εξέλιξη της ευρύτερης περιοχής της Μεσογείου, και των Δερμιτζάκη και Παπανικολάου (1981) και Δερμιτζάκη (1989), για ότι αφορά την περιοχή του Αιγαίου.

Στον Πίνακα 1.1, στο τέλος του παρόντος υποκεφαλαίου για τη διευκόλυνση του αναγνώστη, δίνονται συνοπτικά οι γεωλογικές περίοδοι από το Μειόκαινο μέχρι σήμερα και τα αντίστοιχα κύρια παλαιογεωγραφικά γεγονότα που συνέβησαν στην περιοχή του Αιγαίου.

Τέλη Ολιγοκαίνου – Αρχές Μειοκαίνου (25 – 17 εκ. χρόνια)

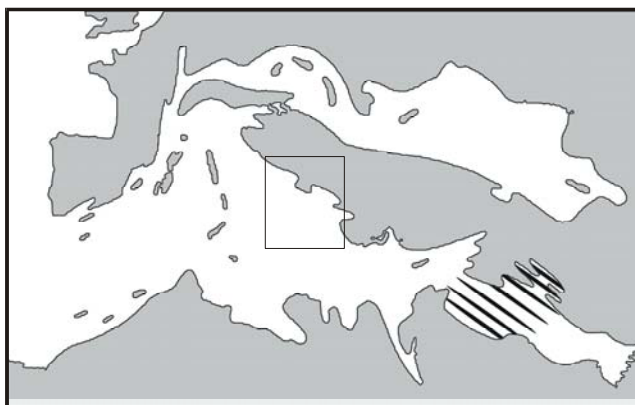
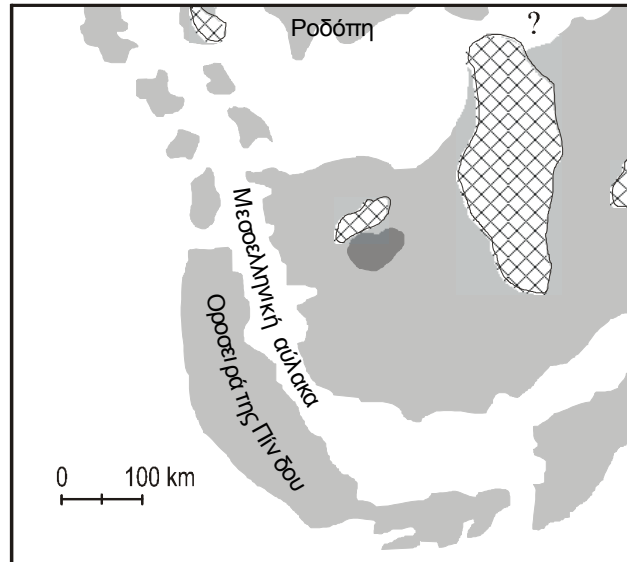
Στις αρχές του Καινοζωικού αιώνα, η περιοχή μεταξύ της Αφρικής και της Ευρασίας καταλαμβάνονταν από μια μεγάλη θάλασσα την Τηθύ, η οποία ένωνε τον Ατλαντικό με τον Ινδικό Ωκεανό. Η κίνηση της Αφρικανικής πλάκας προς Βορά άρχισε να κλείνει την Τηθύ και να προκαλεί την ορογένεση μια αλυσίδας βουνών που περιλαμβάνει τις Άλπεις, τις Δειναρίδες, τις Ελληνίδες οροσειρές και τα βουνά του Ταύρου. Ως αποτέλεσμα της ανύψωσης των βουνών αυτών, η Τηθύς χωρίστηκε σε δύο εσωτερικές θάλασσες: τη Μεσόγειο και την Παρατηθύ. Μεταξύ της Ανατολικής Μεσογείου και της Παρατηθύς, οι Steininger & Rögl (1984) υποθέτουν ότι υπήρχε μια μεγάλη ηπειρωτική περιοχή που εκτείνονταν από τη Γιουγκοσλαβία μέχρι τη σημερινή Τουρκία (εικόνα 1.2). Στην περιοχή του Αιγαίου η αναδύομενη οροσειρά της Πίνδου χωρίζονταν από την περιοχή αυτή με τη μεσοελληνική αύλακα (Δερμιτζάκης και

ΤΕΛΗ ΟΛΙΓΟΚΑΙΝΟΥ - ΑΡΧΕΣ ΜΕΙΟΚΑΙΝΟΥ







Εικόνα 1.2: Παλαιογεωγραφικός χάρτης της Μεσογείου κατά τα τέλη Ολιγοκαίνου (25-23 εκ. χρ. πριν) (τροποποιημένος, από Steininger & Rogl, 1984). Το τετράγωνο υποδεικνύει την ευρύτερη περιοχή του Αιγαίου.

Εικόνα 1.3: Παλαιογεωγραφικός χάρτης της Ελλάδας κατά το Ακουϊτάνιο (~23 εκ. χρ. πριν) (τροποποιημένος, από Δερμιτζάκη, 1989)



Εικόνα 1.4: Παλαιογεωγραφικός χάρτης της Μεσογείου κατά το κατώτερο Μειόκαινο (20 - 17 εκ. χρ. πριν) (τροποποιημένος, από Steininger & Rogl, 1984). Το τετράγωνο υποδεικνύει την ευρύτερη περιοχή του Αιγαίου.

Υπόμνημα	 ξηρά	 θάλασσα
	 λίμνη	 ηφαιστειακό τόξο

Παπανικολάου, 1981) (εικόνα 1.3). Περίπου 20 εκ. χρόνια από σήμερα, η σύγκρουση της Αραβικής πλάκας με την Ευρασιατική προκάλεσε την ένωση της προαναφερθείσας ηπειρωτικής περιοχής με την Ασία και παράλληλα την απομόνωση της Παρατηθούς από τη Μεσόγειο (εικόνα 1.4).

Μέσο Μειόκαινο (17 – 12 εκ. χρόνια)

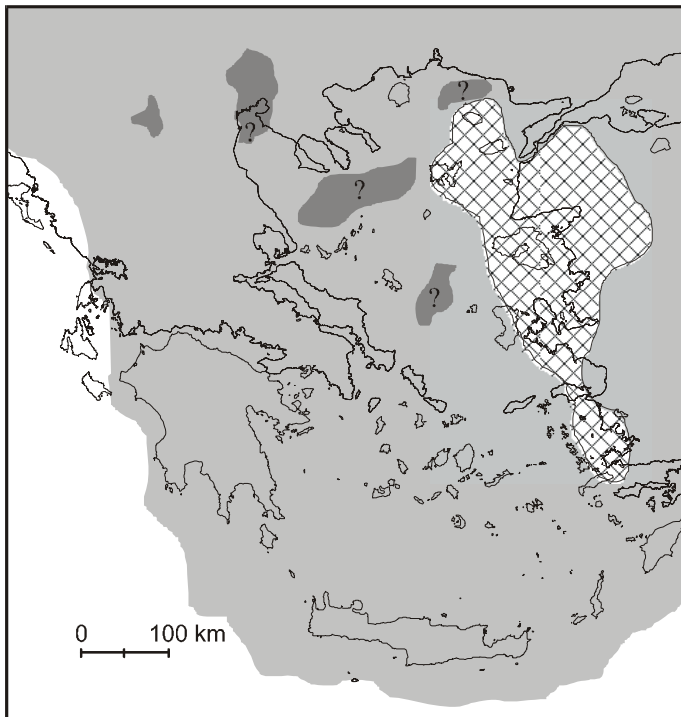
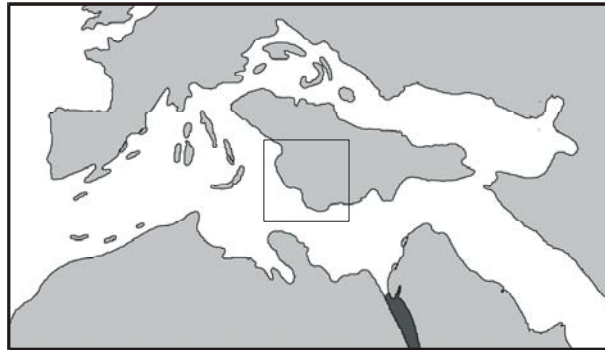
Κατά την περίοδο αυτή τα Βαλκάνια, ο χώρος του Αιγαίου και η Μικρά Ασία αποτελούν μια ενιαία ηπειρωτική περιοχή (εικόνα 1.5). Το νοτιότερο τμήμα της περιοχής αυτής ονομάστηκε από τον Phillipson (1898) Αιγαίδα (εικόνα 1.6). Στις αρχές του μέσου Μειοκαίνου όλη αυτή η περιοχή περιβάλλεται από θάλασσα. Στη συνέχεια αποκτά χερσαίες συνδέσεις με την Ασία και την Κεντρική Ευρώπη, λειτουργώντας έτσι ως γέφυρα που επιτρέπει εκτεταμένες ανταλλαγές πανίδας θηλαστικών (εικόνα 1.7). Από εκείνη την περίοδο και μετά η Παρατηθός αποκόπτεται οριστικά από την Μεσόγειο εκτός από μια περιοδική σύνδεση που διατηρείται μέσω των Δαρδανελίων. Προς το τέλος του Μέσου Μειοκαίνου η νότια Αιγαίδα αρχίζει να κατακερματίζεται και να καταβυθίζεται.

Τορτόνιο (Ανώτερο Μειόκαινο, 12 – 7 εκ. χρόνια)

Η επιταχυνόμενη κίνηση της Αραβικής πλάκας έκλεισε τις θαλάσσιες συνδέσεις προς τα Ανατολικά, αποκόπτοντας τη Μεσόγειο από τον Ινδικό και σταθεροποίησε τη χερσαία σύνδεση με την Ασία (εικόνα 1.8). Ο ευρύς χερσαίος διάδρομος που δημιουργήθηκε επέτρεψε την εξάπλωση της Ασιατικής πανίδας προς την Ευρώπη και όλες τις παραμεσόγειες περιοχές. Στην περιοχή του νότιου Αιγαίου συνεχίζεται ο κατακερματισμός της χέρσου και η καταβύθιση τμημάτων του, ενώ η θάλασσα εισχωρεί μέχρι το Βόρειο Αιγαίο και χωρίζει τις Κυκλάδες και την Ηπειρωτική Ελλάδα από την Μικρά Ασία. Στα νότια, η Κρήτη αποκόπτεται από την ηπειρωτική Ελλάδα και εμφανίζεται ως νησί, ενώ ως νησί εμφανίζεται και το συγκρότημα Κάσου-Καρπάθου (εικόνα 1.9). Ο Δερμιτζάκης (1989) αναφέρει ότι καθ' όλη τη διάρκεια του Τορτονίου και του Μεσσηνίου πρέπει να υπήρχαν περιοδικές διασυνδέσεις μεταξύ της Μεσογείου και του Β. Αιγαίου, χωρίς ωστόσο να δημιουργούν ένα γεωγραφικό φράγμα που να εμποδίζει τη μετανάστευση θηλαστικών από τη Μικρά Ασία είτε προς το Νότιο

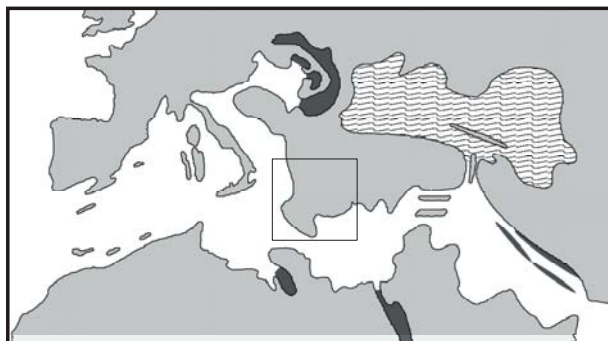
ΜΕΣΟ ΜΕΙΟΚΑΙΝΟ







Εικόνα 1.5: Παλαιογεωγραφικός χάρτης της Μεσογείου κατά το μέσο Μειόκαινο (16.8-16.0 εκ. χρ. πριν) (τροποποιημένος, από Steininger & Rogl, 1984). Το τετράγωνο υποδεικνύει την ευρύτερη περιοχή του Αιγαίου.



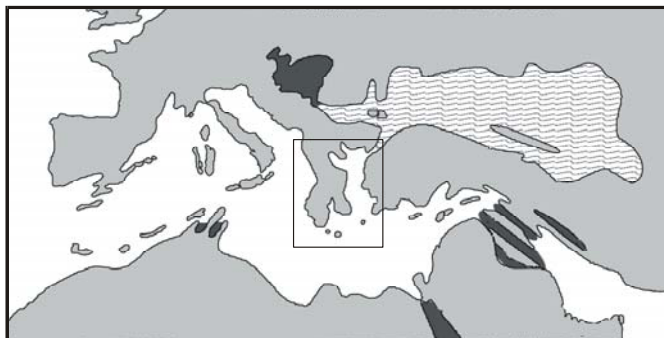
Εικόνα 1.6: Παλαιογεωγραφικός χάρτης της Ελλάδας κατά το μέσο Μειόκαινο (~ 17 εκ. χρ. πριν) (τροποποιημένος, από Δερμιτζάκη & Παπανικολάου, 1981).

Εικόνα 1.7: Παλαιογεωγραφικός χάρτης της Μεσογείου κατά το μέσο Μειόκαινο (15.0-14.5 εκ. χρ. πριν) (τροποποιημένος, από Steininger & Rogl, 1984). Το τετράγωνο υποδεικνύει την ευρύτερη περιοχή του Αιγαίου.

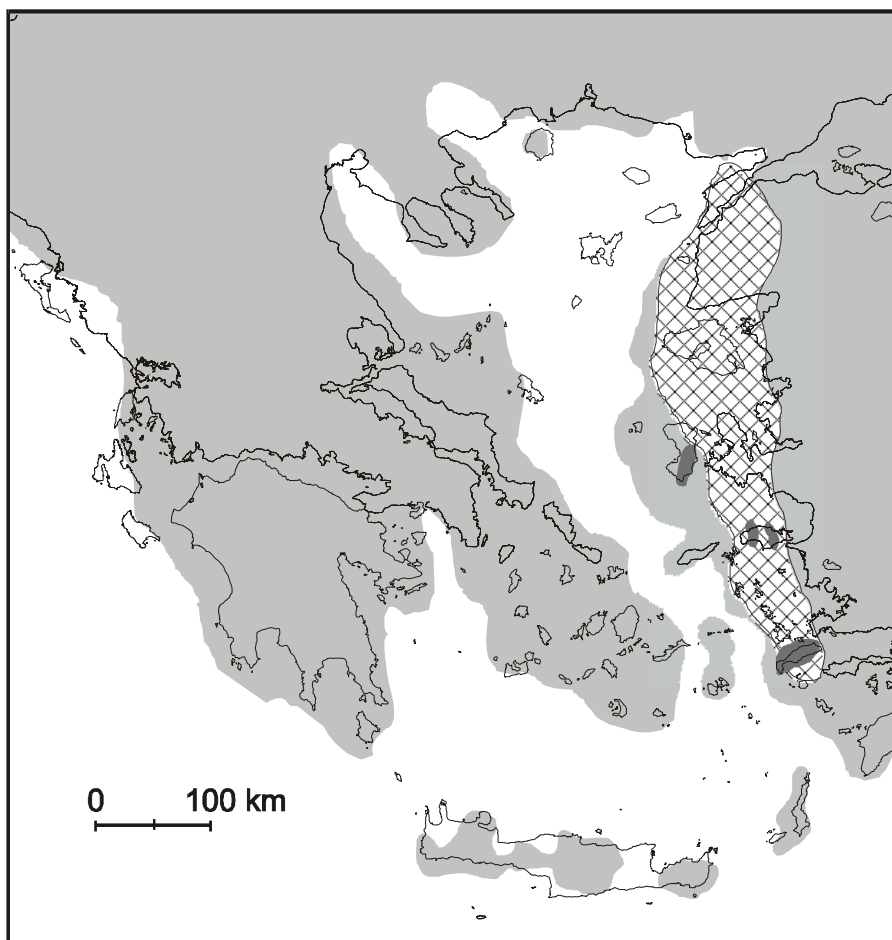


Υπόμνημα	 ξηρά	 θάλασσα	 ηφαιστειακό τόξο
	 λίμνη	 εβαπορίτες	 υφάλμυρα νερά

ΑΝΩΤΕΡΟ ΜΕΙΟΚΑΙΝΟ



Εικόνα 1.8: Παλαιογεωγραφικός χάρτης της Μεσογείου κατά το ανώτερο Μειόκαινο (12.0-11.0 εκ. χρ. πριν) (τροποποιημένος, από Steininger & Rogl, 1984). Το τετράγωνο υποδεικνύει την ευρύτερη περιοχή του Αιγαίου.



Εικόνα 1.9: Παλαιογεωγραφικός χάρτης της Ελλάδας κατά το ανώτερο Μειόκαινο (Τορτόνιο, ~ 8 εκ. χρ. πριν) (τροποποιημένος, από Δερμιτζάκη & Παπανικολάου, 1981).

Υπόμνημα	ξηρά	θάλασσα	ηφαιστειακό τόξο
	λίμνη	εβαπορίτες	υφάλμυρα νερά

Αιγαίο (Κρήτη), είτε προς το Κεντρικό Αιγαίο (Σάμος, Χίος, Ψαρά, Σκύρος, Εύβοια, Αττική), είτε προς το Βόρειο Αιγαίο (Β. Σποράδες, Θεσσαλία, Θεσσαλονίκη). Η Κρήτη πρέπει να διατήρησε χερσαίες συνδέσεις μέχρι και πριν 10 εκ. χρόνια, όπως φανερώνει η ισορροπημένη ηπειρωτική πανίδα εκείνης της περιόδου που βρέθηκε στο νησί (Δερμιτζάκης, 1990). Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου του ανώτερου Μειοκαινού, η παλαιά ηπειρωτική χέρσος του Αιγαίου σχηματίζει ένα αρχιπέλαγος, στο οποίο οι μεταναστευτικές γέφυρες ξηράς (των οποίων η γεωγραφία παραμένει αδιευκρίνιστη) μεταξύ Μ. Ασίας και Ελλάδας έκαναν δυνατή την άφιξη στη σημερινή Ελληνική ηπειρωτική χέρσο ενός μεγάλου αριθμού μεταναστών της Ασιατικής στέπας, καθώς και πολλών αφρικανικών στοιχείων.

Μεσσηνίο (Ανώτερο Μειόκαινο, 7-5,3 εκ. χρόνια)

Στις αρχές του Μεσσηνίου, λόγω τεκτονικών γεγονότων τα στενά του Γιβραλτάρ κλείνουν και έτσι διακόπτεται η σύνδεση της Μεσογείου με τον Ατλαντικό. Το γεγονός αυτό ενισχύθηκε από ένα πιθανολογούμενο, ραγδαίο και ευρείας κλίμακας, παγετωνικό συμβάν στην Ανταρκτική, που ταπεινώσε το επίπεδο της θάλασσας περισσότερο από 40 μέτρα. Έτσι, η Μεσόγειος γίνεται μια κλειστή θάλασσα, αρχίζει να αποξηραίνεται και μετατρέπεται σταδιακά σε μια σειρά από υπεράλμυρες λίμνες που περιορίζονται στα βαθύτερα τμήματα της λεκάνης. Μεγάλα τμήματα της αποξηραμένης μεσογειακής λεκάνης μετατράπηκαν σε μια αλμυρή έρημο, ενώ στα ανώτερα τμήματα η απόπλυση του αλατιού από τις βροχές προφανώς επέτρεψε την εποίκισή τους από τις γειτονικές χερσαίες βιοκοινότητες (εικόνα 1.10). Το δραματικό αυτό γεωλογικό γεγονός ονομάστηκε κρίση αλατότητας του Μεσσηνίου (Hsü, 1972; Hsü et al., 1977). Τελευταίες έρευνες δείχνουν ότι η κρίση αλατότητας του Μεσσηνίου δεν ήταν ένα μοναδικό αδιάλειπτο γεγονός. Κατά περιόδους, η Μεσόγειος ανακτούσε για σύντομα χρονικά διαστήματα τη σύνδεσή της με τον Ατλαντικό και επαναπλημμύριζε. Κατά τη διάρκεια της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου, τα τμήματα της Αιγαίδας πρέπει να απέκτησαν ξανά χερσαίες συνδέσεις μεταξύ τους. Η Κρήτη πρέπει να ενώθηκε προς τα δυτικά με την ηπειρωτική Ελλάδα και προς τα Ανατολικά, μέσω της Κάσου-Καρπάθου με τη Μικρά Ασία. Μεταξύ των Κυκλάδων και της Κρήτης διατηρήθηκαν οι θαλάσσιες συνθήκες που είχαν δημιουργηθεί από τα τέλη του Σερραβάλλιου (12 εκ. χρόνια). Η

κρίση αλατότητας διήρκεσε για περίπου 600.000 χρόνια, από 5.96 – 5.33 εκ. χρόνια πριν από σήμερα (Krijgsman et al., 1999). Πριν από 5.33 εκ. χρόνια τα στενά του Γιβραλτάρ



Εικόνα 1.10: Παλαιογεωγραφικός χάρτης της Μεσογείου κατά την κρίση της αλατότητας του Μεσσηνίου (6.0 – 5.5 εκ. χρ. πριν) (τροποποιημένος, από Steininger & Rogl, 1984).

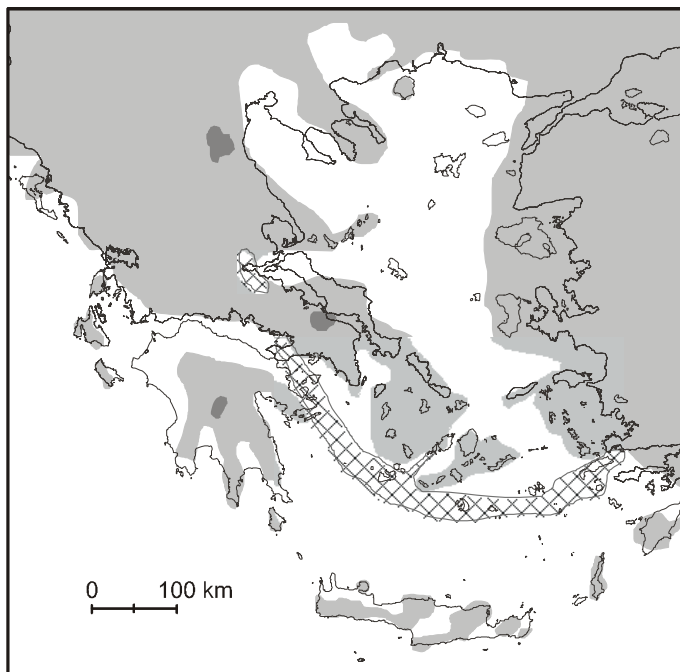
άνοιξαν και η Μεσόγειος επαναπλημμύρισε. Το Μεσσηνίο της Μεσογείου χαρακτηρίζεται ως μια περίοδος έντονης τεκτονικής δραστηριότητας.

Πλειόκαινο (5.3 – 1.8 εκ. χρόνια)

Η αρχή του Πλειοκαίνου σηματοδοτείται από την αποκατάσταση των θαλάσσιων συνθηκών σε ολόκληρη τη Μεσόγειο (εικόνα 1.11). Στην περιοχή του Αιγαίου, η Κρήτη απομονώνεται οριστικά από τις γειτονικές ηπειρωτικές περιοχές. Κατά τη διάρκεια του Πλειοκαίνου, δεν αποτελεί ενιαίο νησί αλλά συγκρότημα μικρότερων νησιών που χοντρικά αντιστοιχούν στους σημερινούς ορεινούς όγκους (Dermitzakis, 1987). Η Πελοπόννησος εμφανίζεται και αυτή ως νησί και χωρίζεται από την ηπειρωτική Ελλάδα μέσω του Κορινθιακού κόλπου (εικόνα 1.12). Στην περιοχή των Κυκλάδων σχηματίζονται θαλάσσιοι διάυλοι που διασπούν την ενιαία ξηρά. Σύμφωνα με τους Anastasakis & Dermitzakis (1990), οι κεντρικές και νότιες Κυκλάδες (Πάρος, Νάξος, Σίφνος, Μήλος, Αμοργός, Φολέγανδρος, Ίος, Σαντορίνη) είναι ενωμένες μεταξύ τους και χωρίζονται με θαλάσσιο διάυλο από τις βόρειες Κυκλάδες (εικόνα 1.13). Η ενιαία αυτή στεριά πιθανώς να συνδέονταν με τη χερσόνησο της Αργολίδας. Οι βορειοδυτικές Κυκλάδες (Άνδρος, Τήνος, Μύκονος, Δήλος) παραμένουν ενωμένες με τη

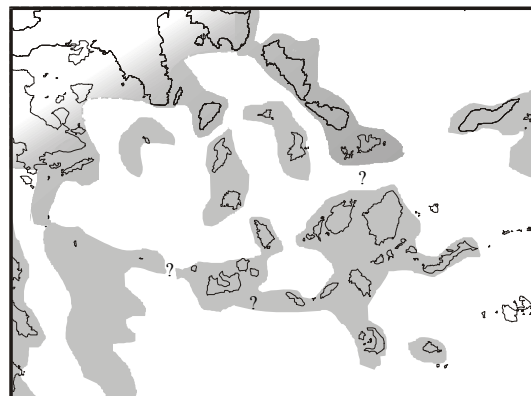
ΠΛΕΙΟΚΑΙΝΟ

Εικόνα 1.11: Παλαιογεωγραφικός χάρτης της Μεσογείου κατά το μέσο Πλειόκαινο (3.5-3.0 εκ. χρ. πριν) (τροποποιημένος, από Steiningger & Rogl, 1984). Το τετράγωνο υποδεικνύει την ευρύτερη περιοχή του Αιγαίου.








Εικόνα 1.12: Παλαιογεωγραφικός χάρτης της Ελλάδας κατά το Πλειόκαινο (~3,5 εκ. χρ. πριν) (τροποποιημένος, από Δερμιτζάκη & Παπανικολάου, 1981).

Εικόνα 1.13: Παλαιογεωγραφική διαμόρφωση των Κυκλάδων κατά το ανώτερο Πλειόκαινο - κατώτερο Πλειστόκαινο (τροποποιημένο, από Anastasakis et al., 1990).



Υπόμνημα

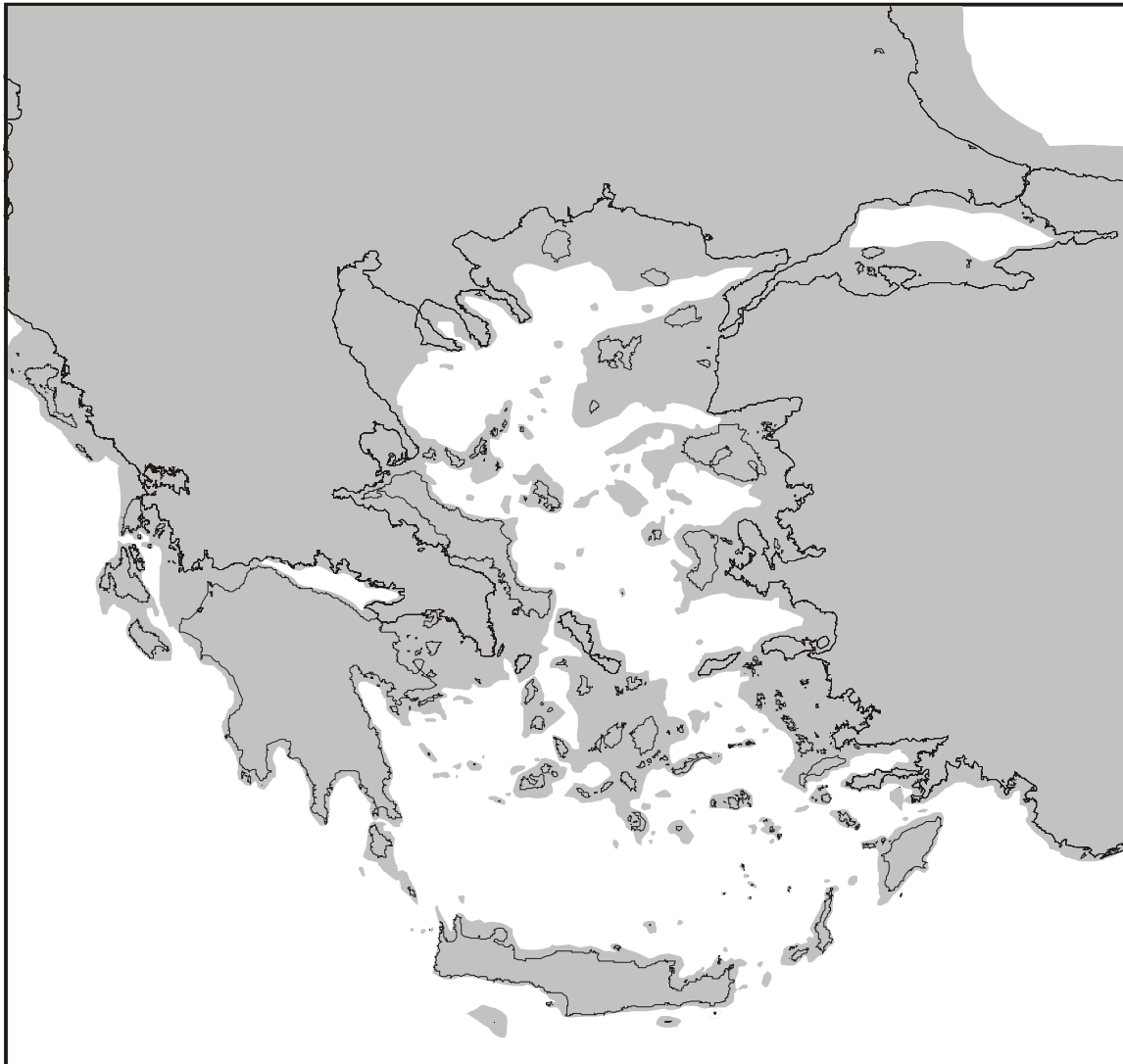
	ξηρά		ηφαιστειακό τόξο		θάλασσα
	λίμνη		υφάλμυρα νερά		

Νότια Εύβοια και μέσω αυτής με την ηπειρωτική Ελλάδα. Η Κύθνος με τη Σέριφο και η Γυάρος με τη Σύρο εμφανίζονται ως δύο ανεξάρτητα νησιά. Η Ρόδος και η Κάρπαθος είναι ενωμένες με την Μικρά Ασία στις αρχές του Πλειοκαίνου (Daams & Van de Weerd, 1980). Η Ρόδος εξακολουθεί να παραμένει ενωμένη μέχρι το Ανώτερο Πλειόκαινο, ενώ η Κάρπαθος σχεδόν βυθίστηκε εντελώς και αποκόπηκε από τη στεριά (Böger & Demitzakis, 1985). Η σύνδεση Καρπάθου-Ρόδου έσπασε κατά το μέσο ή ανώτερο Πλειόκαινο (Kuss, 1975). Τα υπόλοιπα νησιά του ανατολικού Αιγαίου παραμένουν ενωμένα με τη Μικρά Ασία.

Πλειστόκαινο (1.8 εκ. χρόνια – 10.000 χρόνια)

Το Πλειστόκαινο χαρακτηρίζεται από εναλλασσόμενες παγετώδεις και μεσοπαγετώδεις περιόδους. Η δέσμευση τεράστιων ποσοτήτων νερού κατά τις παγετώδεις περιόδους από τους πάγους και η αποδέσμευσή τους κατά τις μεσοπαγετώδεις είχε ως αποτέλεσμα διαδοχικές ευστατικές κινήσεις (άνοδο και κάθοδο της στάθμης της θάλασσας). Οι ευστατικές κινήσεις προκαλούσαν αντίστοιχη επέκταση ή μείωση των χερσαίων περιοχών και μεταβολή των μεταξύ τους χερσαίων συνδέσεων. Οκτώ τέτοιοι κύριοι ευστατικοί κύκλοι παρατηρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια του Πλειστοκαίνου σύμφωνα με τους Beard et al. (1982). Η μέγιστη πτώση της στάθμης της θάλασσας πρέπει να συνέβηκε κατά την παγετώδη περίοδο Riss (πριν 150.000 χρόνια) και κατά την παγετώδη περίοδο Würm (πριν 18.000 χρόνια). Σύμφωνα με διάφορους ερευνητές, κατά τη Riss είχαμε υποχώρηση της στάθμης της θάλασσας κατά 160m (Kurten, 1972) ή 200m (Butzer, 1971) από το σημερινό επίπεδο, ενώ για τη Würm περίοδο έχει υπολογιστεί με ακρίβεια: 18.000 χρόνια πριν η στάθμη της θάλασσας ήταν 121 ± 5 μέτρα χαμηλότερη από τη σημερινή (Fairbanks, 1989).

Κατά το Πλειστόκαινο τα νησιά του Νότιου Αιγαϊακού τόξου αποκτούν περίπου τη σημερινή τους μορφή. Τα Κύθηρα είναι νησί, με μικρότερη έκταση από τη σημερινή και βρίσκονται πολύ κοντά στην Πελοπόννησο. Πιθανά συνδέονταν με τα Αντικύθηρα κατά τη μέγιστη πτώση της στάθμης της θάλασσας (Κύθηρα και Αντικύθηρα περικλείονται από τη σημερινή ισοβαθή των 200 μέτρων). Η Κρήτη ανυψώνεται και γίνεται ένα ενιαίο νησί με σχήμα περίπου ίδιο με το σημερινό. Η Κάσος και η Κάρπαθος αποτελούν ένα ενιαίο νησί και η Ρόδος αποκόπτεται οριστικά από τη



Εικόνα 1.14: Η περιοχή του Αιγαίου, κατά προσέγγιση, πριν από 150.000 περίπου χρόνια, κατά το μέγιστο της παγετώδους περιόδου Riss. Η σκιασμένη περιοχή αντιστοιχεί στις περιοχές που περικλείονται από την ισοβαθή των 200 μέτρων.

Μικρά Ασία. Τα υπόλοιπα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου παραμένουν ενωμένα με τη Μικρά Ασία. Η Πελοπόννησος συνδέεται με την ηπειρωτική Ελλάδα με νησίδες ξηράς κατά τη διάρκεια του Πλειστοκαίνου. Οι Κυκλάδες ήταν νησιά κατά τη διάρκεια του Μέσου Πλειστοκαίνου αλλά δεν είμαστε βέβαιοι για τις μεταξύ τους συνδέσεις και τις διαμορφώσεις ξηράς και θάλασσας (Δερμιτζάκης, 1990). Η σύνδεση της Άνδρου με την Εύβοια διακόπηκε από ένα στενό θαλάσσιο δίαυλο. Η Κύθνος, η Σέριφος, η Σίφνος και η Μήλος παραμένουν απομονωμένες καθ' όλη τη διάρκεια του ανώτερου Πλειστοκαίνου (Anastasakis & Dermitzakis, 1990). Στον πίνακα 1.2 δίνονται οι εναλλαγές παγετωδών μεσοπαγετωδών περιόδων από το τέλος του Μεσσηνίου μέχρι σήμερα (δεδομένα από Haq et al. 1987). Κάποια παγετωνικά γεγονότα πιθανώς να μην καταγράφηκαν από την παραπάνω μελέτη λόγω έλλειψης δεδομένων.

Αν θεωρήσουμε ότι η γεωμορφολογία της περιοχής του Αιγαίου δεν έχει επηρεαστεί έντονα λόγω τεκτονικών κινήσεων, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι οι περιοχές που περικλείονται από τις ισοβαθείς των 200 και 120 μέτρων, αντιπροσωπεύουν αντίστοιχα τη χέρσο κατά τα μέγιστα των παγετωδών περιόδων του Riss (200.000 χρόνια πριν) και Würm (18.000 χρόνια πριν).

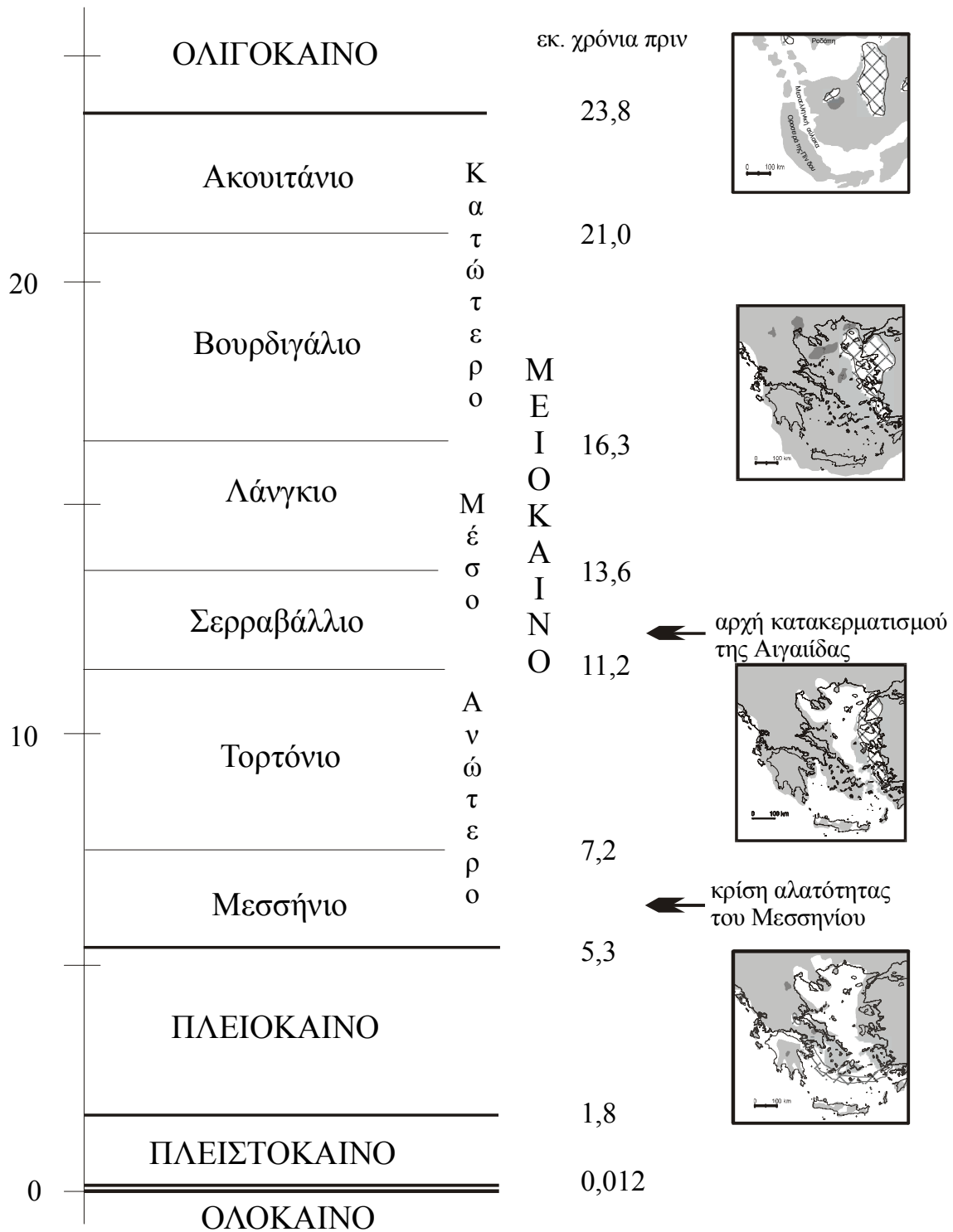
Ολόκαινο (10.000-σήμερα)

Κατά το Ολόκαινο, με την τήξη των πάγων η στάθμη της θάλασσας ανυψώνεται και η περιοχή του Αιγαίου αποκτά σταδιακά τη σημερινή της γεωγραφία. Τα νησιά του ανατολικού Αιγαίου αποκόπτονται από τη Μικρά Ασία και αντίστοιχα τα νησιά του Αργοσαρωνικού από την Πελοπόννησο και την Αττική. Γενικά όλα τα σημερινά νησιά που χωρίζονται με βάθη μικρότερα των 120 μέτρων από γειτονικές ξηρές θεωρούμε ότι απομονώθηκαν μετά το μέγιστο του τελευταίου παγετώνα.

Πίνακας 1.2: Εναλλαγές παγετωδών και μεσοπαγετωδών επεισοδίων από το τέλος του Μεσσηνίου μέχρι σήμερα (δεδομένα από Haq et al. 1987).

Εκ. χρόνια πριν από σήμερα		
Μεσοπαγετώδες επεισόδιο Α	5,9-5,7	Μεσσήνιο
Παγετώδες επεισόδιο Α	5,7-5,2	
Μεσοπαγετώδες επεισόδιο Β1	5,2-4,4	Π λ ε ι ό κ α ι ν ο
Παγετώδες επεισόδιο Β1	4,4-4,3	
Μεσοπαγετώδες επεισόδιο Β2	4,3-4,0	
Παγετώδες επεισόδιο Β2	4,0-3,7	
Μεσοπαγετώδες επεισόδιο Γ	3,7-2,8	
Παγετώδες επεισόδιο Γ	2,8-2,2	
Προπαγετώνας Πλειστοκαίνου	2,2-1,8	
Παγετώδες επεισόδιο Günz	1,8-1,4	
Μεσοπαγετώδες Günz - Mindel	1,4-1,0	
Παγετώδες επεισόδιο Mindel	1,0-0,408	
Μεσοπαγετώδες Mindel - Riss	>0,408-0,191	
Παγετώδες επεισόδιο Riss	0,191-0,130	
Μεσοπαγετώδες Riss - Würm	0,130-0,83	
Παγετώδες επεισόδιο Würm	0,083-0,050	
Würm (Interstadials)	0,050-0,040	
Παγετώδες επεισόδιο Würm	0,040-0,012	Ολόκαινο
Μεσοπαγετώδες Ολοκαίνου	0,012-σήμερα	

Πίνακας 1.1: Χρονολογίες των κύριων γεολογικών περιόδων της Μεσογείου από το Μειόκαινο έως σήμερα. Δεξιά φαίνεται, χοντρικά, η αντιστοιχία των παλαιογεωγραφικών χαρτών του Αιγαίου, οι οποίοι παρατίθενται αναλυτικά στο παρόν κεφάλαιο.



1.4. ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA (MTDNA) ΤΩΝ ΜΕΤΑΖΩΩΝ: ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Τα μιτοχόνδρια είναι τα οργανίδια παραγωγής ενέργειας των ευκαρυωτικών κυττάρων, μέσα στα οποία λαμβάνουν χώρα οι μεταβολικές διεργασίες διάσπασης της γλυκόζης και παραγωγής ATP, μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Περιέχουν το δικό τους DNA ως αποτέλεσμα της προέλευσής τους από ελεύθερα ζώντα α - ροδοβακτήρια που μετατράπηκαν σε ενδοσυμβιώτες ενός αμοιβαδοειδούς κυττάρου, προγόνου των σημερινών ευκαρυωτικών. Η θεωρία αυτή που προτάθηκε αρχικά από τη Margulis (1970) επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια από συγκρίσεις αλληλουχιών γονιδίων ριβοσωμικού RNA (Yang et al. 1985; Cedergren et al. 1988).

Το mtDNA των μεταζώων είναι ένα μικρό, δίκλωνο, κυκλικό, υπερελικωμένο μόριο που περιέχεται σε πολλαπλά αντίγραφα στα μιτοχόνδρια. Εξαίρεση αποτελούν δύο είδη του γένους *Hydra* (Warrior & Gall, 1985) και το πρωτόζωο *Paramecium* (Prichard et al., 1990), που φέρουν γραμμικά μόρια DNA. Το μέγεθός του, τυπικά, κυμαίνεται από 13.000-19.000 βάσεις, με μέσο μήκος γύρω στα 16.500 ζεύγη βάσεων (ανασκοπήσεις από Brown, 1985; Moritz et al., 1987; Saccone et al., 1999). Το μεγαλύτερο γονιδίωμα που έχει εντοπιστεί σε ζώο είναι στο χτένι *Placopecten magellanicus* (42 kb) εξαιτίας της παρουσίας επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και παρουσιάζει μεγάλη ενδοειδική διαφοροποίηση (Snyder, 1987; La Roche et al., 1990). Οι δύο αλυσίδες του mtDNA χαρακτηρίζονται ως ελαφριά L (light) και βαριά H (heavy) αντίστοιχα, και αντανακλούν σημαντικές διαφορές στο περιεχόμενό τους σε Γουανίνη και Θυμίνη (G + T).

Το mtDNA χαρακτηρίζεται από αξιοσημείωτη συντηρητικότητα ως προς το γονιδιακό του περιεχόμενο (Harrison, 1989). Σε όλα τα πολυκύτταρα ζώα που εξετάστηκαν, καθώς και σε μερικά πρωτόζωα, το mtDNA περιλαμβάνει την ίδια ομάδα 37 γονιδίων και συγκεκριμένα 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, 2 γονίδια rRNA και 22 γονίδια tRNA. Τα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, καθορίζουν υπομονάδες ενζύμων που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα και είναι τα ακόλουθα: οι επτά υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6), μια υπομονάδα του κυτοχρώματος b, τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (CO I, II, III) και δύο υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ATPάση 6 και 8). Στο

μιτοχονδριακό DNA υπάρχει και μια, ποικίλου μήκους μεταξύ διαφορετικών ειδών, μη κωδικοποιούσα περιοχή που ονομάζεται περιοχή ελέγχου (D-loop) στα σπονδυλόζωα ή AT – rich περιοχή στα ασπόνδυλα. Η περιοχή αυτή, στα σπονδυλόζωα, βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων tRNA^{pro} και tRNA^{phe} και περιέχει το σημείο έναρξης της αντιγραφής της βαριάς (H) αλυσίδας O_H και τα σημεία έναρξης της μεταγραφής και των δύο αλυσίδων IT_{H1}, IT_{H2} και IT_L (Montoya et al., 1982, 1983; Clayton, 1984; Taanman, 1999). Μελέτες προσδιορισμού της αλληλουχίας ολόκληρου του mtDNA διαφόρων οργανισμών, έδειξαν ότι απουσιάζουν πλήρως τα ιντρόνια από τα γονίδια, ενώ οι μεσογονιδιακές αλληλουχίες είναι γενικά μικρές ή απύσες (Moritz et al., 1987). Το γονιδιακό περιεχόμενο του mtDNA είναι σταθερό στη συντριπτική πλειοψηφία των μεταζώων. Η διάταξη των γονιδίων όμως διαφέρει όσον αφορά συγκρίσεις κυρίως μεταξύ διαφορετικών φύλων (Wilson et al., 1985). Στα Χορδωτά, η οργάνωση των γονιδίων είναι σχετικά σταθερή και παρατηρούνται λίγες μόνο μεταθέσεις που αφορούν κυρίως γονίδια tRNA. Από τις σαύρες (Sauria) μόνο για το είδος *Eumeces egregius lividus* υπάρχει μέχρι στιγμής διαθέσιμο το πλήρες μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Kumazawa, Y. & M. Nishida, 1999). Η γονιδιακή διάταξη είναι ίδια με την τυπική πολλών άλλων σπονδυλωτών, όπως τα πλακουντοφόρα θηλαστικά, οι βάτραχοι και οι οστεϊχθύες.

Στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα των σπονδυλωτών όλα σχεδόν τα γονίδια κωδικοποιούνται από την αλυσίδα H, εκτός από το γονίδιο ND6 και 8 είδη tRNA που κωδικοποιούνται από την αλυσίδα L. Αυτή η μεροληψία ως προς την H αλυσίδα ως κωδικοποιούσας είναι πιο έντονη στα σπονδυλόζωα από ότι στα ασπόνδυλα. Οι τύποι εξελικτικής αλλαγής που παρατηρούνται στο ζωικό mtDNA είναι σχετικά απλές, κυρίως αντικαταστάσεις βάσεων, μικρές ελλείψεις ή προσθήκες και μεταλλαγές μήκους (Brown, 1985; Meyer, 1993). Οι τελευταίες παρατηρούνται κυρίως στις μη κωδικοποιούσες περιοχές.

Ο διπλασιασμός του mtDNA είναι συνεχής, ασύμμετρος και σε μία κατεύθυνση, και έτσι απαιτεί ένα μηχανισμό με λιγότερα ένζυμα απ' ότι ο διπλασιασμός του πυρηνικού DNA. Ο μηχανισμός διπλασιασμού του mtDNA των μεταζώων έχει μελετηθεί κυρίως στα θηλαστικά και σε μικρότερο βαθμό στη *Drosophila*. Ο διπλασιασμός και των δύο αλυσίδων ξεκινάει από ένα προκαθορισμένο σημείο για την κάθε μία και προχωράει προς μία κατεύθυνση χωρίς διακοπή. Αρχικά ξεκινάει η σύνθεση της θυγατρικής της βαριάς (H) αλυσίδας από ένα συγκεκριμένο σημείο της περιοχής ελέγχου (O_H) και εκτείνεται προς την περιοχή του κυτοχρώματος b. Όταν η

συντιθέμενη αλυσίδα φθάσει στην περιοχή έναρξης διπλασιασμού της ελαφριάς αλυσίδας O_L (που βρίσκεται μέσα σε μια ομάδα tRNA) ξεκινάει ο διπλασιασμός της ελαφριάς που προχωράει προς την αντίθετη κατεύθυνση και χρησιμοποιεί την εκτοπισμένη βαριά αλυσίδα ως μήτρα (Clayton, 1982; Taanman, 1999).

Η μεταγραφή ξεκινάει από διαφορετικές θέσεις για τις δύο αλυσίδες. Η μεταγραφή της Η αλυσίδας ξεκινάει από δύο θέσεις μία μέσα στην περιοχή ελέγχου και μία δεύτερη κοντά στο tRNA^{phe}. Η μεταγραφή της L αλυσίδας ξεκινάει από μία μόνο θέση μέσα στην περιοχή ελέγχου. Και οι δύο αλυσίδες μεταγράφονται ως πολυσιστρονικά RNA που στη συνέχεια μετατρέπονται σε tRNA, rRNA και mRNA. Έχει παρατηρηθεί ότι ένα από τα δύο σημεία έναρξης μεταγραφής της βαριάς αλυσίδας ξεκινάει τη μεταγραφή μόνο των rRNAs (Montoya et al., 1982).

Ο γενετικός κώδικας του mtDNA παρουσιάζει αποκλίσεις από τον «παγκόσμιο» πυρηνικό γενετικό κώδικα των ευκαρυωτικών οργανισμών και εμφανίζεται γενικά πιο απλοποιημένος. Μικρές διαφορές υπάρχουν και μεταξύ του μιτοχονδριακού γενετικού κώδικα διαφορετικών οργανισμών (π.χ. μεταξύ σπονδυλοζώων, ζυμών, της *Drosophila*). Οι πιο σημαντικές διαφορές του μιτοχονδριακού γενετικού κώδικα των σπονδυλοζώων σε σχέση με τον πυρηνικό κώδικα είναι η χρήση του κωδικονίου TGA ως κωδικόνιο της τρυπτοφάνης και όχι ως κωδικόνιο λήξης και η χρήση των κωδικονίων AGA/G ως μεθειονίνη και όχι ισολευκίνη (Osawa et al., 1990). Ένα άλλο χαρακτηριστικό του μιτοχονδριακού γενετικού συστήματος, το οποίο σχετίζεται με τον πιο απλοποιημένο γενετικό κώδικα, είναι η χρήση ενός απλοποιημένου μεταφραστικού μηχανισμού, που επιτρέπει την μετάφραση όλων των κωδικονίων από 22 μόνο είδη tRNA, αρκετά λιγότερα από τα τουλάχιστον 32 που απαιτούνται σύμφωνα με τη wobble υπόθεση του Crick. Αυτή η μείωση είναι εφικτή λόγω της χρήσης ενός μόνο είδους tRNA που έχει ουρακίλη (U) στην πρώτη θέση του αντικωδικονίου και έτσι αναγνωρίζει και τα τέσσερα κωδικόνια μιας τετράκις εκφυλισμένης ομάδας κωδικονίων. Για τις περιπτώσεις των δις εκφυλισμένων ομάδων κωδικονίων χρησιμοποιείται μια τροποποιημένη ουρακίλη στην wobble θέση που αναγνωρίζει μόνο πουρίνη στην τρίτη θέση του κωδικονίου. (για αναφορές βλ. Taanman, 1999).

Το mtDNA παρουσιάζει μια σειρά χαρακτηριστικών που το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για εξελικτικές και φυλογενετικές μελέτες. Η μητρική κληρονομικότητα σε συνδυασμό με την απουσία ανασυνδυασμού και το γρήγορο ρυθμό εξέλιξης σε σχέση με το πυρηνικό DNA, έχουν ως αποτέλεσμα οι μιτοχονδριακοί

απλότυποι να παρουσιάζουν μια ιεραρχική δομή, η οποία είναι συνήθως σύμφωνη με την ταξινομικές σχέσεις των οργανισμών.

Τα χαρακτηριστικά αυτά αναλύονται σε συντομία ακολούθως:

Μητρική κληρονομικότητα

Σε όλα σχεδόν τα αμφιγονικά είδη μεταζώων το mtDNA εμφανίζει μόνο μητρική κληρονομικότητα (Kroon et al., 1978; Shitara et al., 1998) και γι' αυτό το λόγο, συνήθως, ένας μόνο τύπος mtDNA βρίσκεται σε έναν οργανισμό (ομοπλασμία). Σε κάποιες περιπτώσεις έχουν διαπιστωθεί και περιπτώσεις ετεροπλασμίας, δηλαδή παρουσία περισσότερων του ενός τύπων mtDNA σε ένα οργανισμό, που μπορεί να οφείλεται σε τυχαία, περιορισμένη πατρική συνεισφορά ή σε μεταλλαγή (ανασκόπηση σε Moritz et al., 1987; Gyllensten et al., 1991). Υπάρχει και η εξαίρεση για τα μύδια της θάλασσας (οικ. Mytilidae)(Zouros et al., 1994; Skibinski et al., 1994) και του γλυκού νερού (οικ. Unionidae)(Waller, 1990) που εμφανίζουν ένα πρότυπο διπλής μονογονεϊκής κληρονομικότητας. Πάντως, σε κάθε περίπτωση, ακολουθώντας δύο γενεαλογικές μιτοχονδριακές γραμμές πίσω στο χρόνο, καταλήγουμε στον κοινό πρόγονο των μορίων αυτών χωρίς παρεμβολές από άλλα γονιδιώματα.

Απουσία ανασυνδυασμού

Μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι το μιτοχονδριακό DNA δεν ανασυνδυάζεται. Η απουσία ανασυνδυασμού σημαίνει ότι οι διαφορές που παρατηρούνται σήμερα στο μιτοχονδριακό DNA δύο εξελικτικών γραμμών αντικατοπτρίζουν τις αλλαγές που συσσωρεύτηκαν μέσω των τυχαίων μεταλλακτικών διεργασιών από τη στιγμή του χωρισμού τους από τον κοινό τους πρόγονο. Όμως τελευταία, πληθαίνουν οι ενδείξεις ότι παρατηρείται ανασυνδυασμός στο mtDNA (Ladoukakis & Zouros, 2001). Μέχρι στιγμής, πάντως, δεν έχει διαπιστωθεί σε τι έκταση συμβαίνει ανασυνδυασμός και πόσο επηρεάζει τα συμπεράσματα των φυλογενετικών μελετών.

Γρήγορος εξελικτικός ρυθμός

Το mtDNA φαίνεται να εξελίσσεται 5-10 φορές ταχύτερα συγκρινόμενο με το μη επαναλαμβανόμενο πυρηνικό DNA (scnDNA, single copy nuclear DNA). Έχουν προταθεί πολλοί λόγοι για να ερμηνεύσουν τον υψηλότερο ρυθμό εξέλιξης του mtDNA, για παράδειγμα ότι η μιτοχονδριακή DNA-πολυμεράση δεν έχει ικανότητα επιδιόρθωσης λαθών, επειδή το mtDNA δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες που εμπλέκονται άμεσα στο

σύστημα αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης (Wilson et al., 1985), ότι πιθανώς τα μιτοχόνδρια δεν έχουν ένα αποτελεσματικό σύστημα απομάκρυνσης των διμερών πυριμιδίνης ή ότι η μεγαλύτερη έκθεση του mtDNA σε οξειδωτικές ουσίες, όπως ρίζες και υπεροξείδια, μπορεί να προκαλεί έναν υψηλότερο ρυθμό μεταλλαγών.

1.5. ΦΥΛΟΓΕΩΓΡΑΦΙΑ

Οι πρώτες μελέτες ανάλυσης των πολυμορφισμών του mtDNA σε ενδοειδικό επίπεδο έδειξαν ότι οι μιτοχονδριακοί απλότυποι εμφανίζονται εντοπισμένοι γεωγραφικά και ότι οι ιεραρχικές τους σχέσεις αντικατοπτρίζουν ιστορικές σχέσεις των αντίστοιχων πληθυσμών (Avise et al., 1979). Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν τον Avise (1987) να ορίσει ένα νέο γνωστικό πεδίο έρευνας, τη Φυλογεωγραφία.

Η Φυλογεωγραφία είναι το πεδίο έρευνας που μελετά τις αρχές και τις διαδικασίες που καθορίζουν τις γεωγραφικές κατανομές των γενεαλογικών γραμμών, σε ενδοειδικό και διαειδικό επίπεδο, ειδικά μεταξύ στενά συγγενικών ειδών. Όπως υποδηλώνει η ετυμολογία της λέξης, η φυλογεωγραφία ασχολείται με τις ιστορικές και φυλογενετικές συνιστώσες της χωρικής κατανομής των γενεαλογικών γραμμών των γονιδίων.

Ως κλάδος της βιογεωγραφίας, η φυλογεωγραφία θέτει υπό ένα διαφορετικό ερμηνευτικό πλαίσιο τις παραδοσιακές οικογεωγραφικές αντιλήψεις, οι οποίες εστίαζαν στο ρόλο των σημερινών οικολογικών πιέσεων για τη διαμόρφωση των γεωγραφικών κατανομών των οργανισμών. Οι φυλογεωγράφοι προσπαθούν να ερμηνεύσουν με ποιο τρόπο και σε τι βαθμό, οι ιστορικές διαδικασίες στη δημογραφία των πληθυσμών, έχουν αφήσει τα εξελικτικά τους αποτυπώματα στις σημερινές γεωγραφικές κατανομές των γονιδιακών χαρακτήρων των οργανισμών. Η φυλογεωγραφία προσφέρει ένα ερμηνευτικό πλαίσιο «ιστορικής» θεώρησης της σημερινής δομής και γεωγραφικής κατανομής των πληθυσμών και όχι με βάση την προσαρμογή των οργανισμών στις τοπικές οικολογικές συνθήκες. Έτσι επεκτείνει και εξισορροπεί τις οικογεωγραφικές αντιλήψεις (Thorpe et al., 1995).

Είναι γεγονός, ότι η εν δυνάμει γεωγραφική κατανομή κάθε ταξινομικής μονάδας (taxon) περιορίζεται από οικολογικούς παράγοντες. Μέσα όμως στη ζώνη οικολογικής ανοχής η πραγματική γεωγραφική κατανομή επηρεάζεται επιπλέον από ιστορικούς παράγοντες. Έτσι η παρουσία ενός είδους σε μια περιοχή είναι αποτέλεσμα ιστορικών δημογραφικών παραγόντων και προτύπων διασποράς. Στη βιογεωγραφία υπάρχουν διάφορα εναλλακτικά ιστορικά σενάρια για την ερμηνεία της γεωγραφικής κατανομής των οργανισμών και των χαρακτηριστικών τους. Δύο ανταγωνιστικά τέτοια σενάρια, που προσπαθούν να ερμηνεύουν τις ασυνεχείς κατανομές συγγενικών

ταξινομικών μονάδων, είναι η υπόθεση της διασποράς (dispersal) και της πλησιόχωρης διαφοροποίησης ή βικαριανισμού (vicariance).

Η υπόθεση της διασποράς υποστηρίζει ότι κάθε ταξινομική μονάδα κατέλαβε τη σημερινή περιοχή κατανομής της μέσω ενεργητικής ή παθητικής διασποράς από ένα βιογεωγραφικό κέντρο προέλευσης, ξεπερνώντας ένα προϋπάρχον γεωγραφικό ή οικολογικό φράγμα (Briggs, 1974). Εναλλακτικά, η βικαριανιστική υπόθεση υποστηρίζει ότι συγγενικοί πληθυσμοί ή ταξινομικές μονάδες διαχωρίστηκαν όταν οι σχετικά συνεχείς κατανομές των προγονικών μορφών διασπάστηκαν λόγω συγκεκριμένων περιβαλλοντικών γεγονότων (Myers and Giller, 1988), όπως π.χ. η διάσπαση μιας ηπειρωτικής περιοχής που διαχώρισε ένα χερσαίο πληθυσμό, η ανύψωση ενός βουνού που απομόνωσε πληθυσμούς που ζουν σε χαμηλά υψόμετρα, ή η υποδιαίρεση μιας μάζας νερού που διαχώρισε υδρόβιες μορφές ζωής.

Η φυλογεωγραφική ανάλυση μπορεί συνήθως να διακρίνει μεταξύ των δύο αυτών εναλλακτικών υποθέσεων. Κάτω από ένα βικαριανιστικό μοντέλο οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των διαχωρισμένων ταξινομικών μονάδων (ή πληθυσμών) θα πρέπει να αντικατοπτρίζουν πιστά τις ιστορικές γεωλογικές σχέσεις μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών που οι ταξινομικές αυτές μονάδες (ή οι πληθυσμοί) καταλαμβάνουν, ενώ στην περίπτωση της διασποράς θα παρατηρούνται ποικίλα πρότυπα. Φυσικά όλα τα συμπεράσματα επηρεάζονται από επιπλέον παράγοντες, όπως η ιστορία της δημογραφίας των πληθυσμών, ο εξελικτικός χρόνος των γεγονότων βικαριανισμού ή διασποράς και η αναλυτική δύναμη των μοριακών ή άλλων μεθόδων που χρησιμοποιούνται.

Το mtDNA είναι το κατεξοχήν μοριακό εργαλείο που έχει χρησιμοποιηθεί σε φυλογεωγραφικές μελέτες. Χαρακτηριστικά, αναφέρει ο Avise (2000) ότι από τις δημοσιευμένες, μέχρι και το 1998, επιστημονικές εργασίες με θέμα την φυλογεωγραφία, το 70 % περιείχαν ανάλυση ζωικού mtDNA. Από νωρίς είχαν γίνει γνωστά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του mtDNA των ζώων που το καθιστούν το πλέον κατάλληλο εργαλείο για φυλογεωγραφικές μελέτες. Η πρώτη άμεση συνέπεια, με φυλογεωγραφική σημασία, των χαρακτηριστικών αυτών, είναι ότι πλέον μπορούμε να χειριστούμε κάθε άτομο (οργανισμό) ως μια λειτουργική ταξινομική μονάδα (Operational Taxonomic Unit – OTU) σε μια φυλογενετική ανάλυση. Μια άλλη συνέπεια είναι ότι οι μιτοχονδριακοί απλότυποι μας επιτρέπουν να καταγράψουμε τις φυλογενετικές σχέσεις των μητρικών γενεαλογικών γραμμών σε διαειδικό και ενδοειδικό αλλά και ενδοπληθυσμιακό επίπεδο. Μ' αυτό τον τρόπο οι φυλογεωγραφικές μελέτες με τη χρήση του mtDNA συνέβαλαν

στο να κλείσει το χάσμα μεταξύ της φυλογενετικής συστηματικής των ανώτερων ταξινομικών μονάδων (ειδών κτλ) και της γονιδιακής γενεαλογίας σε ενδοπληθυμιακό επίπεδο. Με άλλα λόγια πρόσφεραν ένα κοινό πλαίσιο θεώρησης των μακροεξελικτικών και μικροεξελικτικών φαινομένων. Βοήθησαν έτσι στο να συναντηθούν δύο επιστημονικοί κλάδοι που αναπτύχθηκαν ανεξάρτητα, η φυλογενετική συστηματική και η θεωρία της σύμφυσης των γενεαλογικών γραμμών (coalescent theory). Με τον όρο θεωρία της σύμφυσης αναφέρονται τα μαθηματικά και στατιστικά μοντέλα που μελετούν τις γονιδιακές γενεαλογίες μέσα σε ένα είδος και μεταξύ συγγενικών ειδών (Tavare, 1984; Hudson, 1990). Και η φυλογενετική συστηματική και η θεωρία της σύμφυσης μελετούν την ιεραρχική δομή των κλάδων των φυλογενετικών δένδρων, όμως αναπτύχθηκαν χωριστά με ρίζες στην μακρο- και μικρο-εξελικτική ανάλυση αντίστοιχα. Εντούτοις, οι δύο αυτοί κύριοι κλάδοι της εξελικτικής βιολογίας προσφέρουν ομοειδείς φιλοσοφικές θεωρήσεις που αποτελούν τον πυρήνα όλων σχεδόν των μοριακών φυλογεωγραφικών ερμηνειών.

Όταν ένας πληθυσμός χωρίζεται σε δύο απομονωμένους υποπληθυσμούς, τότε οι απλότυποι του αρχικού πληθυσμού (οι οποίοι έχουν συγκεκριμένες γενεαλογικές – φυλογενετικές σχέσεις) μοιράζονται στους δύο υποπληθυσμούς με τυχαίο λίγο πολύ τρόπο. Στους θυγατρικούς πληθυσμούς, με το πέρασμα των γενεών οι απλότυποι υφίστανται, ανεξάρτητα, εντός του κάθε πληθυσμού, τυχαίο διαχωρισμό των γενεαλογικών γραμμών (stochastic lineage sorting). Τρία διαφορετικά φυλογενετικά πρότυπα είναι πιθανό να παρατηρηθούν σε αυτή την περίπτωση:

1) Αμοιβαία μονοφυλία, όπου όλοι οι απλότυποι μέσα σε κάθε θυγατρικό πληθυσμό είναι συγγενικότεροι μεταξύ τους σε σχέση με τους απλοτύπους του άλλου πληθυσμού

2) Πολυφυλία, όπου κάποιοι απλότυποι του ενός πληθυσμού είναι συγγενικότεροι με κάποιους του άλλου πληθυσμού απ' ότι μεταξύ τους

3) Παραφυλία, όταν ενώ όλοι οι απλότυποι του ενός πληθυσμού είναι συγγενικότεροι μεταξύ τους, ορισμένοι απλότυποι του δεύτερου πληθυσμού είναι συγγενέστεροι με κάποιους απλοτύπους του πρώτου πληθυσμού, παρά με τους υπόλοιπους απλοτύπους του δεύτερου πληθυσμού.

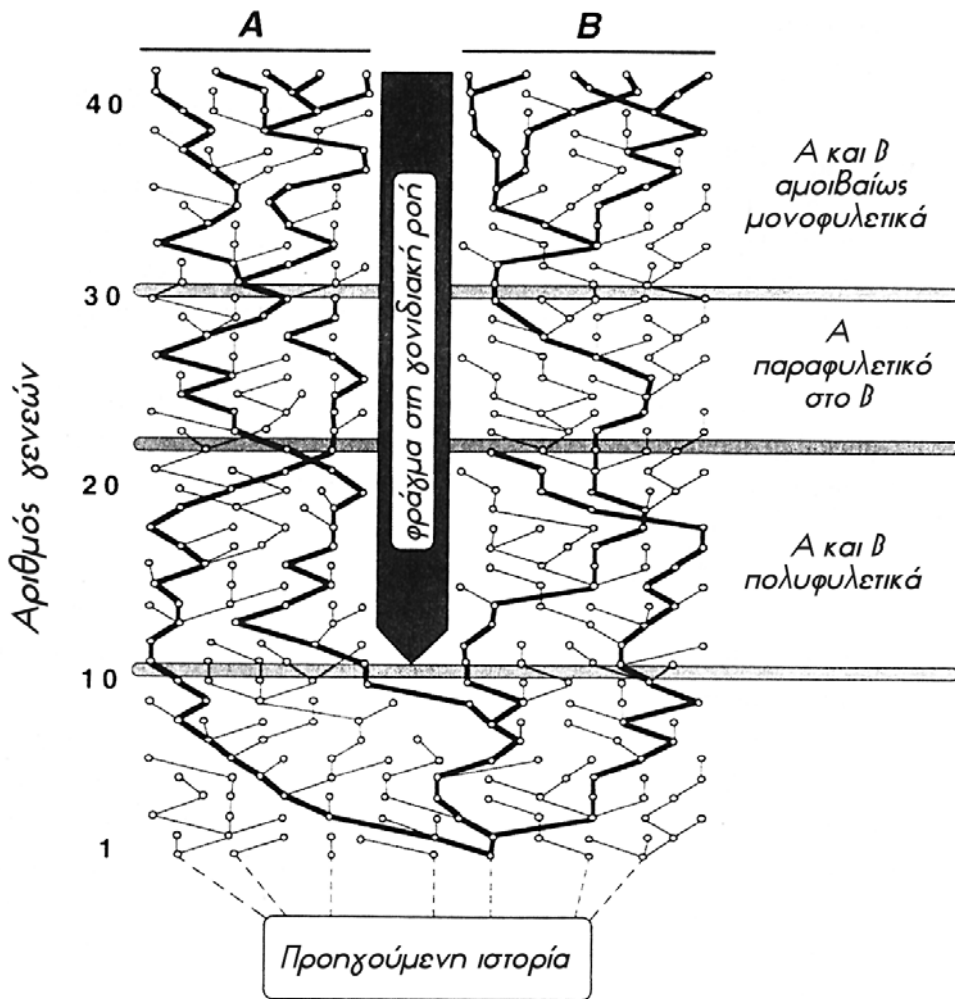
Το επιθυμητό στις φυλογεωγραφικές και φυλογενετικές μελέτες είναι τα αποτελέσματα να ακολουθούν το πρότυπο της αμοιβαίας μονοφυλίας, ώστε οι

φυλογενετικές σχέσεις των γονιδίων (το γονιδιακό δένδρο) να αντικατοπτρίζουν τους ιστορικούς διαχωρισμούς των πληθυσμών (δένδρο πληθυσμών). Οι περιπτώσεις της πολυφυλίας και παραφυλίας δείχνουν πως η τοπολογία ενός γονιδιακού δένδρου μπορεί να διαφέρει στο βασικό πρότυπο διακλάδωσης από την τοπολογία ενός πληθυσμιακού δένδρου. Η ασυμφωνία προκύπτει επειδή κάποιοι διαχωρισμοί κλάδων του γονιδιακού δένδρου φυσιολογικά προηγούνται χρονικά του διαχωρισμού των πληθυσμών.

Δύο πληθυσμοί που διαχωρίζονται συνήθως περνούν διαδοχικά από τις τρεις κατηγορίες φυλογενετικών σχέσεων που αναφέρθηκαν. Όπως φαίνεται στο παράδειγμα (εικόνα 1.15), αρχικά, παρατηρείται πολυφυλία εξαιτίας του τυχαίου διαχωρισμού των απλοτύπων του αρχικού πληθυσμού, στη συνέχεια λόγω τυχαίας εξαφάνισης κάποιων γενεαλογικών γραμμών παρατηρείται παραφυλία και μετά από αρκετές γενιές φθάνουμε στην κατάσταση μονοφυλίας. Οι Neigel και Avise (1986), χρησιμοποιώντας προσομοιώσεις σε υπολογιστή υπολόγισαν την πιθανότητα μονοφυλίας, παραφυλίας και πολυφυλίας, για δύο θυγατρικούς πληθυσμούς σε σχέση με τον αριθμό γενεών από τη στιγμή διαχωρισμού τους από μια καλά αναμειγμένη, προγονική γονιδιακή δεξαμενή (εικόνα 1.16). Υπό ένα μοντέλο ουδετερότητας, ο χρόνος μετάβασης από τη μια κατάσταση στην άλλη είναι συνάρτηση του «θηλυκού» δραστηκού μεγέθους των θυγατρικών πληθυσμών. Η πιθανότητα για πολυφυλία είναι υψηλή όταν ο χρόνος σε οργανισμικές γενιές G είναι μικρότερος του N_e , ενώ η αμοιβαία μονοφυλία είναι πολύ πιθανό ότι θα έχει επιτευχθεί όταν $G > 4N_e$.

Σε πραγματικούς πληθυσμούς η προγονική γονιδιακή δεξαμενή μπορεί να είναι γεωγραφικά δομημένη και οι ιδρυτές των θυγατρικών πληθυσμών μπορεί να αντιπροσωπεύουν ένα περιορισμένο υποσύνολο αυτής της χωρικής ετερογένειας. Αν ένα φράγμα που χωρίζει τους πληθυσμούς είναι σύμφωνο με την προϋπάρχουσα γενετική δομή, τότε στους θυγατρικούς πληθυσμούς επιτυγχάνεται αμέσως μονοφυλία (εικόνα 1.17). Αντιθέτως αν το φράγμα είναι ασύμφωνο, τότε αρχικά οι θυγατρικοί πληθυσμοί θα είναι πολυφυλετικοί. Σ' αυτή την περίπτωση η ασυμφωνία μεταξύ του πληθυσμιακού δένδρου και του γονιδιακού δένδρου θα μπορούσε να διατηρηθεί ή σταδιακά να μετατραπεί σε παραφυλία και μονοφυλία. Αυτό εξαρτάται από ποιες μητρικές γενεαλογικές γραμμές θα επιβίωναν. Τέλος υπάρχει και η περίπτωση το φράγμα να απομόνωνε έναν περιφερειακό πληθυσμό, οπότε ο κύριος γεωγραφικός όγκος του πατρικού πληθυσμού θα ήταν παραφυλετικός σε σχέση με τον περιφερειακό.

Υπάρχει περίπτωση, να προκύψουν πολυφυλετικά ή παραφυλετικά πρότυπα τη μητρική γενεαλογία δύο θυγατρικών πληθυσμών εξαιτίας μιας δευτερογενούς



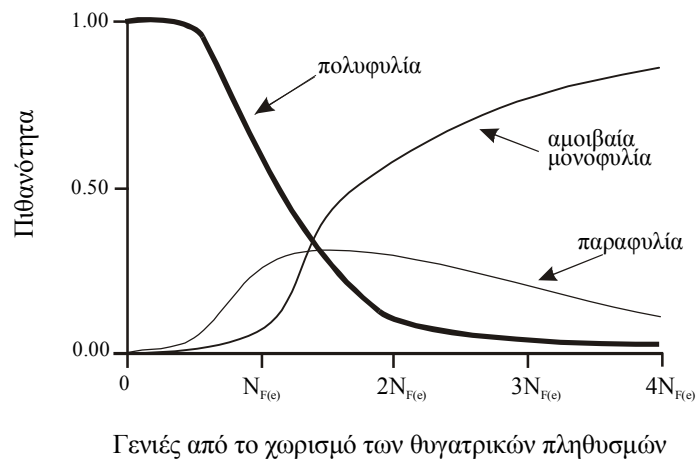
Εικόνα 1.15: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας του διαχωρισμού των μητρικών γενεαλογικών γραμμών σε δύο πληθυσμούς που έχουν διαχωριστεί από ένα μακροχρόνιο και αδιαπέραστο στη γονιδιακή ροή φράγμα. Μετά το διαχωρισμό του προγονικού πληθυσμού στην 11^η γενιά, ο διαχωρισμός των γενεαλογικών γραμμών ήταν τέτοιος ώστε οι απομονωμένοι θυγατρικοί πληθυσμοί Α και Β εμφανίζονται αρχικά πολυφυλετικοί με βάση τη μητρική γενεαλογία, κατόπιν παραφυλετικοί (ο Α σε σχέση με τον Β), και τελικά αμοιβαία μονοφυλετικοί. Οι έντονες γραμμές υποδεικνύουν τις γενεαλογικές γραμμές που υπάγονται στις παραπάνω φυλογενετικές κατηγορίες (από Avise2000).

γονιδιακής ροής μεταξύ τους. Κάποιες φορές είναι δύσκολο να διακρίνουμε μεταξύ αυτών των ανταγωνιστικών υποθέσεων (παραφυλία ή πολυφυλία λόγω του ατελούς διαχωρισμού των γενεαλογικών γραμμών ή λόγω δευτερογενούς γονιδιακής ροής). Εντούτοις, σε αρκετές περιπτώσεις οι δύο αυτές πιθανότητες αφήνουν διακριτά ίχνη στα πρότυπα διάταξης των γενεαλογικών γραμμών.

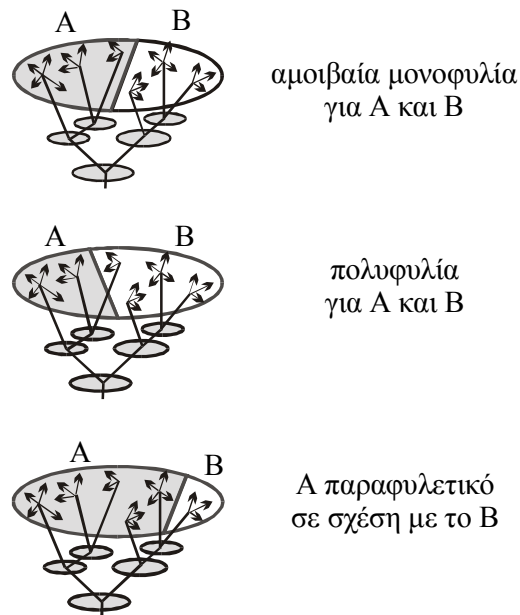
Το mtDNA επιτρέπει την εκτίμηση μιας γονιδιακής φυλογένεσης με ιδιαίτερα σαφή τρόπο, εφόσον αντικατοπτρίζει με πιστότητα την εξέλιξη μιας μητρικής εξελικτικής γραμμής. Χρειάζεται όμως ιδιαίτερη προσοχή όταν με βάση τη γονιδιακή φυλογένεση, προσπαθούμε να εξάγουμε το πληθυσμιακό δένδρο, δηλαδή την εξελικτική ιστορία των οργανισμών. Σ' αυτή την περίπτωση, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, είναι δυνατόν να οδηγηθούμε σε λάθος συμπεράσματα. Χρειάζεται λοιπόν η συμφωνία ανεξάρτητων δεικτών, ώστε να μπορούμε να θεωρήσουμε με αρκετή βεβαιότητα ότι σημαντικοί διαχωρισμοί σε ένα γονιδιακό μιτοχονδριακό διάγραμμα υποδηλώνουν ιστορικές υποδιαίρεσεις σε πληθυσμιακό επίπεδο (Avisé & Ball, 1990).

Ο Avisé (1996) διακρίνει τέσσερις διαφορετικές μορφές γενεαλογικής συμφωνίας στην εξαγωγή φυλογενετικών συμπερασμάτων:

- 1) Συμφωνία μεταξύ των νουκλεοτιδικών χαρακτήρων μέσα σε ένα γονίδιο. Το αποτέλεσμα είναι ότι σημαντικοί κλάδοι του γονιδιακού δένδρου είναι στατιστικά σημαντικοί (π.χ. έχουν υψηλές τιμές bootstrap),
- 2) Συμφωνία μεταξύ σημαντικών γενεαλογικών διαχωρισμών διαφορετικών γονιδιακών δένδρων ενός είδους. Το γεγονός αυτό ενισχύει το ότι οι διαχωρισμοί των γονιδιακών δένδρων καταγράφουν πιστά τους φυλογενετικούς διαχωρισμούς στο επίπεδο του πληθυσμού ή του είδους,
- 3) Συμφωνία στη γεωγραφική κατανομή των κλάδων του γονιδιακού δένδρου για πολλά είδη με παρόμοιες γεωγραφικές κατανομές. Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι υπάρχουν κοινός ιστορικά βιογεωγραφικοί παράγοντες που διαμορφώνουν τις ενδοπληθυσμιακές φυλογενέσεις,
- 4) Συμφωνία των γενεαλογικών διαχωρισμών με τα γεωγραφικά όρια παραδοσιακά αναγνωρισμένων βιογεωγραφικών περιοχών. Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι υπάρχουν κοινός ιστορικά βιογεωγραφικοί παράγοντες που διαμορφώνουν τις ενδοπληθυσμιακές φυλογενέσεις και τις κατανομές των οργανισμών.



Εικόνα 1.16: Οι γενικής μορφής καμπύλες πιθανότητας για αμοιβαία μονοφυλία, πολυφυλία και παραφυλία για δύο θυγατρικούς πληθυσμούς μετά το χωρισμό τους από μια παμμικτική προγονική γονιδιακή δεξαμενή (από Neigel & Avise, 1986). Οι πιθανότητες αυτές είναι συνάρτηση του δραστικού πληθυσμιακού μεγέθους των θυγατρικών πληθυσμών (από Avise 2000).



Εικόνα 1.17: Επίδραση της γεωγραφικής δομής της προγονικής γονιδιακής δεξαμενής στα γενεαλογικά πρότυπα δύο γεωγραφικά απομονωμένων θυγατρικών πληθυσμών A και B. Φαίνεται η γενεαλογική ιστορία των μητρικών γραμμών πριν ένα ταυτόχρονο γεγονός (μαύρη γραμμή) διαχωρίσει τους σύγχρονους πληθυσμούς (από Avise 2000).

Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι τα γονιδιακά δένδρα (ιδιαίτερα του mtDNA) μπορούν να αποκαλύψουν με αρκετή σαφήνεια την ιστορία του διαχωρισμού των πληθυσμών και να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την ιστορική δημογραφία τους, αλλά ταυτόχρονα χρειάζεται προσοχή στην εξαγωγή των σχετικών συμπερασμάτων.

1.5.2. Κατηγορίες φυλογεωγραφικών προτύπων διαφόρων ειδών ζώων.

Ο Avise (2000), συγκεντρώνοντας ένα μεγάλο αριθμό φυλογεωγραφικών μελετών, διακρίνει πέντε κατηγορίες φυλογεωγραφικών προτύπων:

Κατηγορία I: Βαθιά γενεαλογικά δένδρα, οι κύριες γενεαλογικές γραμμές αλλοπατρικές

Αυτό το πρότυπο παρατηρείται μεταξύ πληθυσμών που έχουν χωριστεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Συνήθως αφορά είδη που εξαπλώνονται σε μεγάλες γεωγραφικές περιοχές και έχουν χαμηλή ικανότητα διασποράς και γονιδιακής ροής όπως μικρά χερσαία θηλαστικά, ερπετά, αμφίβια και ψάρια των γλυκών νερών.

Κατηγορία II: Βαθιά γενεαλογικά δένδρα, οι κύριες γενεαλογικές γραμμές ευρέως συμπατρικές

Θεωρητικά, αυτό το πρότυπο μπορεί να παρατηρηθεί σε ένα είδος με μεγάλο N_e και μεγάλη γονιδιακή ροή. Σ' αυτή την περίπτωση κάποιες παλαιά διαχωρισμένες γραμμές μπορεί τυχαία να διατηρηθούν στον πληθυσμό ενώ άλλες ενδιάμεσες να χαθούν με το χρόνο. Εντούτοις, στις περισσότερες περιπτώσεις το πρότυπο αυτό παρατηρείται λόγω δευτερογενούς ανάμιξης πληθυσμών ή ειδών που εξελίχθηκαν σε αλλοπατρία.

Κατηγορία III: Ρηγά γενεαλογικά δένδρα, γενεαλογικές γραμμές αλλοπατρικές

Το πρότυπο αυτό παρατηρείται σε πληθυσμούς που έχουν διαχωριστεί πρόσφατα. Η κατηγορία αυτή σταδιακά μεταπίπτει στις κατηγορίες IV και V, ανάλογα με τα ιστορικά επίπεδα γονιδιακής ροής μεταξύ ομοειδικών πληθυσμών που δεν είχαν διαχωριστεί από σταθερά, μακροχρόνια βιογεωγραφικά φράγματα. Επίσης η κατηγορία III μπορεί να χαρακτηρίζει τοπικούς πληθυσμούς σε είδη που συνολικά παρουσιάζουν το πρότυπο της κατηγορίας I.

Κατηγορία IV: Ρηγά γενεαλογικά δένδρα, γενεαλογικές γραμμές συμπατρικές

Αυτό το πρότυπο αναμένεται σε είδη με υψηλή γονιδιακή ροή και μεσαίο ή μικρό N_e , των οποίων οι πληθυσμοί δεν έχουν διαχωριστεί από μακροχρόνια βιογεωγραφικά φράγματα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του Αμερικανικού χελιού *Anguilla rostrata*.

Κατηγορία V: Ρηγά γενεαλογικά δένδρα, η κατανομή των γενεαλογικών γραμμών ποικίλλει

Το πρότυπο αυτό είναι ενδιάμεσο μεταξύ των κατηγοριών III και IV, και περιλαμβάνει γενεαλογικές γραμμές που είναι γεωγραφικά ευρέως κατανεμημένες συν κάποιες στενά συγγενικές γενεαλογικές γραμμές που είναι γεωγραφικά εντοπισμένες. Αυτό το φυλογεωγραφικό πρότυπο υποδεικνύει χαμηλή ή μεσαία γονιδιακή ροή μεταξύ πληθυσμών που είναι στενά συνδεδεμένοι ιστορικά. Οι κοινοί απλότυποι είναι συνήθως οι προγονικές καταστάσεις (πλεισιομορφικές) ενώ οι σπάνιοι είναι οι υποτιθέμενες παράγωγες (απομορφίες).

1.5.3. Φυλογεωγραφικές μελέτες σε άλλα νησιώτικα συμπλέγματα και στην περιοχή του Αιγαίου

Από το 1987, οπότε και εμφανίστηκε ο όρος Φυλογεωγραφία, μέχρι και τις αρχές του 1999, είχαν δημοσιευθεί περισσότερες από 300 επιστημονικές εργασίες που περιείχαν στον τίτλο τους ή σε λέξεις –κλειδιά τον όρο αυτό (Avise, 2000). Ένα μέρος των εργασιών αυτών αφορά μελέτες σε νησιώτικα αρχιπελάγη, τα οποία από νωρίς έλκυσαν το ενδιαφέρον των φυλογεωγράφων, προφανώς λόγω των ενδημικών μορφών που φιλοξενούν και της σχετικά απλής και συνήθως καλά γνωστής, παλαιογεωγραφικής τους ιστορίας. Οι πιο πολλές έρευνες έχουν γίνει μέχρι σήμερα σε ωκεάνια αρχιπελάγη, όπου τα νησιά (συνήθως ηφαιστειακής προέλευσης) έχουν σχηματιστεί με γνωστή αλληλουχία και χωρίς σύνδεση με τις γειτονικές ηπειρωτικές περιοχές. Τέτοια αρχιπελάγη είναι οι Κανάριες νήσοι (Thorpe et al., 1993 σε σαύρες του γένους *Gallotia*; Juan et al., 1995 σε κολεόπτερα του γένους *Pimelia*; Juan et al. 1996 σε κολεόπτερα του γένους *Hegeter*; Pinto et al., 1997 στη *Drosophila subobscura*; Nogales et al. 1998 σε σαύρες του γένους *Tarentola*; Brown et al., 1998 σε σαύρες του γένους *Chalcides*; Emerson et al., 1999 σε κολεόπτερα του γένους *Calathus*; Rees et al. 2001 σε κολεόπτερα του γένους *Nesotes*), τα νησιά της Χαβάης (De Salle et al., 1987, 1988 σε είδη *Drosophila*), τα νησιά Γκαλάπαγκος (Sequeira et al., 2000 στο ενδημικό γένος κολεοπτέρων *Galapaganus*), οι Σεϋχέλλες (Radtkey 1996, σε σαύρες του γένους *Phelsuma*) και άλλα νησιωτικά συμπλέγματα. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, η εποίκηση των νησιών έχει γίνει μέσω διασποράς από τις γειτονικές ηπειρωτικές περιοχές και μεταξύ των νησιών, και ένας από τους σκοπούς των μελετών αυτών είναι να αποκαλύψουν αυτά τα πρότυπα διασποράς.

Το αρχιπέλαγος του Αιγαίου, αντιθέτως, είναι ένα «ηπειρωτικό» αρχιπέλαγος και η πλειοψηφία των νησιών του ήταν συνδεδεμένα στο παρελθόν με τις γειτονικές ηπειρωτικές περιοχές ή μεταξύ τους. Η σημερινή εξάπλωση των οργανισμών στο χώρο αυτό είναι προφανώς αποτέλεσμα συνδυασμού φαινομένων διασποράς και βικαριανισμού. Μέχρι σήμερα, πολύ λίγες φυλογεωγραφικές μελέτες έχουν γίνει στο χώρο αυτό. Μια πρώτη ολοκληρωμένη μελέτη ήταν η διδακτορική διατριβή του Β. Δουρή στα είδη σαλιγκαριών του γένους *Albinaria* (Δουρή 1997; Douris et al. 1995, 1997), χρησιμοποιώντας RFLP's και αλληλουχίες μιτοχονδριακού DNA. Μια δεύτερη μελέτη αφορούσε στα βατράχια του γένους *Rana*, με τη χρήση αλλοενζύμων και τη

βαθμονόμηση ενός μοριακού ρολογιού με βάση γνωστούς γεωγραφικούς διαχωρισμούς, κυρίως μεταξύ των μεγάλων νησιών του νότιου Αιγαϊακού τόξου (Beerli et al., 1996). Πέραν αυτών καμία άλλη φυλογεωγραφική μελέτη δεν έχει εκπονηθεί μέχρι σήμερα στην περιοχή του Αιγαίου.

1.6. ΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΡΟΛΟΙ

Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη ενός μοριακού ρολογιού, δηλαδή ότι τα βιολογικά μακρομόρια (πρωτεΐνες και DNA) εξελίσσονται με σχετικά σταθερό ρυθμό, προήλθαν από τη μελέτη του ρυθμού υποκατάστασης των αμινοξέων στο μόριο της αιμογλοβίνης (Zuckerlandl & Pauling 1965). Άλλες μελέτες στη συνέχεια σε πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα οδήγησαν σε παρόμοιες παρατηρήσεις αν και από νωρίς φάνηκε ότι το μοριακό ρολόι δεν δουλεύει πάντα πολύ καλά (Dayhoff 1972).

Η ιδέα του μοριακού ρολογιού είναι ιδιαίτερα ελκυστική καθότι (εφόσον ισχύει) επιτρέπει την εκτίμηση του χρόνου διαχωρισμού των ειδών με τη σύγκριση απλώς των γονιδιακών αλληλουχιών τους. Επιπλέον οι διάφορες μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι ακριβείς αν τα γονίδια εξελίσσονται με σχετικά σταθερό ρυθμό.

Από τότε που προτάθηκε, η υπόθεση του μοριακού ρολογιού έχει υποστεί έντονη κριτική και εξακολουθεί μέχρι σήμερα να αποτελεί ένα από τα πιο αμφιλεγόμενα θέματα της μοριακής εξέλιξης. Πληθώρα διαφορετικών απόψεων έχουν διατυπωθεί σχετικά. Για παράδειγμα, οι Ochman & Wilson (1987) υποστήριζαν την ύπαρξη ενός καθολικού ρολογιού (universal clock) για τις συνώνυμες μεταλλάξεις που μπορεί να εφαρμοστεί σε όλους τους οργανισμούς. Στο άλλο άκρο ο Goodman (1981) και οι συνεργάτες του (Czelusniak et al. 1982) αμφισβήτησαν την ύπαρξη ακόμα και ενός κατά προσέγγιση σταθερού ρυθμού. Από τη δεκαετία του 1980 άρχισε να συσσωρεύεται μεγάλος όγκος αλληλουχιών DNA από διάφορους οργανισμούς, γεγονός που τροφοδότησε περισσότερες διαμάχες αλλά έδωσε και τη δυνατότητα να μελετηθεί σε βάθος η υπόθεση του μοριακού ρολογιού.

Η έννοια του μοριακού ρολογιού δεν σημαίνει ότι όλα τα γονίδια και οι πρωτεΐνες εξελίσσονται με τον ίδιο ρυθμό. Υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στον εξελικτικό ρυθμό μεταξύ διαφορετικών περιοχών του γονιδιώματος, όπως μεταξύ των διαφορετικών θέσεων ενός κωδικονίου (συνώνυμες και μη συνώνυμες μεταλλάξεις), διαφορετικών γονιδίων (συντηρητικά γονίδια όπως οι ιστόνες και λιγότερα συντηρητικά όπως οι ιντερλευκίνες), μεταξύ κωδικών αλληλουχιών και μη κωδικών (ιντρόνια και ψευδογονίδια), μεταξύ πυρηνικού και μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Αυτή η παρατήρηση δεν είναι αντίθετη με την έννοια του μοριακού ρολογιού αρκεί η ίδια

περιοχή του γονιδιώματος να παρουσιάζει τον ίδιο εξελικτικό ρυθμό μεταξύ διαφορετικών οργανισμών.

Η ιδέα του μοριακού ρολογιού βρίσκεται σε συμφωνία με τη θεωρία της ουδετερότητας που προτάθηκε από τον Kimura το 1980. Η θεωρία της ουδετερότητας υποστηρίζει ότι το μεγαλύτερο μέρος των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων είναι είτε βλαβερές (όποτε ταχύτατα εξαφανίζονται από τους πληθυσμούς) είτε επιλεκτικά ουδέτερες, οπότε η τύχη τους καθορίζεται από φαινόμενα γενετικής παρέκκλισης. Ο ρυθμός k με τον οποίο οι ουδέτερες νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις εγκαθιδρύονται σε μια νουκλεοτιδική θέση ανά μονάδα χρόνου (δηλαδή ο ρυθμός εξέλιξης) ισούται με το μεταλλακτικό ρυθμό μ και είναι ανεξάρτητος από άλλους παράγοντες, όπως το δραστικό μέγεθος του πληθυσμού N_e . Αν λοιπόν ο μεταλλακτικός ρυθμός παραμένει σταθερός για διάφορες εξελικτικές γραμμές, ο ρυθμός εξέλιξης θα είναι ο ίδιος και θα ισχύει ένα μοριακό ρολόι.

Σε πολλές περιπτώσεις παρατηρήθηκαν διαφορές στον εξελικτικό ρυθμό μεταξύ διαφορετικών εξελικτικών γραμμών. Για να εξηγηθούν αυτές οι διαφορές σύμφωνα με τη θεωρία της ουδετερότητας, έχουν προταθεί διάφορες υποθέσεις που δικαιολογούν διαφορές στον μεταλλακτικό ρυθμό. Οι υποθέσεις αυτές, που συχνά αναφέρονται κάτω από το συλλογικό όρο «επιδράσεις εξελικτικής γραμμής» (lineage effects), είναι ο χρόνος γενιάς (Laird et al., 1969; Kohne, 1970), ο μεταβολικός ρυθμός (Martin & Palumbi, 1993) και η ικανότητα των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA (Britten, 1986).

Η υπόθεση του χρόνου γενιάς έχει προσελκύσει το περισσότερο ενδιαφέρον. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή ο μεταλλακτικός ρυθμός είναι ανάλογος με το χρόνο γενιάς ενός οργανισμού και όχι με τον πραγματικό χρόνο. Άρα το μοριακό ρολόι θα πρέπει να βαθμονομηθεί με βάση το χρόνο γενιάς των οργανισμών κάθε εξελικτικής γραμμής. Έχουν γίνει πολλές μελέτες, κυρίως με γονίδια θηλαστικών, για να ελέγξουν την παραπάνω υπόθεση. Το γενικό συμπέρασμα είναι ότι οι διαφορές στον εξελικτικό ρυθμό στις σιωπηλές θέσεις (και στις μη κωδικές περιοχές) σχετίζεται με τις διαφορές στο χρόνο γενιάς. Υπάρχουν όμως περιπτώσεις που για είδη με διαφορετικό χρόνο γενιάς ο εξελικτικός ρυθμός (για τις μη σιωπηλές μεταλλαγές) φαίνεται να είναι ανάλογος του πραγματικού χρόνου και όχι του χρόνου γενιάς.

Αυτό δεν μπορεί αν εξηγηθεί με βάση της θεωρία της ουδετερότητας αλλά με την τροποποιημένη θεωρία των ελαφρώς επιβλαβών μεταλλαγών (slightly deleterious mutations) που προτάθηκε από την Ohta (1973, 1974, 1976, 1992). Σύμφωνα με τη

θεωρία της Ohta, ένα μεγάλο μέρος των ουδέτερων κατά Kimura μεταλλαγών δεν είναι στην πραγματικότητα ουδέτερες αλλά έχουν ένα πολύ μικρό συντελεστή επιλογής (s). Αυτό σημαίνει ότι η πιθανότητα εγκαθίδρυσης (fixation) τέτοιων μεταλλαγών στον πληθυσμό εξαρτάται από την (ασθενή) φυσική επιλογή και τη γενετική παρέκκλιση (το μέγεθος του πληθυσμού). Συνεπώς, με βάση τη θεωρία τη Ohta, ο εξελικτικός ρυθμός εξαρτάται και από το δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος (N_e). Όσο μικρότερος ο πληθυσμός, τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα εγκαθίδρυσης επιβλαβών μεταλλαγών λόγω γενετικής παρέκκλισης, άρα είδη με μικρό N_e αναμένεται να εξελίσσονται ταχύτερα σε σχέση με άλλα που έχουν μεγάλο N_e .

Αυτή η διαπίστωση εξηγεί και το γιατί σε κάποιες περιπτώσεις, όπως προειπώθηκε, ο εξελικτικός ρυθμός είναι ανάλογος του πραγματικού χρόνου και όχι του χρόνου γενιάς. Οργανισμοί με μεγάλο χρόνο γενιάς (άρα χαμηλό μεταλλακτικό ρυθμό) έχουν συνήθως μικρό πληθυσμιακό μέγεθος (μεγαλύτερη πιθανότητα εγκαθίδρυσης των μεταλλαγών) και το αντίστροφο, οπότε τελικά προκύπτει ένα μοριακό ρολόι που ακολουθεί κατά προσέγγιση τον πραγματικό χρόνο και όχι το χρόνο γενιάς. Πάντως, δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο ποιοι είναι οι πιο σημαντικοί παράγοντες που προκαλούν την παρατηρούμενη ετερογένεια στον εξελικτικό ρυθμό (Li, 1993)

Από τα παραπάνω είναι σαφές ότι δεν ισχύει ένα καθολικό μοριακό ρολόι. Ειδικά, όταν μελετώνται απομακρυσμένες εξελικτικά γραμμές είναι πολύ πιθανό ότι θα υπάρχουν διαφορές στον εξελικτικό ρυθμό. Όμως μεταξύ συγγενών ειδών είναι πολύ πιθανό ότι ισχύουν τοπικά μοριακά ρολόγια (Li, 1993).

Όσον αφορά τη βαθμονόμηση ενός μοριακού ρολογιού για το mtDNA, έχει υπολογιστεί ότι ο μέσος ρυθμός απόκλισης για ολόκληρο το μόριο είναι κατά προσέγγιση 2% νουκλεοτιδική απόκλιση ανά ένα εκατομμύριο έτη στα πρωτεύοντα, τους ρινόκερους, τα τρωκτικά, το γένος *Equus*, τα αρτιοδάκτυλα, τα ορνιθόμορφα πουλιά, τις χήνες, τους βάτραχους, τα ψάρια της οικογένειας Salmonidae και στο γένος *Drosophila* της Χαβάης (Wilson et al., 1985 και αναφορές μέσα σε αυτό). Αυτές οι εκτιμήσεις προέρχονται από ομάδες ειδών για τις οποίες υπάρχουν μαρτυρίες από απολιθώματα, από βιογεωγραφικά δεδομένα ή πρωτεΐνες που σχετίζονται με χρόνους απόκλισης.

Τελικά, παρά την ετερογένεια στον εξελικτικό ρυθμό, και τις όποιες αδυναμίες τους, τα μοριακά ρολόγια επιτρέπουν το συσχετισμό της φυλογενετικής ιστορίας με την κλίμακα του χρόνου και τον κατά προσέγγιση προσδιορισμό του χρόνου διαχωρισμού των εξελικτικών γραμμών. Αυτό, παρότι ενέχει μεγάλα περιθώρια σφάλματος είναι η

μόνη λύση, ειδικά όταν απουσιάζουν οι αντίστοιχες απολιθωματικές καταγραφές. Επιπλέον, με βάση ένα μοριακό ρολόι, μπορούν να συσχετισθούν οι χρόνοι διαχωρισμού με γνωστά παλαιογεωγραφικά γεγονότα, έτσι ώστε να ελεγχθεί η επίδρασή των τελευταίων στη σημερινή κατανομή και διαφοροποίηση των οργανισμών.

1.7. ΠΕΡΙΓΡΑΜΜΑ ΚΑΙ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο βασικός στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να αποκαλύψει, με τη χρήση μοριακών σημαντών (αλληλουχίες μιτοχονδριακού DNA), τα φυλογεωγραφικά πρότυπα του *M. kotschyi* στην περιοχή του Αιγαίου και τις γειτονικές περιοχές και να τα ερμηνεύσει. Τα κύρια ερωτήματα που φιλοδοξεί να απαντήσει η παρούσα διατριβή είναι τα ακόλουθα:

Υπάρχουν σαφή φυλογεωγραφικά πρότυπα και πώς ερμηνεύονται με βάση γνωστά παλαιογεωγραφικά γεγονότα;

Έχουν συμβεί φαινόμενα διασποράς, σε τι έκταση και πόσο σημαντικό ρόλο παίζουν στη διαμόρφωση της κατανομής του είδους; Με άλλα λόγια η διασπορά ή ο βικαριανισμός διαδραμάτισαν σημαντικότερο ρόλο στη διαμόρφωση της κατανομής των πληθυσμών του είδους;

Υπάρχει η δυνατότητα να βαθμονομηθεί ένα μοριακό ρολόι με τη χρήση καλά χρονολογημένων γεωλογικών διαχωρισμών που πιθανών διαχώρισαν αντίστοιχους πληθυσμούς του *M. kotschyi*;

Υπάρχει συμφωνία μεταξύ της μορφολογικής διαφοροποίησης των πληθυσμών και της διαφοροποίησής τους σε μοριακό επίπεδο;

Τα φυλογεωγραφικά πρότυπα του *M. kotschyi* συμφωνούν με τις βιογεωγραφικές κατανομές άλλων ομάδων οργανισμών;

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Στόχοι της δειγματοληψίας ήταν να καλυφθεί όσο το δυνατόν ευρύτερα και ομοιόμορφα η περιοχή εξάπλωσης του είδους, καθώς και να συλλεχθούν δείγματα που να αντιπροσωπεύουν ικανοποιητικά τη γενετική ποικιλότητα σε διαπληθυσμιακό και ενδοπληθυσμιακό επίπεδο. Γι' αυτό έγινε προσπάθεια οι συλλεχθέντες πληθυσμοί να αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος των περιγραφέντων μορφολογικών υποειδών, αλλά και να προέρχονται από περιοχές με διαφορετική παλαιογεωγραφική ιστορία και στην περίπτωση των νησιών, με διαφορετική έκταση. Λόγω έλλειψης κονδυλίων, δεν ήταν δυνατός ένας, εκ των προτέρων, ολοκληρωμένος σχεδιασμός των δειγματοληψιών, ώστε να καλυφθούν πλήρως οι προαναφερθέντες στόχοι. Μέρος των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, συλλέχθηκαν σε διάφορες φάσεις και από διαφορετικούς ανθρώπους, από το χειμώνα του 1992 μέχρι το καλοκαίρι του 2000, ενώ ένα άλλο μέρος αποκτήθηκε από Μουσειακές συλλογές. Ως προς την περιοχή εξάπλωσης καλύφθηκε ένα μεγάλο μέρος (έμειναν εκτός κυρίως περιοχές της ΒΔ και ΒΑ Μικράς Ασίας) και ως προς τον αριθμό υποειδών συμπεριλήφθηκαν 16 από τα περίπου 25 περιγραφέντα υποείδη (δεν συμπεριλήφθηκαν κάποια υποείδη από τα όρια της περιοχής εξάπλωσης και από κάποια μεμονωμένα νησιά του Αιγαίου).

Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται οι περιοχές απ' όπου έγινε η συλλογή των δειγμάτων, το υποείδος στο οποίο ανήκει κάθε πληθυσμός σύμφωνα με τις πιο πρόσφατη, κατά περίπτωση, συστηματική κατάταξη, ο χρόνος δειγματοληψίας και ο αριθμός ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν. Για τον προσδιορισμό των υποειδών δεν έγινε μορφολογικός προσδιορισμός των δειγμάτων, αλλά θεωρήθηκε ότι αυτά ανήκουν στο υποείδος της περιοχής από την οποία συλλέχθηκαν. Στις περιπτώσεις που δεν υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά για το υποείδος στο οποίο ανήκει κάποιος πληθυσμός (αυτό συμβαίνει κυρίως με κάποια νησιά), θεωρήθηκε, με την ανάλογη επιφύλαξη, ότι ανήκει στο ίδιο υποείδος με τον βιογεωγραφικά πλησιέστερο προσδιορισμένο πληθυσμό.

Ένα μεγάλο μέρος των δειγμάτων (από Πελοπόννησο, Βόρεια Ελλάδα, Τήνο, Πάρο, Αμοργό, Αστυπάλαια, νησίδες Μαράθι, Αστακίδα, Σοφράνο, Τρία νησιά) συλλέχθηκε από το γράφοντα από ταξίδια που πραγματοποίησε με ίδια μέσα είτε με τη

βοήθεια της Ελληνικής Ορνιθολογικής Εταιρείας. Ένα εξίσου μεγάλο μέρος των δειγμάτων (από Κρήτη και δορυφορικές νησίδες, Κάσο, Κάρπαθο, Κύπρο, Σέριφο, Μήλο, Κύθηρα, Αντικύθηρα και δείγματα *Tarentola mauritanica* από Λιβύη) συλλέχθηκαν από μέλη του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Ένα σχετικά μικρό, αλλά σημαντικό για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, μέρος των δειγμάτων (από Τουρκία, Πρασονήσι, Αλόνησο, Περιστέρα, *Cyrtopodion scaber*, αποκτήθηκε από τις συλλογές του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας της Βιέννης. Τέλος, το δείγμα από Κοκάρτζα (Κιλκίς) συλλέχθηκε από το Δρ. Γ. Κωτούλα, τα δείγματα *Tarentola* από Κεφαλονιά από το Δρ. Α Μαγουλά, ενώ το δείγμα από Ισραήλ ήταν μια ευγενική προσφορά του καθηγητή Y. Werner και το δείγμα από Αίγινα του καθηγητή E.N. Arnold.

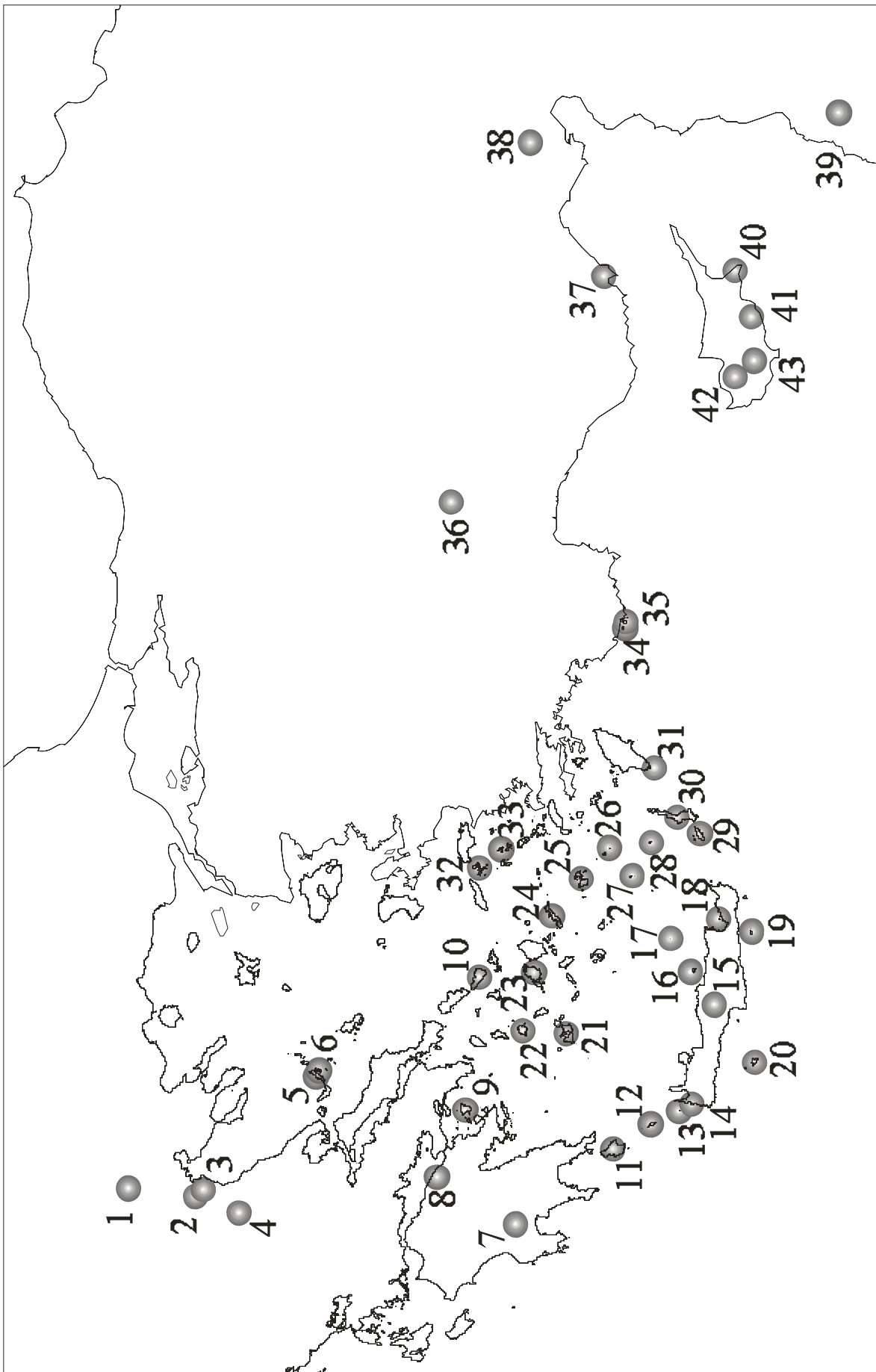
Η σύλληψη των δειγμάτων έγινε με το χέρι.

Πίνακας 2.1: Περιοχές δειγματοληψίας, υποείδος στο οποίο ανήκει κάθε πληθυσμός, άτομα που αναλύθηκαν και ο χρόνος συλλογής των δειγμάτων. Ο α/α κάθε περιοχής αντιστοιχεί στους αριθμούς της εικόνας 2.1.

α/α	Περιοχή Συλλογής	Υποείδος	Άτομα	Χρόνος Συλλογής
1	Κοκάρτζα Κιλίκις	<i>C.k. bibroni</i>	1	Ιούνιος 1997
2	Καταχάς Πιερίας	<i>C.k. bibroni</i>	1	Οκτώβριος 1997
3	Σφενδάμη Πιερίας	<i>C.k. bibroni</i>	3	Μάιος 1997
4	Κεφαλόβρυσο Ελασσώνας	<i>C.k. bibroni</i>	4	Μάιος 1997
5	Αλόνησος	<i>C.k. fuchsi</i>	1	Ιούνιος 1985*
6	Περιστέρα (δίπλα στην Αλόνησο)	<i>C.k. fuchsi</i>	1	Ιούνιος 1985*
7	Στούπα (Νότια Πελοπόννησος)	<i>C.k. bibroni</i>	1	Μάιος 1999**
8	Νεράτζα (Βόρεια Πελοπόννησος)	<i>C.k. bibroni</i>	3	Απρίλιος 1998
9	Αίγινα	<i>C.k. saronicus</i>	1	Απρίλιος 1996
10	Τήνος (Χώρα)	<i>C.k. tinensis</i>	5	Δεκέμβριος 1994
11	Κύθηρα	<i>C.k. bartoni</i>	2	Δεκέμβριος 1994 / Απρίλιος 1996**
12	Αντικύθηρα	<i>C.k. saronicus</i>	5	Ιανουάριος 1992**
13	Ποντικονήσι (ΒΑ Γραμβούσας-Κρήτη)	<i>C.k. wetsteini</i>	1	Ιούνιος 1996**
14	Πεταλίδα (κόλπος Φαλασάρων, Κρήτη)	<i>C.k. wetsteini</i>	2	Νοέμβριος 1995**
15	Κρήτη (οροπέδιο Νίδας-Ψηλορείτης)	<i>C.k. bartoni</i>	4	Μάιος 1997**
16	Γλαρονήσι (δίπλα στη Ντία)	<i>C.k. wetsteini</i>	1	Απρίλιος 1995**
17	Αυγό	<i>C.k. wetsteini</i>	5	Μάρτιος 1994**
18	Ψείρα (κόλπος Μιραμπέλλου-Κρήτη)	<i>C.k. wetsteini</i>	1	Μάιος 1996**
19	Χρυσή	<i>C.k. wetsteini</i>	5	Μάρτιος 1994**
20	Γαύδος	<i>C.k. kalypsae</i>	6	Ιούλιος 1996**
21	Μήλος (Αδάμας)	<i>C.k. saronicus</i>	6	Μάρτιος 1992**
22	Σέριφος	<i>C.k. saronicus</i>	6	Αύγουστος 1993**
23	Πάρος (Παροικιά)	<i>C.k. saronicus</i>	6	Ιούνιος 1997
24	Αμοργός	<i>C.k. saronicus x solerii</i>	1	Ιούλιος 1997
25	Αστυπάλαια	<i>C.k. solerii</i>	5	Ιούλιος 1997
26	Τρία Νησιά	<i>C.k. adelphiensis</i>	2	Ιούνιος 1999
27	Μεγάλο Σοφράνο	<i>C.k. stepaneki</i>	2	Ιούνιος 1999
28	Αστακίδα	<i>C.k. oertzeni</i>	2	Ιούνιος 1999
29	Κάσος (Φρυ)	<i>C.k. oertzeni</i>	5	Φεβρουάριος 1992**
30	Κάρπαθος	<i>C.k. oertzeni</i>	3	Απρίλιος 2000**
31	Πρασονήσι (Ν. της Ρόδου)	?	2	Ιούνιος 1985*
32	Φούρνοι Ικαρίας	<i>C.k. beutleri</i> ?	1	Σεπτέμβριος 2000**
33	Μαράθι (δίπλα στους Λειψούς)	<i>C.k. beutleri</i> ?	1	Ιούνιος 1997
34	Άγιος Γεώργιος (δίπλα στο Καστελόριζο)	<i>C.k. beutleri x ciliciensis</i> ?	1	Δεκέμβριος 1996**
35	Καστελόριζο	<i>C.k. beutleri x ciliciensis</i> ?	1	Δεκέμβριος 1996**
36	Akschehir (Τουρκία)	<i>C.k. danilewskii</i>	1	Μάιος 1960*
37	Σελεύκεια (Τουρκία)	<i>C.k. ciliciensis</i>	1	Απρίλιος 1963*
38	Άδανα (Τουρκία)	<i>C.k. ciliciensis x syriacus</i> ?	1	Ιούνιος 1963*
39	Ισραήλ	<i>C.k. orientalis</i>	1	
40	Κύπρος – Αλυκή?	<i>C.k. fitzingeri</i>	1	Ιανουάριος 1997**
41	Κύπρος – Κυβερνήτη Παραλία	<i>C.k. fitzingeri</i>	1	Φεβρουάριος 2000**
42	Κύπρος - Χρυσοχού	<i>C.k. fitzingeri</i>	1	Φεβρουάριος 2000**
43	Κύπρος - Ρουδιά Γέφυρα	<i>C.k. fitzingeri</i>	1	Φεβρουάριος 2000**
44	<i>Cyrtopodion scaber</i>		5	1990*
45	<i>Hemidactylus turcicus</i> (v. Λύρα, δίπλα σε Λειψούς)		1	Ιούνιος 1997
46	<i>Tarentola mauritanica</i> (Τυνησία)		2	Απρίλιος 1997**
47	<i>Tarentola mauritanica</i> (Ντία)		1	**
48	<i>Tarentola mauritanica</i> (Κεφαλονιά)		2	Οκτώβριος 1997
49	<i>Podarcis erhardii</i> (Ντία)		1	Οκτώβριος 1995
50	<i>Podarcis erhardii</i> (Αμοργός)		1	Ιούλιος 1997
	Σύνολο		118	

*από συλλογές του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας της Βιέννης

** από μέλη του Μουσείου Φυσικής Ιστορίας της Κρήτης



Εικόνα 2.1: Οι περιοχές δειγματοληψίας για τα άτομα του *M. koltschigi*. Η αναστοιχία των αριθμών με τα δείγματα και τα ονόματα των περιοχών δίνονται στον πίνακα 2.1

2.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η τυπική διαδικασία που ακολουθήθηκε στο εργαστήριο μετά τη συλλογή των δειγμάτων, περιλάμβανε τα ακόλουθα στάδια:

- 1) Εξαγωγή ολικού DNA
- 2) Πολλαπλασιασμό τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου της πρώτης υπομονάδας της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Cytochrome oxidase I, COI), μέσω της αλυσιδωτή αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)
- 3) Καθαρισμό του προϊόντος της PCR
- 4) Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Sequencing)

2.2.1. Εξαγωγή ολικού DNA

Για την εξαγωγή ολικού DNA χρησιμοποιήθηκαν εναλλακτικά και κατά περίπτωση οι ακόλουθες μέθοδοι

- α) Η μέθοδος της πρωτεΐνάσης k με φαινόλη-χλωροφόρμιο από Sambrook et al., 1989
- β) Η μέθοδος NaCl με χρήση απορρυπαντικού, τροποποιημένη από A. Colombari
- γ) Η μέθοδος Chelex

Λεπτομερή πρωτόκολλα και των τριών μεθόδων δίνονται στο παράρτημα 1.

Η εξαγωγή DNA έγινε από ιστό του μυ της ουράς του ζώου ή από τη γλώσσα του. Τα ζώα συνήθως μεταφέρονταν ζωντανά στο εργαστήριο και θανατώνονταν με χλωροφόρμιο ή ψύξη στους -80°C . Ο φρέσκος ιστός, κατόπιν, λειοτριβούταν με υγρό άζωτο σε πορσελάνινο γουδί και ακολουθούσε η εξαγωγή με τη μέθοδο της πρωτεΐνάσης k ή του NaCl. Σε κάποιες περιπτώσεις ο ιστός διατηρούταν στους -80°C για κάποιο διάστημα και στη συνέχεια ακολουθούταν η ίδια διαδικασία, όπως προηγουμένως. Στο τέλος της διαδικασίας εξαγωγής το DNA διαλυόταν σε 100-200 μl διπλά αποσταγμένου και αποστειρωμένου νερού ή TE. Από αυτό το διάλυμα 2 μl ηλεκτροφορούνταν, για μισή ώρα στα 120V, σε οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης 1% που περιείχε 10% βρωμιούχο

αιθίδιο. Από τη φωτογραφία, που λαμβανόταν με έκθεση στο υπεριώδες, εκτιμούνταν η ποσότητα και η ποιότητα του εξαγομένου DNA. Σε άλλες περιπτώσεις, ολόκληρο το ζώο ή τμήμα του είχαν διατηρηθεί σε αιθανόλη περιεκτικότητας > 70% για λίγες μέρες έως αρκετά χρόνια (όπως στην περίπτωση των μουσειακών δειγμάτων). Σ' αυτές τις περιπτώσεις ο ιστός τεμαχιζόταν σε μικρά κομμάτια με τη βοήθεια λαβίδων και αφηνόταν για 15 περίπου λεπτά ώστε να εξατμιστεί η αλκοόλη. Στη συνέχεια γινόταν εξαγωγή με κάποια από τις τρεις προαναφερθείσες μεθόδους. Η ποσότητα και ποιότητα του DNA ήταν συνήθως κατώτερη απ' ότι όταν χρησιμοποιούνταν φρέσκος ή κατεψυγμένος ιστός. Το DNA ήταν συνήθως σπασμένο σε κομμάτια μικρότερου μοριακού βάρους και σχημάτιζε, κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, μια συνεχόμενη κηλίδα (smear). Πολλές φορές όλο το DNA ήταν σπασμένο σε κομμάτια μικρού μοριακού βάρους (<300 bp) και τότε ήταν συνήθως ακατάλληλο για PCR. Για την εξαγωγή DNA των δειγμάτων από το Μουσείο Φυσικής Ιστορίας της Βιέννης χρησιμοποιήθηκαν η μέθοδος του NaCl και του Chelex. Με τη μέθοδο του NaCl, από τα 27 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, σε όλα πάρθηκε DNA μικρού μοριακού βάρους ενώ σε 15 από τα δείγματα φαίνονταν να υπάρχει και λίγο DNA μεγαλύτερου βάρους (όταν εκτιθόταν σε υπεριώδη ακτινοβολία το πήκτωμα αγαρόζης, όπου είχαν ηλεκτροφορηθεί 4 μl από τα 60 του εξαγομένου DNA). Τελικά σε 14 από τα δείγματα έγινε δυνατός ο πολλαπλασιασμός ενός τμήματος του μιτοχονδριακού DNA μέσω PCR. Τα παλαιότερα από τα δείγματα αυτά είχαν τοποθετηθεί σε αιθανόλη το 1963, 27 χρόνια πριν την εξαγωγή του DNA. Με τη μέθοδο του Chelex δεν έγινε εκτίμηση της ποσότητας του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, αφού χρησιμοποιείται ελάχιστη ποσότητα ιστού, αλλά ο πολλαπλασιασμός των δειγμάτων αυτών μέσω PCR δεν έδωσε καλύτερα αποτελέσματα απ' ότι στην περίπτωση του NaCl.

2.2.2. Η Αλυσιδωτή αντίδραση της Πολυμεράσης

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης έχει γίνει ένα πανίσχυρο εργαλείο για φυλογενετικές μελέτες και όχι μόνο. Παρ' όλα αυτά, η απaráμιλλη δύναμή της συνδέεται με μεγάλη πολυπλοκότητα. Πηγή αυτής της πολυπλοκότητας είναι η ίδια η φύση της αντίδρασης: μυριάδες ιοντικές αλληλεπιδράσεις, κινητικές σταθερές και ενζυμική δραστηριότητα, που λαμβάνουν χώρα κατ' επανάληψη, από τις οποίες προσδοκούμε να λάβουμε το επιθυμητό προϊόν. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη απόδοση της αντίδρασης είναι κυρίως η συμπληρωματικότητα της αλληλουχίας των

εκκινητών (ιδιαίτερα του 3' άκρου) με το DNA στόχο, η θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών με το DNA στόχο (η οποία σχετίζεται και με την αλληλουχία των εκκινητών) και η συγκέντρωση Mg^{+2} στο διάλυμα. Οι υπόλοιποι παράγοντες (ρυθμιστικό διάλυμα, πολυμεράση, δεοξυριβονουκλεοτίδια, DNA-μήτρα) χρησιμοποιούνται συνήθως σε προκαθορισμένη συγκέντρωση.

2.2.2.1. Επιλογή των εκκινητών

Για τον πολλαπλασιασμό τμήματος της πρώτης υπομονάδας της κυτοχρωμικής οξειδάσης χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Η ονομασία τους και η αλληλουχία τους δίνονται ακολούθως:

LCO1490:	5' - ggt caa caa atc ata aag ata ttg g- 3'
HCO2198:	5' - taa act tca ggg tga cca aaa aat ca- 3'
LCOI5973:	5' - cct ggg ccg gta taa c- 3'
HCOI6567:	5' - ggt cga aga agg tgg tgt- 3'
LCOI5982:	5' - ggt ata acc gga aca gcc ct (agct) ag (ct) - 3'
HCOI6570:	5' - tgc tgg gtc gaa gaa ggt (agct)gt- 3'

Τα γράμματα L και H αναφέρονται στην ελαφριά και βαριά αλυσίδα, αντίστοιχα, του μιτοχondριακού DNA, και τα CO, COI στην κυτοχρωμική οξειδάση. Οι αριθμοί 1490 και 2198, του πρώτου ζεύγους εκκινητών δηλώνουν τη θέση του 5' άκρου του εκκινητή στην αλληλουχία της *Drosophila yakuba* (Clary & Wolstenholme, 1985), ενώ οι αριθμοί των άλλων ζευγών τη θέση του 5' άκρου του εκκινητή στην αλληλουχία του mtDNA του ανθρώπου (Anderson et al., 1981).

Στα πλαίσια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής (Κασαπίδης, Π. 1996) είχα επιλέξει ένα ζεύγος γενικών εκκινητών (LCO1490, HCO2198) που πολλαπλασιάζει τμήμα της COI, μήκους 709 βάσεων. Οι εκκινητές αυτοί είχαν σχεδιασθεί για να χρησιμοποιηθούν σε φυλογενετικές αναλύσεις διαφόρων φύλων ασπονδύλων (Folmer et al., 1994) αλλά κρίθηκαν κατάλληλοι για την παρούσα μελέτη καθώς έδιναν προϊόν σε ικανό αριθμό δειγμάτων του *Mediodactylus kotschy*, σε σχέση με άλλα ζεύγη εκκινητών που δοκιμάστηκαν. Επειδή όμως οι συγκεκριμένοι εκκινητές

δεν έδιναν προϊόν για όλα τα δείγματα, σχεδιάστηκε ένα ζεύγος εσωτερικών εκκινητών (LCOI5883-HCOI6567) με βάση τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που είχαν προσδιορισθεί από έναν περιορισμένο αριθμό δειγμάτων (από Αυγό, Γλαρονήσι, Χρυσή, Σέριφο, Κάσο και την ομόλογη ανθρώπινη αλληλουχία (από Anderson et al, 1981)) (Κασαπίδης, 1996). Το ζεύγος αυτό πολλαπλασιάζει προϊόν μήκους 594 ζευγών βάσεων.

Καθώς όμως συλλέγονταν περισσότερα δείγματα για ανάλυση, έγινε φανερό ότι και οι προηγούμενοι εκκινητές δεν ήταν αποτελεσματικοί σε όλες τις περιπτώσεις. Αυτό οφειλόταν στο γεγονός ότι οι εκκινητές αυτοί σχεδιάστηκαν με βάση ένα μικρό μέρος των δειγμάτων και δεν μπορούσαν να καλύψουν την αναπάντεχα μεγάλη νουκλεοτιδική διαφοροποίηση που εκ των υστέρων αποκαλύφθηκε. Έτσι κάποια στιγμή κρίθηκε απαραίτητο να επανασχεδιασθεί ένα ζεύγος πιο συντηρημένων εκκινητών, με τη χρησιμοποίηση περισσότερων αλληλουχιών από τον υπό μελέτη οργανισμό καθώς και από άλλα είδη σπονδυλωτών που ήταν δημοσιευμένα σε βάσεις δεδομένων (GenBank).

Οι νέοι εκκινητές σχεδιάστηκαν σε θέσεις κοντινές των προηγούμενων, και περιείχαν «εκφυλισμένα» νουκλεοτίδια κοντά στο 3' άκρο, ώστε να είναι βέβαιη η ομολογία τους με το DNA στόχο. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντιστοιχούν σε τρίτες θέσεις των κωδικονίων, που είναι εκφυλισμένες, και ως εκ τούτου υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να έχουν υποστεί μεταλλαγή.

2.2.2.2. Υλικά της αντίδρασης

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 2.2) δίνονται πληροφορίες για τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της PCR. Το ρυθμιστικό διάλυμα, το απορρυπαντικό W1 και το διάλυμα MgCl₂ παρέχονται μαζί με την DNA πολυμεράση, από την εταιρεία κατασκευής του ενζύμου (GibcoBRL). Τα δεσοξυριβονουκλεοτίδια είναι από την εταιρεία Promega. Οι εκκινητές κατασκευάστηκαν από την εταιρεία MWG, στάλθηκαν λυοφιλημένοι και διαλύθηκαν σε διπλά αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό σε τόσο όγκο ώστε η συγκέντρωσή τους να είναι 100 μM (με υπόδειξη της εταιρείας). Από αυτό το διάλυμα παρασκευάζονταν διαλύματα «εργασίας» συγκέντρωσης 10 μM.

Πίνακας 2.2: Συνοπτικές πληροφορίες για τα υλικά της αντίδρασης της PCR.

	Αρχική Συγκέντρωση	Συγκέντρωση στην αντίδραση	Εταιρεία - Κωδικός	Φύλαξη
Taq DNA πολυμεράση	5 u / μl	0,05 u / μl	GibcoBRL Cat.# 18038-026	-20° C
Ρυθμιστικό διάλυμα	10x	1x		
Απορρυπαντικό W1	1% v/v	0.05% v/v		
Διάλυμα MgCl₂	50 mM	1,5 – 4,5 mM		
Εκκινητής 1	10 μM	0,5 μM	MWG	
Εκκινητής 2	10 μM	0,5 μM		
dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	10 mM έκαστο	0,2 mM έκαστο	Promega Cat.# U1240	
DNA μήτρα	1:10-1:20 αρχικής εξαγωγής	1/10 αρχικής συγκέντρωσης	-	4° C

Σχετικά με το DNA μήτρα, χρησιμοποιούνταν αραιώσεις 1:10 ή 1:20 του αρχικού ολικού DNA και η τελική τους αραιώση στην αντίδραση ήταν 1:100 ή 1:200 της αρχικής συγκέντρωσης του διαλύματος της εξαγωγής. Για το DNA που εξήχθη με τη μέθοδο του Chelex, χρησιμοποιήθηκε 1μl από το διάλυμα για 10 μl αντίδρασης. Αυτές οι ποσότητες καθορίστηκαν εμπειρικά και εξασφαλίζουν την απαραίτητη αρχική ποσότητα του DNA μήτρα ώστε να παραχθεί ικανοποιητική ποσότητα προϊόντος. Γενικά θεωρείται ότι η επαρκής ποσότητα ολικού γενωμικού DNA είναι περίπου 50 ng. Μικρότερη ποσότητα προφανώς θα έχει ως αποτέλεσμα μη ικανοποιητικό πολλαπλασιασμό. Αντίθετα μεγαλύτερη ποσότητα προκαλεί συνήθως προβλήματα στην αντίδραση είτε λόγω του ότι αυξάνει ο πολλαπλασιασμός μη ειδικών προϊόντων είτε λόγω της παρουσίας αναστολέων σε μεγάλη συγκέντρωση, οι οποίοι πιθανώς να έχουν παραμείνει στο διάλυμα του DNA κατά την εξαγωγή.

2.2.2.3. Βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης

Για κάθε ζεύγος εκκινητών, όταν χρησιμοποιείται για συγκεκριμένη ομάδα οργανισμών, χρειάζεται να γίνει αρχικά βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, ώστε να παράγεται σε ικανοποιητική ποσότητα το αναμενόμενο προϊόν, χωρίς παράλληλα να παράγονται παραπροϊόντα.

Οι κρίσιμες παράμετροι είναι κυρίως η θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών με το DNA μήτρα (annealing temperature) και η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{+2} . Συνδυάζοντας τις δύο αυτές παραμέτρους και χρησιμοποιώντας τα ίδια αρχικά υλικά σε συσκευή PCR Robocycler Gradient 96 της Stratagene, που δημιουργεί κλίση θερμοκρασιών, μπορούμε εύκολα και γρήγορα να προσδιορίσουμε τις βέλτιστες συνθήκες. Χρησιμοποιούνταν συνήθως τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις Mg^{+2} (1,5 mM, 3,0 mM και 4,5 mM), τέσσερις θερμοκρασίες σύνδεσης (ανά τέσσερις ° C, ξεκινώντας από τους 45° C) και δύο διαφορετικά δείγματα συν ένα τυφλό (σύνολο αντιδράσεων: $3 \times 4 \times 3 = 36$). Οι αντιδράσεις ελέγχονταν ηλεκτροφορητικά σε οριζόντιο πήκτωμα αγαρόζης 1% και επιλεγόταν ο βέλτιστος συνδυασμός.

Σε αρκετές περιπτώσεις δεν ήταν δυνατή η βελτιστοποίηση. Συνήθως διακρίνονταν οι ακόλουθες περιπτώσεις: α) δεν υπήρχε καθόλου προϊόν, β) το προϊόν ήταν ασθενές, γ) υπήρχαν πολλά παραπροϊόντα.

Στην (α) περίπτωση δοκιμαζόταν ακραίος συνδυασμός συνθηκών (π.χ. 38° C, 6mM [Mg^{+2}]) ή εφαρμοζόταν η λεγόμενη step up PCR. Μ' αυτή τη μέθοδο γίνονταν συνήθως οι πέντε πρώτοι κύκλοι της αντίδρασης σε χαμηλή θερμοκρασία σύνδεσης (38° C) και ακολουθούσαν 30-40 κύκλοι σε υψηλότερη. Έτσι οι εκκινητές, ακόμα και αν έχουν χαμηλή συγγένεια με το DNA στόχο, στην αρχή θα συνδεθούν και θα δώσουν προϊόντα που στους επόμενους κύκλους θα χρησιμεύσουν ως μήτρα. Ενδέχεται λοιπόν να παραχθεί το αναμενόμενο προϊόν, αν και υπάρχει πιθανότητα να προκύψουν παραπροϊόντα. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιούταν και στη (β) περίπτωση για να ενισχύσει το ασθενές προϊόν. Όταν υπήρχε ασθενές προϊόν, αλλά δεν μπορούσαμε να αυξήσουμε την ποσότητά του τότε γινόταν επαναπολλαπλασιασμός του προϊόντος (reamplification). Σ' αυτή την περίπτωση το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορούταν σε πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης (low melting point agarose) σε χαμηλή τάση

(80V) για 90 λεπτά, ώστε να διαχωριστεί καλά από πιθανά παραπροϊόντα παρόμοιου μεγέθους. Στη συνέχεια εκτιθόταν σε υπεριώδες, και κοβόταν με νυστέρι το τμήμα του πηκτώματος που περιείχε το προϊόν, λιωνόταν με θέρμανση στους 70° C και αραιωνόταν 100 – 2000 φορές, ανάλογα με την ποσότητα που υπήρχε. Αυτό το αραιωμένο προϊόν χρησιμοποιούταν ως DNA μήτρα σε μια επόμενη αντίδραση. Στη (γ) περίπτωση μπορεί να επιτευχθεί μείωση των παραπροϊόντων χρησιμοποιώντας την touch down PCR. Σ' αυτή την περίπτωση, η αντίδραση ξεκίναγε από υψηλότερες θερμοκρασίες σύνδεσης και σε κάθε κύκλο κατέβαινε 1-2° C (για 5-10 κύκλους) μέχρι να φτάσει στη βέλτιστη θερμοκρασία σύνδεσης, με την οποία συνεχιζόταν η αντίδραση για τους υπόλοιπους κύκλους. Μ' αυτό τον τρόπο, στους πρώτους κύκλους, παράγεται θεωρητικά μεγαλύτερη ποσότητα από το ειδικό προϊόν σε σχέση με τα μη ειδικά αφού λογικά οι εκκινητές έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με την περιοχή στόχο παρά με τις ανταγωνιστικές θέσεις σύνδεσης.

2.2.2.4. Συνθήκες της αντίδρασης

Όλες οι δοκιμαστικές αντιδράσεις γίνονταν σε όγκο 10μl. Όταν βελτιστοποιούνταν η απόδοσή τους τότε γίνονταν τέσσερις αντιδράσεις των 25μl ώστε να παραχθεί ικανή ποσότητα προϊόντος για το επόμενο στάδιο. Προτιμήθηκε να γίνουν 4 αντιδράσεις των 25μl παρά μία των 100 γιατί παρατηρήθηκε ότι όσο μικρότερος ήταν ο όγκος της αντίδρασης τόσο μεγαλύτερη αναλογικά ήταν η ποσότητα του προϊόντος. Αυτό πιθανώς εξηγείται από τα γεγονότα ότι όσο μικρότερος είναι ο όγκος της αντίδρασης τόσο γρηγορότερα και πιο ομοιόμορφα επάγεται η θερμότητα κατά τις μεταβολές της θερμοκρασίας στα διαδοχικά στάδια των κύκλων της PCR. Στον πίνακα 2.3 δίνονται οι θερμοκρασίες σύνδεσης και οι συγκεντρώσεις Mg²⁺ που χρησιμοποιούνταν συνήθως για κάθε ζεύγος εκκινητών καθώς και το μήκος του προϊόντος που παραγόταν.

Ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός του DNA πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 9600 και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακόλουθο

Προεπώαση: 94° C για 2 min

Τριάντα κύκλοι που περιλαμβάνουν τα ακόλουθα στάδια:

Αποδιάταξη (denaturation): 94° C για 1 min

Πρόσδεση (annealing): [βλ. επόμενο πίνακα] για 30 sec

Επιμήκυνση (extension): 72° C για 30 sec

Ένας κύκλος στους 72⁰ C για 5 λεπτά

Εναλλακτικά, χρησιμοποιήθηκε και η συσκευή Robocycler Gradient 96 της Strategene, με την μόνη διαφορά ότι τα στάδια της πρόσδεσης και της επιμήκυνσης διαρκούσαν 45 sec.

Οι συνηθισμένες θερμοκρασίες σύνδεσης για κάθε ζεύγος εκκινητών και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις MgCl₂, καθώς και το μήκος του παραγόμενου προϊόντος δίνονται ακολούθως:

Ζεύγος εκκινητών	Θερμοκρασία σύνδεσης (Annealing)	Συγκέντρωση MgCl₂	Μήκος προϊόντος (ζ.β.)
LCOI490 – HCO2198	42 ^o C	4,5 mM	709
LCOI5973 – HCOI6567	46-50 ^o C	3,0 mM	595
LCOI5982 – HCOI6570	50 ^o C	4,0 mM	589

2.2.3. Καθαρισμός του προϊόντος

Μετά από κάθε αντίδραση, όλο το προϊόν ηλεκτροφορούταν σε πήκτωμα αγαρόζης, κόβονταν με αποστειρωμένο νυστέρι οι ζώνες που περιείχαν το προϊόν και στη συνέχεια γινόταν καθαρισμός. Χρησιμοποιήθηκαν δύο τεχνικές. Η πρώτη τεχνική, που χρησιμοποιήθηκε αρχικά, περιλάμβανε ηλεκτροφόρηση όλης της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης και καθαρισμό του προϊόντος με χρήση ζεστής φαινόλης, κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη και επαναδιάλυσή του στον επιθυμητό όγκο νερού (βλέπε αναλυτικό πρωτόκολλο στο παράρτημα 1). Στη συνέχεια, θεωρήθηκε πιο εύκολο, γρήγορο και ασφαλές να χρησιμοποιηθεί το Prep-A-Gene DNA Purification kit της BIORAD (Cat.# 732-6011). Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που συστήνει η εταιρεία. Στην περίπτωση αυτή η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε κανονική αγαρόζη και χρησιμοποιούνταν σφαιρίδια πάνω στα οποία δεσμευόταν το προϊόν, καθαριζόταν από προσμίξεις με διαδοχικές πλύσεις και τέλος εκλουόταν σε νερό σε όγκο 30μl. Σ' αυτή τη φάση ήταν έτοιμο να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας (sequencing), αφού πρώτα γινόταν φωτομέτρηση ή ηλεκτροφόρηση 5 μl του τελικού διαλύματος για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του προϊόντος της PCR.

2.2.4. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing)

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των προϊόντων της PCR έγινε με cycle sequencing με τη χρήση του εμπορικού κιτ fmol DNA Cycle Sequencing System της Promega (Cat.# Q4100) και τη χρήση ραδιενεργώς σημασμένου φωσφόρου [γ - ^{32}P]-ATP, με τον οποίο σημειώνεται το 5' άκρο του εκκινητή (end labelling). Ακολουθήθηκε πιστά το πρωτόκολλο που υποδεικνύει ο κατασκευαστής. Για κάθε άτομο γίνονταν δύο αντιδράσεις, μία με κάθε ένα από τους δύο εκκινητές που είχαν χρησιμοποιηθεί στην PCR, ώστε να διαβαστεί πλήρως η αλληλουχία του μελετούμενου τμήματος του mtDNA, μεταξύ των δύο εκκινητών. Η ποσότητα του προϊόντος PCR που χρησιμοποιούνταν ήταν 4-40 fmol.

Από κάποια στιγμή και μετά αντί του fmol DNA Cycle Sequencing System χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση Thermo Sequenase της εταιρείας Amersham Pharmacia Biotech Inc. Το αναλυτικό πρωτόκολλο παρατίθεται στο παράρτημα 1

2.2.4.1. Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων

Η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έγινε σε κατακόρυφο αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η δημιουργία του πλέγματος πολυακρυλαμίδης δημιουργείται με τον πολυμερισμό διαλύματος 6% ακρυλαμίδης - bis-ακρυλαμίδης 19:1 - 7M ουρίας. Το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης είναι TBE 1x. Ως καταλύτες πολυμερισμού χρησιμοποιούνται διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου 10% και TEMED. Για ένα πήκτωμα χρησιμοποιούνται 70ml διαλύματος 6% ακρυλαμίδης - bis-ακρυλαμίδης 19:1 - 7M ουρίας στο οποίο προστίθενται 700 μl διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου 10% και 70 μl TEMED. Το πήκτωμα αφήνεται τουλάχιστον 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου για να πολυμεριστεί.

Οι αντιδράσεις πολυμερισμού της πρωτοδιάταξης θερμαίνονται πριν την ηλεκτροφόρηση στους 90° C για δύο λεπτά ώστε να αποδιαταχθούν οι αλυσίδες του DNA και τοποθετούνται σε πάγο για να παραμείνουν αποδιαταγμένες μέχρι να φορτωθούν στο πήκτωμα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ειδικές συσκευές, με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x στην άνοδο και την κάθοδο. Το πήκτωμα προθερμαίνεται

για μισή ώρα με ηλεκτροφόρηση στα 60W. Στη συνέχεια τοποθετούνται 3 μl από κάθε αντίδραση σε κάθε διαδρομή (lane) με τη σειρά A, C, G, T. Η σειρά αυτή εξυπηρετεί στο να διαβάζεται εύκολα η συμπληρωματική αλληλουχία της προσδιορισμένης αλληλουχίας με απλή αντιστροφή του φιλμ της αυτοραδιογραφίας. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 60W. Για κάθε αντίδραση γίνονται δύο ηλεκτροφορήσεις, μία μικρής και μία μεγαλύτερης διάρκειας. Οι χρόνοι των ηλεκτροφορήσεων για κάθε εκκινητή και η θερμοκρασία σύνδεσης που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση δίνονται στο παράρτημα 1.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης τοποθετείται σε φύλλο χαρτιού Whattman 3M και ξηραίνεται σε ειδικό ξηραντήρα στους 80°C για δύο ώρες. Στη συνέχεια εκτίθεται σε φιλμ Kodak XAR μέσα σε ειδικές θήκες για 12-24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το φιλμ εμφανίζεται σε αυτόματο εμφανιστικό μηχάνημα.

2.2.4.2. Ανάγνωση των αλληλουχιών - Στοιχίση

Η ανάγνωση των βάσεων στην αυτοραδιογραφία γίνεται από κάτω προς τα επάνω και δίνει τη σειρά των νουκλεοτιδίων σε κατεύθυνση 5' → 3'. Για κάθε δείγμα έγιναν δύο αντιδράσεις, μία με κάθε έναν από τους δύο εκκινητές της PCR. Έτσι η νουκλεοτιδική αλληλουχία του προϊόντος της PCR προσδιορίζεται ανεξάρτητα από δυο αντίθετες κατευθύνσεις ώστε να μειωθεί η πιθανότητα λάθους. Κάθε αντίδραση επιτρέπει την ανάγνωση 400 κατά μέσο όρο βάσεων, 20-30 περίπου βάσεις μετά το 3' άκρο του εκκινητή. Τελικά προσδιορίστηκαν 515 βάσεις για κάθε αλληλουχία. Αυτό σημαίνει ότι κατά μέσο όρο οι 300 περίπου βάσεις στο μέσο κάθε αλληλουχίας προσδιορίστηκαν δυο φορές ενώ οι 100 ακραίες βάσεις σε κάθε μεριά μία μόνο φορά. Οι αλληλουχίες μετά την ανάγνωσή τους εισήχθησαν σε H/Y και έγινε στοιχίση με τη βοήθεια του πακέτου προγραμμάτων GCG σε σύστημα VAX/VMS. Η στοιχίση ήταν απόλυτη και δεν υπήρχαν ενθέσεις ή ελλείψεις βάσεων, καθώς η αλληλουχία κωδικοποιεί τμήμα πρωτεϊνικού μορίου που έχει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική αναπνοή και υπόκειται σε λειτουργικούς περιορισμούς. Μετά τη στοιχίση οι αλληλουχίες ελέγχθηκαν για δεύτερη φορά. Στη συνέχεια εντοπίστηκαν οι μη σιωπηλές μεταλλαγές καθώς και σιωπηλές μοναδικές μεταλλαγές (singleton) ή άλλες σπάνιες μεταλλαγές, οι οποίες ελέγχθηκαν ξανά για την πιθανότητα λάθους.

2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

2.3.1. Εκτίμηση των νουκλεοτιδικών αποστάσεων

Στο επίπεδο της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας η εκτίμηση της εξελικτικής ιστορίας γίνεται με τη σύγκριση των νουκλεοτιδικών διαφορών μεταξύ δύο ομόλογων μορίων DNA. Η πιο απλή μέτρηση του βαθμού της νουκλεοτιδικής διαφοροποίησης είναι ο ποσοστό p των νουκλεοτιδικών θέσεων στις οποίες οι δύο αλληλουχίες διαφέρουν (απόσταση p , p -distance). Για αλληλουχίες που έχουν μικρό ποσοστό διαφορών, η πιθανότητα να έχουν συμβεί παραπάνω από μία αλλαγές στην ίδια θέση είναι αμελητέα. Έτσι ο αριθμός των παρατηρούμενων διαφορών μεταξύ των δύο αλληλουχιών είναι κοντά στον πραγματικό αριθμό νουκλεοτιδικών αλλαγών. Όσο όμως αυξάνει ο βαθμός διαφοροποίησης τόσο αυξάνει και η πιθανότητα να έχουν συμβεί παραπάνω από μία αλλαγές στην ίδια νουκλεοτιδική θέση. Έτσι όταν το p είναι μεγάλο τείνει να υποεκτιμά τις πραγματικές διαφορές. Στην περίπτωση αυτή ο αριθμός των παρατηρούμενων διαφορών είναι πολύ πιθανό να είναι μικρότερος από αυτόν των πραγματικών.

Διάφοροι συγγραφείς έχουν αναπτύξει μια σειρά από μοντέλα ώστε να εκτιμάται ο πραγματικός αριθμός νουκλεοτιδικών αλλαγών. Κάθε μοντέλο κάνει μια διαφορετική παραδοχή για το πρότυπο της νουκλεοτιδικής υποκατάστασης. Τα περισσότερα από τα μοντέλα βασίζονται στην υπόθεση ότι κάθε νουκλεοτίδιο έχει συγκεκριμένο ρυθμό υποκατάστασης που παραμένει σταθερός και ότι οι νουκλεοτιδικές συχνότητες σε κάθε αλληλουχία είναι σε ισορροπία και δεν αλλάζουν με το χρόνο. Έτσι αυτά τα μοντέλα σχετίζονται μεταξύ τους και διαφέρουν μόνο ως προς τον αριθμό των διαφορετικών παραμέτρων που περικλείουν. Οι κύριες παράμετροι είναι η πιθανότητα υποκατάστασης ενός νουκλεοτιδίου από ένα άλλο και η συχνότητα κάθε νουκλεοτιδίου στις αλληλουχίες που μελετώνται.

Μερικά από τα πιο γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης είναι το μοντέλο των Jukes-Cantor (1969), το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura (1980), το μοντέλο του Felsenstein (1981), το μοντέλο των Hasegawa, Kishino και Yano (1985) και το Γενικό Αντιστρεπτό Μοντέλο (General Reversible Model) (Rodriguez et al. 1990; Yang et al. 1994). Το τελευταίο

μοντέλο, όπως φανερώνει και το όνομά του, είναι το γενικότερο απ' όλα τα προηγούμενα. Έτσι, με κατάλληλο περιορισμό κάποιων από τις παραμέτρους του μπορούμε να καταλήξουμε σε οποιοδήποτε από τα προηγούμενα μοντέλα.

Στον πίνακα 2.3 δίνονται οι παράμετροι για κάθε ένα από τα προαναφερθέντα μοντέλα

Πίνακας 2.3: Τα πιο γνωστά μοντέλα εκτίμησης των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων και οι αντίστοιχες παράμετροι που λαμβάνουν υπόψη.

	A	C	G	T	Συχνότητα νουκλεοτιδίων g_i ($i = A, C, G, T$)
A. Μοντέλο Jukes-Cantor (1969) (JC)					
A	-	α	α	α	$g_A = g_C = g_G = g_T = 0,25$
C	α	-	α	α	
G	α	α	-	α	
T	α	α	α	-	
B. Διπαραμετρικό Μοντέλο του Kimura (1980) (K2P)					
A	-	β	α	β	$g_A = g_C = g_G = g_T = 0,25$
C	β	-	β	α	
G	α	β	-	β	
T	β	α	β	-	
Γ. Μοντέλο του Felsenstein (1981) (F81)					
A	-	$g_C \alpha$	$g_G \alpha$	$g_T \alpha$	$g_A \neq g_C \neq g_G \neq g_T$
C	$g_A \alpha$	-	$g_G \alpha$	$g_T \alpha$	
G	$g_A \alpha$	$g_C \alpha$	-	$g_T \alpha$	
T	$g_A \alpha$	$g_C \alpha$	$g_G \alpha$	-	
Δ. Μοντέλο των Hasegawa, Kishino & Yano (1985) (HKY85)					
A	-	$g_C \beta$	$g_G \alpha$	$g_T \beta$	$g_A \neq g_C \neq g_G \neq g_T$
C	$g_A \beta$	-	$g_G \beta$	$g_T \alpha$	
G	$g_A \alpha$	$g_C \beta$	-	$g_T \beta$	
T	$g_A \beta$	$g_C \alpha$	$g_G \beta$	-	
Ε. Γενικό αντιστρεπτό Μοντέλο (REV)					
A	-	g_{ca}	g_{Gb}	g_{Tc}	$g_A \neq g_C \neq g_G \neq g_T$
C	g_{Aa}	-	g_{Gd}	g_{Te}	
G	g_{Ab}	g_{Cd}	-	g_{Tf}	
T	g_{Ac}	g_{Ce}	g_{Gf}	-	

Όλα τα προηγούμενα μοντέλα στηρίζονται στις παρακάτω προϋποθέσεις:

1. Όλες οι νουκλεοτιδικές θέσεις αλλάζουν ανεξάρτητα η μία από την άλλη
2. Ο ρυθμός υποκατάστασης είναι σταθερός κατά τη διάρκεια του χρόνου και σε όλες τις εξελικτικές γραμμές
3. Η συχνότητα των νουκλεοτιδίων είναι σε ισορροπία
4. Ο ρυθμός υποκατάστασης είναι ίδιος για όλες τις θέσεις της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και δεν αλλάζει στη διάρκεια του χρόνου

2.3.1.2. Αποστάσεις γάμμα

Η προϋπόθεση σχετικά με τη σταθερότητα του ρυθμού νουκλεοτιδικής υποκατάστασης στις διάφορες θέσεις φαίνεται να είναι η λιγότερη ρεαλιστική από βιολογική άποψη και σπάνια φαίνεται να ισχύει. Στην περίπτωση των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αυτό είναι προφανές αφού κάθε θέση των κωδικονίων έχει διαφορετικό ρυθμό υποκατάστασης. Οι λειτουργικοί περιορισμοί των αμινοξέων στο ενεργό κέντρο των πρωτεϊνών επίσης συμβάλλουν στην απόκλιση του εξελικτικού ρυθμού μεταξύ των νουκλεοτιδικών θέσεων. Επίσης και στα γονίδια rRNA παρατηρείται απόκλιση στο ρυθμό, επειδή τα μεταγραφόμενα μόρια RNA έχουν λειτουργικούς περιορισμούς και σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές από «ποδίσκους» και «θηλιές» που έχουν διαφορετικό ρυθμό υποκατάστασης.

Στατιστικές αναλύσεις του ρυθμού υποκατάστασης σε διαφορετικές νουκλεοτιδικές θέσεις έδειξαν ότι ο ρυθμός ποικίλλει ακολουθώντας την κατανομή γάμμα (Kocher and Wilson 1991; Tamura and Nei 1993; Wakeley 1993, 1994). Η καμπύλη της κατανομής καθορίζεται από την παράμετρο α , που συχνά αναφέρεται ως παράμετρος Γ . Όταν το α τείνει στο άπειρο όλες οι θέσεις εμφανίζουν τον ίδιο ρυθμό υποκατάστασης. Όταν $\alpha = 1$, η καμπύλη είναι εκθετική, που σημαίνει ότι υπάρχει μεγάλη διαφορά στο ρυθμό υποκατάστασης μεταξύ των διαφορετικών νουκλεοτιδικών θέσεων. Όταν $\alpha < 1$, τότε η καμπύλη είναι ακόμα πιο στρεβλή και ένα σημαντικό τμήμα των νουκλεοτιδικών θέσεων είναι πρακτικά αμετάβλητες.

Διάφοροι συγγραφείς έχουν ενσωματώσει στα μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης την παράμετρο Γ . Οι γενετικές αποστάσεις που υπολογίζονται από τα μοντέλα αυτά αναφέρονται ως αποστάσεις γάμμα. Τα μοντέλα που ενσωματώνουν τη παράμετρο Γ είναι γενικά πιο ρεαλιστικά σε σχέση με αυτά που δεν την λαμβάνουν υπόψη, αλλά έχουν μεγαλύτερη διακύμανση σε σχέση με τα τελευταία. Γι αυτό το λόγο δεν δίνουν κατ' ανάγκη καλύτερα αποτελέσματα κατά την κατασκευή φυλογενετικών δένδρων εκτός και αν ο αριθμός των νουκλεοτιδίων είναι πολύ μεγάλος. Για την εκτίμηση του μήκους των φυλογενετικών κλάδων οι αποστάσεις γάμμα δίνουν, γενικά καλύτερα αποτελέσματα (Nei & Kumar, 2000).

2.3.1.3. Επιλογή του πιο κατάλληλου μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης

Για να επιλέξουμε το κατάλληλο μοντέλο εκτίμησης γενετικών αποστάσεων πρέπει να έχουμε υπόψη τα ακόλουθα: Για κάθε σετ δεδομένων, κάθε φορά που προσθέτουμε μια παράμετρο ώστε να προσδώσουμε περισσότερο ρεαλισμό, πρέπει να εκτιμούμε την αντίστοιχη παράμετρο χρησιμοποιώντας τα δεδομένα μας. Όσο περισσότερες παραμέτρους προσθέτουμε (δηλαδή όσο πιο πολύπλοκο μοντέλο επιλέγουμε), τόσο μεγαλύτερη αβεβαιότητα έχουν οι εκτιμήσεις μας γιατί αυξάνει η διακύμανση. Έτσι μπορούμε να διαλέξουμε ένα πιο ρεαλιστικό μοντέλο, αλλά να έχουμε τελικά μεγάλο δειγματοληπτικό σφάλμα και έτσι να χάσουμε σε στατιστική δύναμη. Θα πρέπει λοιπόν να εκτιμήσουμε τον ελάχιστο αριθμό παραμέτρων που να δίνουν μια αξιόπιστη εκτίμηση. Σε σχέση με την τοπολογία των παραγόμενων φυλογενετικών δένδρων, πιο πολύπλοκα μοντέλα εκτίμησης γενετικών αποστάσεων δεν είναι απαραίτητα καλύτερα στο να παράγουν τη σωστή τοπολογία από απλούστερα. Εντούτοις, για την εκτίμηση του μήκους των κλάδων, μοντέλα που ταιριάζουν καλύτερα στα δεδομένα δίνουν πιο αξιόπιστες εκτιμήσεις.

Οι Posada & Crandall (1998), δημιούργησαν το υπολογιστικό πρόγραμμα MODELTEST, με το οποίο μπορεί να γίνει επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης για ένα συγκεκριμένο σετ αλληλουχιακών δεδομένων. Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, τα διάφορα μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης μπορούν να θεωρηθούν ως ειδικές περιπτώσεις του Γενικού Αντιστρεπτού Μοντέλου. Στα μοντέλα αυτά μπορεί να προστεθεί και η παράμετρος Γ καθώς και το ποσοστό των αμετάβλητων θέσεων (I). Το MODELTEST υπολογίζει τις παραπάνω παραμέτρους για

56 διαφορετικά μοντέλα νουκλεοτιδικής υποκατάστασης και υποδεικνύει αυτό που ταιριάζει καλύτερα στα δεδομένα.

2.3.2. Μέθοδοι Φυλογενετικής Ανάλυσης

Η κατασκευή ενός φυλογενετικού δένδρου είναι μια εκτιμητική διαδικασία. Από ένα σύνολο μοριακών δεδομένων που περιέχουν ατελή πληροφορία προσπαθούμε να κάνουμε την καλύτερη εκτίμηση της εξελικτικής ιστορίας. Οι διάφορες μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί επιτυγχάνουν το συγκεκριμένο στόχο με ένα από τους παρακάτω τρόπους: α) καθορίζοντας ένα συγκεκριμένο αριθμό βημάτων (έναν αλγόριθμο) που οδηγεί στον προσδιορισμό ενός δένδρου, ή β) καθορίζοντας ένα κριτήριο για τη σύγκριση εναλλακτικών φυλογενέσεων και επιλογής της καλύτερης (ή των ισότιμα καλύτερων).

Οι καθαρά αλγοριθμικές μέθοδοι συνδυάζουν την εξαγωγή ενός δένδρου και τον προσδιορισμό του προτιμώμενου δένδρου σε ένα βήμα. Οι μέθοδοι αυτές είναι συνήθως υπολογιστικά ταχείες επειδή προχωρούν κατευθείαν προς την τελική λύση χωρίς να χρειάζεται αξιολόγηση ενός μεγάλου αριθμού εναλλακτικών δένδρων.

Η δεύτερη κατηγορία μεθόδων ακολουθεί δύο λογικά βήματα. Το πρώτο βήμα είναι ο καθορισμός ενός βέλτιστου κριτηρίου (που περιγράφεται από μια συνάρτηση) για την αξιολόγηση ενός δεδομένου δένδρου. Το δεύτερο βήμα είναι η χρήση ενός ειδικού αλγόριθμου για τον υπολογισμό της τιμής της συνάρτησης για κάθε δένδρο και για την εύρεση των δένδρων που έχουν την καλύτερη τιμή σύμφωνα με το κριτήριο (μια μέγιστη ή ελάχιστη τιμή κατά περίπτωση). Οι μέθοδοι αυτές έχουν μια λογική καθαρότητα αλλά είναι υπολογιστικά πιο απαιτητικές γιατί έχουν να ερευνήσουν μεταξύ διαφορετικών εναλλακτικών δένδρων και να βρουν αυτό που έχει την καλύτερη τιμή.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται με βάση την κατάταξη που ακολουθούν τα περισσότερα συγγράμματα και διακρίνονται σε μεθόδους ομαδοποίησης γενετικών αποστάσεων, μεθόδους φειδωλότητας και μεθόδους μέγιστης πιθανοφάνειας.

2.3.2.1. Μέθοδοι ομαδοποίησης γενετικών αποστάσεων

Στις μεθόδους ομαδοποίησης γενετικών αποστάσεων, υπολογίζονται όλες οι αποστάσεις για όλα τα ζεύγη των λειτουργικών ταξινομικών μονάδων (OTU), και στη συνέχεια κατασκευάζεται ένα φυλογενετικό δένδρο με τη χρήση ενός αλγορίθμου που βασίζεται σε κάποιες σχέσεις μεταξύ των τιμών των αποστάσεων. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι του Neighbour joining και της ελάχιστης εξέλιξης (minimum evolution).

Μέθοδος Neighbour joining

Η μέθοδος αυτή (Saitou and Nei 1987) ανήκει σε μια κατηγορία μεθόδων που στη βιβλιογραφία αναφέρονται ως μέθοδοι γειτονικότητας (neighborliness methods). Χρησιμοποιεί έναν αλγόριθμο για να υπολογίζει το βραχύτερο εξελικτικά δένδρο. Αυτό επιτυγχάνεται με το να βρίσκει διαδοχικά γειτονικά OTUs που ελαχιστοποιούν το συνολικό μήκος του δένδρου. Συνοπτικά η διαδικασία έχει ως εξής: Ξεκινάει με ένα ακτινωτό δένδρο όπου όλα τα OTUs ενώνονται σε έναν κεντρικό κόμβο A. Στη συνέχεια σχηματίζονται δένδρα όπου δύο OTUs κάθε φορά ενώνονται μέσω ενός νέου κόμβου B, ο οποίος ενώνεται μέσω ενός εσωτερικού κλάδου με τον κόμβο A. Για N OTUs υπάρχουν συνολικά $N(N-1)/2$ διαφορετικά τέτοια δένδρα. Για κάθε δένδρο υπολογίζεται το άθροισμα των μηκών όλων των κλάδων από τη σχέση:

$$S_{12} = \frac{1}{2(N-2)} \sum_{k=3}^N (d_{1k} + d_{2k}) + \frac{1}{2} d_{12} + \frac{1}{N-2} \sum_{3 \leq i < j \leq N} d_{ij}$$

όπου d_{ij} η απόσταση μεταξύ των OTUs i και j . Μεταξύ όλων αυτών των ζευγών γειτονικών OTUs επιλέγεται αυτό που δίνει το βραχύτερο δένδρο. Στη συνέχεια το ζεύγος αυτό θεωρείται ως ένα σύνθετο OTU και κατασκευάζεται μια νέα μήτρα τροποποιημένων γενετικών αποστάσεων μεταξύ αυτού του ζεύγους και των υπολοίπων OTUs. Στη συνέχεια με την ίδια διαδικασία επιλέγεται το επόμενο ζεύγος γειτονικών OTUs που δίνει το βραχύτερο δένδρο. Η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι να βρεθούν όλοι οι εσωτερικοί κλάδοι.

Η μέθοδος αυτή είναι υπολογιστικά πολύ ταχεία και γι' αυτό χρησιμοποιείται ευρύτατα. Είναι μια καθαρά αλγοριθμική μέθοδος και παράγει ένα μοναδικό δένδρο χωρίς να χρησιμοποιεί κάποιο κριτήριο βελτιστοποίησης και γι' αυτό το λόγο έχει υποστεί κριτική από διάφορους συγγραφείς. Από διάφορους (Swofford et al. 1996) προτείνεται να χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό ενός αρχικού δένδρου με βάση το οποίο άλλες μέθοδοι θα ψάχνουν για το καλύτερο δένδρο, και όχι σαν μια μέθοδος που θα επιλέγει το τελικό δένδρο.

Μέθοδος Ελάχιστης Εξέλιξης (Minimum Evolution)

Η μέθοδος αυτή διέπεται από αρχή παρόμοια με της μεθόδου φειδωλότητας που θα αναφερθεί στη συνέχεια. Το καλύτερο δένδρο θεωρείται αυτό που έχει το μικρότερο συνολικό μήκος κλάδων, δηλαδή αυτό στο οποίο έχει παρατηρηθεί η ελάχιστη εξελικτική διαδικασία. Η διαφορά με τη μέθοδο φειδωλότητας είναι ότι το μήκος των κλάδων υπολογίζεται με βάση τις γενετικές αποστάσεις και όχι με βάση τις αλλαγές σε κάθε νουκλεοτιδική θέση.

Έστω ένα άρριζο δένδρο που αποτελείται από n αλληλουχίες και περιέχει $2n-3$ κλάδους που ο καθένας έχει μήκος e_i . Το άθροισμα των μηκών όλων των κλάδων είναι το μήκος L του δένδρου

$$L = \sum_{i=1}^{2n-3} e_i$$

Το δένδρο της ελάχιστης εξέλιξης είναι αυτό που ελαχιστοποιεί το L . Για να βρεθεί το δένδρο αυτό κανονικά θα πρέπει να ελεγχθούν όλες οι διαφορετικές τοπολογίες. Αυτό όμως είναι εξαιρετικά χρονοβόρο για μεγάλο αριθμό αλληλουχιών. Γι' αυτό το λόγο οι Rzhetsky και Nei (1992, 1993) πρότειναν να κατασκευάζεται αρχικά το δένδρο με τη μέθοδο NJ και στη συνέχεια να εξετάζονται μια σειρά από τοπολογίες κοντινές ως προς τη NJ για να βρεθεί ένα δένδρο με μικρότερο μήκος (που ονομάζεται προσωρινό δένδρο ελάχιστης εξέλιξης). Ένα νέο σει τοπολογιών εξετάζεται, κοντινών σ' αυτή του προσωρινού δένδρου (αποκλείοντας όμως τοπολογίες που έχουν προηγουμένως εξετασθεί) μέχρι να βρεθεί ένα δένδρο με ακόμη μικρότερο μήκος. Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι ότου να μην μπορεί να βρεθεί ένα δένδρο με μικρότερο μήκος και έτσι το δένδρο με το μικρότερο μήκος θεωρείται το δένδρο ελάχιστης εξέλιξης. Η θεωρητική

βάση αυτής της στρατηγικής είναι ότι το δένδρο ελάχιστης εξέλιξης είναι γενικά τοπολογικά ίδιο ή πολύ κοντά στο δένδρο NJ όταν ο αριθμός n των αλληλουχιών είναι σχετικά μικρός (Rzhetsky και Nei, 1992) και για αυτό το δένδρο NJ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν αρχή όταν έχουμε μεγάλο αριθμό αλληλουχιών.

2.3.2.2. Μέθοδοι Μέγιστης Φειδωλότητας (Maximum Parsimony)

Στις μεθόδους μέγιστης φειδωλότητας (ΜΦ) αναζητείται η τοπολογία που απαιτεί τον μικρότερο αριθμό εξελικτικών βημάτων (νουκλεοτιδικών αλλαγών όταν πρόκειται για αλληλουχίες DNA) ικανών να εξηγήσουν τις παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των μελετώμενων OTUs. Ανήκουν στις μεθόδους διακριτών χαρακτήρων και η μήτρα δεδομένων είναι ένας πίνακας $i \times j$ όπου i ο αριθμός των OTUs και j ο αριθμός των θέσεων, ενώ σε κάθε σημείο x_{ij} του πίνακα υπάρχει μια κατάσταση του χαρακτήρα (A, C, G, ή T για νουκλεοτιδικές αλληλουχίες). Στις μεθόδους φειδωλότητας χρησιμοποιούνται μόνο οι ποικίλλουσες θέσεις (οι θέσεις που διαφέρουν μεταξύ των OTUs). Από αυτές, οι πληροφοριακές για την εύρεση του πιο φειδωλού δένδρου θέσεις, είναι εκείνες που ένας διαφορετικός χαρακτήρας εμφανίζεται σε δύο τουλάχιστον OTUs. Αυτές οι θέσεις ονομάζονται πληροφοριακές θέσεις φειδωλότητας (parsimony informative sites).

Για κάθε διαφορετική τοπολογία υπολογίζεται το συνολικό μήκος του δένδρου που είναι απλά το άθροισμα των αλλαγών σε κάθε κλάδο. Το δένδρο με το μικρότερο μήκος είναι το πιο φειδωλό και ονομάζεται δένδρο μέγιστης φειδωλότητας (maximum parsimony tree). Συχνά, δύο ή περισσότερα δένδρα εμφανίζουν τον ίδιο ελάχιστο αριθμό αλλαγών και έτσι δεν μπορεί να εξαχθεί ένα μοναδικό δένδρο. Τέτοια δένδρα ονομάζονται εξίσου φειδωλά (equally parsimonious).

Για μικρό αριθμό OTUs είναι δυνατός ο υπολογισμός του μήκους όλων των διαφορετικών τοπολογιών ώστε να επιλεγεί η πιο φειδωλή. Αυτός ο τρόπος αναζήτησης του πιο φειδωλού δένδρου ονομάζεται πλήρης αναζήτηση (exhaustive search). Για μεγάλο αριθμό OTUs αυτός ο τύπος αναζήτησης είναι πρακτικά αδύνατος καθώς ο αριθμός των διαφορετικών τοπολογιών αυξάνει εκθετικά με τον αριθμό των OTUs. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται άλλοι αλγόριθμοι αναζήτησης όπως η μέθοδος της αναδιάταξης κλάδων (branch-and-bound method των Hendy και Penny 1982) και η ευρετική αναζήτηση (heuristic search). Υπάρχουν διαφορετικές εκδοχές μεθόδων

μέγιστης φειδωλότητας, ακόμα και μόνο για μοριακά δεδομένα, αλλά γενικά μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: στις μη σταθμισμένες (unweighted) και στις σταθμισμένες (weighted). Στις μη σταθμισμένες μεθόδους φειδωλότητας κάθε αλλαγή θεωρείται ότι μπορεί να συμβεί σε οποιαδήποτε κατεύθυνση με την ίδια ή σχεδόν την ίδια πιθανότητα. Όμως στην πραγματικότητα αυτό δεν ισχύει πάντα, για παράδειγμα οι μεταπτώσεις παρατηρούνται συχνότερα από τις μεταστροφές. Είναι επομένως λογικό να δοθούν διαφορετικά βάρη σε διαφορετικού τύπου υποκαταστάσεις κατά τον υπολογισμό του μήκους ενός δένδρου. Οι μέθοδοι φειδωλότητας που ενσωματώνουν αυτή τη λογική ονομάζονται σταθμισμένες (weighted).

Εάν δεν υπάρχει ομοπλασία στα δεδομένα και ο αριθμός των νουκλεοτιδίων (n) που εξετάζονται είναι πολύ μεγάλος, τότε οι μέθοδοι μέγιστης φειδωλότητας αναμένεται να δώσουν τη σωστή τοπολογία. Στην πραγματικότητα, όμως, υπάρχει συνήθως ομοπλασία και το n είναι σχετικά μικρό. Σ' αυτή την περίπτωση η μέθοδος δίνει λανθασμένη τοπολογία. Επίσης, αν ο εξελικτικός ρυθμός διαφέρει στις διάφορες εξελικτικές γραμμές, η μέγιστη φειδωλότητα δίνει λανθασμένη τοπολογία ακόμα και αν το n είναι άπειρο. Κάτω από ορισμένες συνθήκες αυτό μπορεί να συμβεί ακόμα και αν ο εξελικτικός ρυθμός είναι σταθερός. Σ' αυτή την περίπτωση οι μακριοί κλάδοι (ή οι βραχείς) του αληθινού δένδρου τείνουν να «έλκονται» μεταξύ τους στο κατασκευασμένο δένδρο. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται έλξη των μακριών κλάδων (long branch attraction) (Hendy and Penny, 1989) ή έλξη των βραχέων κλάδων (short-branch attraction) (Nei 1996).

Παρόλα αυτά, ένα βασικό πελοπέκτημα των μεθόδων μέγιστης φειδωλότητας είναι ότι δεν προϋποθέτουν κάποιο μαθηματικό μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης, όπως συμβαίνει στις μεθόδους ομαδοποίησης γενετικών αποστάσεων και μέγιστης πιθανοφάνειας.

2.3.2.3. Μέθοδοι Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood)

Οι μέθοδοι μέγιστης πιθανοφάνειας (ΜΠ) υπολογίζουν την πιθανότητα να παρατηρήσουμε τα δεδομένα σε σχέση με ένα δοσμένο δένδρο και ένα συγκεκριμένο μοντέλο αλλαγής χαρακτήρων (π.χ. νουκλεοτιδικής υποκατάστασης για αλληλουχίες DNA). Αυτό συνήθως γράφεται ως εξής $L = P(D|H)$, δηλαδή η πιθανότητα L να παρατηρήσουμε τα δεδομένα D για δοσμένη συγκεκριμένη εξελικτική υπόθεση H . Ο

σκοπός των μεθόδων ΜΠ είναι να βρουν το δένδρο με τη μεγαλύτερη τιμή πιθανοφάνειας L . Επειδή η τιμή αυτή είναι συνήθως πολύ μικρή χρησιμοποιείται ο λογάριθμός της.

Ο υπολογισμός της πιθανότητας γίνεται για κάθε νουκλεοτιδική θέση χωριστά από τη στιγμή που θεωρούμε ότι κάθε θέση εξελίσσεται ανεξάρτητα. Για να υπολογιστεί η πιθανότητα για κάποια συγκεκριμένη θέση, πρέπει να ληφθούν υπόψη όλα τα εξελικτικά σενάρια με βάση τα οποία οι χαρακτήρες των αλληλουχιών των κορυφών του δένδρου θα μπορούσαν να είχαν εξελιχθεί. Προφανώς, κάποια από τα σενάρια είναι πιο πιθανά από άλλα, αλλά κάθε σενάριο έχει κάποια πιθανότητα να παράγει ένα συγκεκριμένο πρότυπο παρατηρούμενων νουκλεοτιδίων. Έτσι η συνολική πιθανότητα για κάθε θέση είναι ίση με το άθροισμα των πιθανοτήτων όλων των διαφορετικών σεναρίων. Αφού υπολογιστούν οι πιθανότητες για κάθε θέση, η συνολική πιθανότητα δίνεται από είναι το γινόμενο των τιμών πιθανοφάνειας κάθε θέσης.

Οι μέθοδοι ΜΠ δεν εκτιμούν την τοπολογία ενός δένδρου αλλά μόνο το μήκος των κλάδων του. Απλά επιλέγεται η τοπολογία με τη μεγαλύτερη τιμή πιθανοφάνειας, υποθέτοντας ότι η τοπολογία με την καλύτερη εκτίμηση του μήκους των κλάδων είναι και η σωστή. Οι μέθοδοι αυτές είναι υπολογιστικά εξαιρετικά απαιτητικές και για μεγάλο σχετικά αριθμό αλληλουχιών είναι αδύνατη η εξέταση όλων των διαφορετικών τοπολογιών. Έτσι χρησιμοποιούνται διάφοροι αλγόριθμοι αναζήτησης, όπως και στις μεθόδους φειδωλότητας, οι οποίοι όμως δεν εγγυώνται την εύρεση του δένδρου με τη μέγιστη τιμή πιθανοφάνειας. Πάντως, από τη στιγμή που οι μέθοδοι ΜΠ, όπως και οι μέθοδοι ΜΦ τείνουν να δίνουν λανθασμένες τοπολογίες όταν ο αριθμός των αλληλουχιών είναι μεγάλος και το μήκος της αλληλουχίας μικρό, δεν έχει νόημα να ξοδεύεται υπερβολικός υπολογιστικός χρόνος για να την αναζήτηση του καλύτερου δένδρου. Επιπλέον, από τη στιγμή που ο αριθμός των αλληλουχιών είναι μεγάλος και το μήκος της αλληλουχίας σχετικά μικρό, ένα μαθηματικό μοντέλο που ερμηνεύει πιο σωστά τα δεδομένα δεν παράγει κατ' ανάγκη καλύτερη τοπολογία απ' ότι ένα απλούστερο μοντέλο.

2.3.2.4. Στατιστικός έλεγχος των φυλογενετικών δένδρων

Όταν κατασκευάζεται ένα φυλογενετικό δένδρο είναι σημαντικό να γνωρίζουμε την αξιοπιστία του. Πολλές φορές, διαφορετικές φυλογενετικές μέθοδοι, παράγουν

διαφορετική τοπολογία για το ίδιο σύνολο δεδομένων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός, ότι όταν υπάρχει ομοπλασία, διαφορετικές νουκλεοτιδικές θέσεις θα στηρίζουν διαφορετικές τοπολογίες. Έτσι, το ποιο δένδρο θα στηρίζεται από τα δεδομένα εξαρτάται από τους χαρακτήρες που έχουν επιλεγεί, και οι οποίοι είναι ένα δείγμα του γονιδιώματος των οργανισμών που μελετούνται. Από τη στιγμή, λοιπόν που η φυλογένεση στηρίζεται σε ένα δείγμα θα συνοδεύεται και από το αντίστοιχο δειγματοληπτικό σφάλμα.

Ένας τρόπος υπολογισμού του δειγματοληπτικού σφάλματος είναι με πολλαπλά δείγματα από τον «πληθυσμό» που μελετάται και σύγκριση των εκτιμήσεων από τα διαφορετικά δείγματα. Αυτό, όμως, όσον αφορά τη φυλογενετική ανάλυση, κοστίζει πολύ σε χρόνο και χρήμα. Επιπλέον, τα φυλογενετικά δένδρα είναι πολύπλοκες κατασκευές και είναι εξαιρετικά δύσκολο να αναπτυχθούν εξισώσεις για να υπολογίζουν το όριο εμπιστοσύνης μιας φυλογένεσης. Ένας εύκολος τρόπος για να εκτιμηθεί το δειγματοληπτικό σφάλμα, είναι να παρθούν δείγματα από τα δεδομένα (ψευδοδείγματα) και με βάση την κατανομή των μέσων των (ψευδο-)δειγμάτων να υπολογιστούν τα όρια εμπιστοσύνης.

Αυτή τη λογική ακολουθεί η μέθοδος του bootstrap, που είναι από τις πλέον χρησιμοποιούμενες στη φυλογένεση. Με τη μέθοδο bootstrap (Felsenstein 1985), αρχικά κατασκευάζεται ένα δένδρο (με κάποια μέθοδο κατασκευής φυλογενετικών δένδρων) από το σύνολο των δεδομένων. Στη συνέχεια, επιλέγεται ο ίδιος αριθμός νουκλεοτιδικών θέσεων, με τυχαία δειγματοληψία και επανατοποθέτηση, από το σύνολο των δεδομένων. Έτσι, κάποιες θέσεις μπορεί να επιλεγούν δύο ή περισσότερες φορές και κάποιες καμία. Αυτές οι τυχαία επιλεγμένες θέσεις αποτελούν ένα νέο σετ δεδομένων, με βάση το οποίο κατασκευάζεται ένα νέο δένδρο με την ίδια μέθοδο κατασκευής, όπως το αρχικό. Κάθε εσωτερικός κλάδος του αρχικού δένδρου που δίνει ίδιο διαχωρισμό των αλληλουχιών με αυτό του bootstrap παίρνει τιμή 1, αλλιώς 0. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές εκατοντάδες φορές, και τελικά υπολογίζεται το επί τοις εκατό ποσοστό των φορών που κάθε εσωτερικός κλάδος παίρνει τιμή 1. Αυτό το ποσοστό ονομάζεται τιμή bootstrap. Γενικά, όταν αυτή η τιμή είναι μεγαλύτερη του 95%, τότε ο αντίστοιχος εσωτερικός κλάδος θεωρείται ότι έχει πολύ καλή στατιστική υποστήριξη.

Για την εφαρμογή του ελέγχου bootstrap, πρέπει να κατασκευάζεται ένα φυλογενετικό δένδρο από κάθε σετ δεδομένων, συνεπώς, ο χρόνος που χρειάζεται για να κατασκευαστεί ένα δένδρο είναι μια σημαντική παράμετρος. Γι' τούτο το λόγο ο έλεγχος αυτός χρησιμοποιείται κατά κόρο για δένδρα neighbour-joining, αλλά είναι αρκετά χρονοβόρος για τις μεθόδους μέγιστης φειδωλότητας και μέγιστης

πιθανοφάνειας, ακόμα και αν χρησιμοποιούνται ταχείς αλγόριθμοι εύρεσης του καλύτερου δένδρου.

2.3.2.5. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των διαφόρων μεθόδων κατασκευής δένδρων

Υπάρχουν διάφορα κριτήρια, με βάση τα οποία, μπορεί κάποιος να αξιολογήσει τις διάφορες μεθόδους κατασκευής φυλογενετικών δένδρων. Τα πιο σημαντικά είναι α) η υπολογιστική ταχύτητα, β) η συνέπεια στην εκτίμηση μιας τοπολογίας, γ) οι στατιστικοί έλεγχοι των φυλογενετικών δένδρων, δ) η πιθανότητα εύρεσης της αληθινής τοπολογίας και ε) η αξιοπιστία των εκτιμήσεων των μηκών των κλάδων.

Η υπολογιστική ταχύτητα είναι συνάρτηση του αλγόριθμου κάθε μεθόδου και του υπολογιστή που χρησιμοποιείται. Η μέθοδος NJ είναι η πιο ταχεία. Οι μέθοδοι ME, MP, ML είναι πιο αργές, ιδιαίτερα για μεγάλο αριθμό αλληλουχιών και όταν πρέπει να εξετάσουν όλες τις πιθανές τοπολογίες. Για κάποιες μεθόδους (ME) έχουν κατασκευαστεί πιο ταχείς αλγόριθμοι που είναι εξίσου αποτελεσματικοί στην εύρεση της σωστής τοπολογίας όπως και η πλήρης αναζήτηση (exhaustive search).

Μια μέθοδος κατασκευής δένδρων καλείται «συνεπής εκτιμητής» όταν τείνει στη σωστή τοπολογία όσο αυξάνει ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων νουκλεοτιδίων (Felsenstein 1978). Οι μέθοδοι NJ, ME, LS είναι συνεπείς εκτιμητές εάν χρησιμοποιούνται αμερόληπτες εκτιμήσεις των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ως γενετικές αποστάσεις. Το ίδιο συμβαίνει και με τη ML όταν χρησιμοποιείται το σωστό μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης. Αντιθέτως, η MP, είναι κάποιες φορές ασυνεπής.

Οι στατιστικοί έλεγχοι των φυλογενετικών δένδρων που παράγονται με τις διάφορες μεθόδους είναι αξιόπιστοι για τις μεθόδους NJ και ME. Για τις μεθόδους MP και ML υπάρχουν αρκετές περιπλοκές. Σ' αυτές τις περιπτώσεις ο καλύτερος στατιστικός έλεγχος των παραγόμενων δένδρων είναι το bootstrap test του Felsenstein, από τη στιγμή που δεν προκύπτουν προβλήματα ασυνέπειας.

Η πιθανότητα εύρεσης της σωστής τοπολογίας είναι το πιο σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης των διαφόρων μεθόδων, αλλά συνήθως μπορεί να μελετηθεί μόνο με προσομοιώσεις σε υπολογιστή. Μέχρι σήμερα έχουν γίνει πολλές τέτοιες μελέτες, αλλά τα αποτελέσματα δεν είναι τόσο ξεκάθαρα. Αλλά είναι πλέον σαφές ότι καμιά μέθοδος

δεν είναι τέλεια και υπάρχουν περιπτώσεις που μία μέθοδος λειτουργεί καλύτερα από άλλες. Και οι τρεις ομάδες μεθόδων δίνουν γενικά τις ίδιες ή παρόμοιες τοπολογίες όταν δεν διαφέρει πολύ ο εξελικτικός ρυθμός μεταξύ των διαφόρων εξελικτικών γραμμών (Hasegawa et al., 1991; Nei et al. 1998). Οι προσομοιώσεις σε H/Y έδειξαν επίσης ότι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την ακρίβεια του παραγόμενου δένδρου είναι ο αριθμός των νουκλεοτιδικών θέσεων που εξετάζονται. Αν ο αριθμός αυτός είναι μικρός δεν μπορούν να παραχθούν αξιόπιστα δένδρα. Σε πραγματικά δεδομένα, όπου ο βαθμός της νουκλεοτιδικής διαφοροποίησης δεν είναι πολύ υψηλός και χρησιμοποιούνται πολλές αλληλουχίες, οι NJ, MP, ML αναμένεται να δώσουν την ίδια ή παρόμοιες τοπολογίες. Όταν υπάρχουν τοπολογικές διαφορές αυτές οφείλονται σε εσωτερικούς κλάδους που έχουν χαμηλές τιμές bootstrap. Σ' αυτή την περίπτωση και οι τρεις ομάδες μεθόδων θα δίνουν δένδρα με παρόμοιες τιμές bootstrap και ο μόνος τρόπος για να αυξηθεί η αξιοπιστία των δένδρων είναι να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερος αριθμός νουκλεοτιδίων ή διαφορετικά γονίδια.

Τέλος, όσον αφορά την εκτίμηση του μήκους των κλάδων, από τη στιγμή που έχει παραχθεί η σωστή τοπολογία, είναι σχετικά εύκολη η εκτίμηση. Θεωρητικά ML, NJ, ME δίνουν πιο αξιόπιστες εκτιμήσεις του μήκους των κλάδων απ' ότι η MP που τείνει να υποεκτιμά.

2.3.3. Έλεγχος των δεδομένων για ομοπλασία

Ένα από τα πιο συνηθισμένα προβλήματα που υπεισέρχεται στις φυλογενετικές αναλύσεις είναι αυτό της ομοπλασίας των αλληλουχιών. Επειδή ο αριθμός των νουκλεοτιδικών θέσεων που μπορούν να αλλάξουν είναι πεπερασμένος, αυξανόμενης της γενετικής απόστασης, αυξάνει η πιθανότητα να συμβεί υποκατάσταση στην ίδια θέση όποτε κάποια στιγμή φθάνουμε σε κορεσμό (δηλαδή κάθε νέα υποκατάσταση συμβαίνει πάνω σε προηγούμενη). Έτσι, από ένα σημείο και μετά σταματάει να είναι γραμμική η σχέση χρόνου και γενετικής απόστασης και αλλοιώνεται η φυλογενετική πληροφορία. Οι διάφορες μέθοδοι υπολογισμού των γενετικών αποστάσεων διορθώνουν ως ένα βαθμό για πολλαπλές μεταλλάξεις, αλλά για πολύ υψηλό ποσοστό ομοπλασίας τείνουν αν υποεκτιμούν την πραγματική γενετική απόσταση και γενικά μειώνεται η αξιοπιστία των εκτιμήσεων αυτών.

Πριν προχωρήσουμε σε φυλογενετική ανάλυση είναι σημαντικό να ελέγξουμε πόση ομοπλασία υπάρχει στα δεδομένα. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται διάφοροι

τρόποι. Ο λόγος μεταπτώσεων / μεταστροφών (R) αποτελεί ένδειξη του βαθμού ομοπλασίας, αλλά δεν παρέχει ικανοποιητική πληροφορία. Είναι γνωστό, ότι στο mtDNA οι μεταπτώσεις συμβαίνουν με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τις μεταστροφές, έτσι στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης δύο αλληλουχιών, ο λόγος R είναι υψηλός και μειώνεται με την αύξηση της γενετικής απόστασης. Ένας άλλος τρόπος, είναι να κατασκευαστεί ένα διάγραμμα διασποράς, για τα ζεύγη των απλοτύπων, ενός τύπου υποκαταστάσεων έναντι κάποιου άλλου, ώστε να γίνεται εκτίμηση του σχετικού ρυθμού των αλλαγών. Εάν ένας τύπος υποκαταστάσεων μειώνεται σε συχνότητα σε σχέση με έναν άλλο, αυτό υποδεικνύει πολλαπλές αλλαγές σε μία νουκλεοτιδική θέση και κάποιο βαθμό κορεσμού σε σχέση με το βαθμό αλλαγής (Mindell & Thacker 1996). Μια άλλη μέθοδος εκτίμησης του βαθμού κορεσμού των αλληλουχιών προτάθηκε από τους Philippe et al. (1994) και στηρίζεται στην αρχή της μέγιστης φειδωλότητας. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή κατασκευάζεται ένα διάγραμμα διασποράς του εκτιμώμενου αριθμού των υποκαταστάσεων μεταξύ όλων των ζευγών των αλληλουχιών, όπως αυτές υπολογίζονται από έναν αλγόριθμο μέγιστης φειδωλότητας (patristic distances στο PAUP), ως προς τον πραγματικό αριθμό των διαφορών μεταξύ των αλληλουχιών. Όσο πιο κοντά μεταξύ τους είναι αυτές οι τιμές, τόσο πλησιέστερα στη διαγώνιο θα είναι η καμπύλη που σχηματίζεται από τα ζεύγη των τιμών. Αν όμως υπάρχει μεγάλος βαθμός ομοπλασίας, τόσο η καμπύλη θα αποκλίνει από τη διαγώνιο και θα τείνει να παραλληλιστεί με τον άξονα των εκτιμώμενων αποστάσεων.

2.3.4. Έλεγχος του εξελικτικού ρυθμού (Relative Rate Tests)

Για να ελεγχθεί αν κάποιοι κλάδοι ενός φυλογενετικού δένδρου εξελίσσονται ταχύτερα από άλλους, χρησιμοποιούνται οι έλεγχοι εξελικτικού ρυθμού. Έχουν προταθεί διάφοροι έλεγχοι που συγκρίνουν τον εξελικτικό ρυθμό μεταξύ ομόλογων αλληλουχιών. Οι έλεγχοι αυτοί προσπαθούν να απαντήσουν δύο σχετιζόμενα βιολογικά ερωτήματα. Το ένα ερώτημα αφορά το αν κάποια εξελικτική γραμμή εξελίσσεται γρηγορότερα από κάποια άλλη και αυτό μπορεί να ελεγχθεί με τους ελέγχους σχετικού ρυθμού (Relative Rate tests). Το άλλο ερώτημα έχει να κάνει με το αν ένα σύνολο αλληλουχιών εξελίσσεται σύμφωνα με τις προβλέψεις του μοριακού ρολογιού και γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιούνται οι έλεγχοι ετερογένειας ρυθμού (rate heterogeneity tests) ή αλλιώς, έλεγχοι του μοριακού ρολογιού. Αυτοί οι δύο τύποι ελέγχων δεν πρέπει να συγχέονται καθώς η απόρριψη ενός κανονικού μοριακού ρολογιού για το σύνολο μιας ομάδας

αλληλουχιών μπορεί να μην οφείλεται σε διαφορές στον εξελικτικό ρυθμό μεταξύ γραμμών με συγκεκριμένο ενδιαφέρον, ενώ παρόμοιοι μέσοι εξελικτικοί ρυθμοί δύο γενεαλογικών γραμμών δεν εγγυώνται ένα μοριακό ρολόι εντός κάθε γραμμής, και πολύ λιγότερο για τη εξωομάδα.

Οι έλεγχοι αυτοί βασίζονται κυρίως σε τρεις διαφορετικές στατιστικές προσεγγίσεις:

1) Των ελαχίστων τετραγώνων (Felsenstein 1984, 1988) που χρησιμοποιούνται και για τους ελέγχους του μοριακού ρολογιού (Takezaki, Rzhetsky & Nei 1995; Uyenooyama 1995) και για τους ελέγχους σχετικού ρυθμού (Wu & Li 1985; Li & Bousquet 1992; Takezaki, Rzhetsky & Nei 1995). Αυτή η προσέγγιση έχει αρκετά ισχυρά πλεονεκτήματα: επιτρέπει την εφαρμογή μιας μεγάλης κατηγορίας μοντέλων, είναι υπολογιστικά ταχεία, και μπορεί εύκολα να γενικευθεί για μεγάλο αριθμό αλληλουχιών, ακόμα και για παραφυλετικές ομάδες και όταν η φυλογένεση δεν είναι απόλυτα προσδιορισμένη.

2) έλεγχος χ^2 στις τιμές πιθανοφάνειας με ή χωρίς την αποδοχή ενός μοριακού ρολογιού (Felsenstein 1988). Ο έλεγχος χ^2 μπορεί να εφαρμοσθεί και σε ελέγχους σχετικού ρυθμού σε τρεις αλληλουχίες, όπου μία είναι εξωομάδα για τις άλλες δύο (Muse & Weir 1992).

3) Μη παραμετρικοί έλεγχοι σχετικού ρυθμού (Gu and Li 1992; Tajima 1993). Αυτή η προσέγγιση δεν λαμβάνει υπόψη κάποιο συγκεκριμένο μοντέλο, και έτσι αγνοεί πολλαπλές υποκαταστάσεις οι οποίες αλλοιώνουν την εικόνα των παρατηρούμενων αλλαγών. Επιπλέον δεν μπορεί να γενικευθεί για παραπάνω από τρεις αλληλουχίες.

Για να ελεγχθεί αν οι αλληλουχίες του *M. kotschy* εξελίσσονται με ομοιόμορφο ρυθμό χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω έλεγχοι:

α) Οι έλεγχοι σχετικού ρυθμού δύο ομάδων (two cluster relative rate test) των Takezaki, Rzhetsky & Nei (1995) που είναι ενσωματωμένο στο πρόγραμμα PHYLTEST 2.0 του Kumar. Μ' αυτό τον έλεγχο μπορεί να ελεγχθεί η διαφορά στον εξελικτικό ρυθμό μεταξύ δύο γενεαλογικών γραμμών, σε σχέση με μια άλλη γραμμή που είναι εξωομάδα. Κάθε γενεαλογική γραμμή μπορεί να περιέχει περισσότερες από μία αλληλουχίες. Εάν L_a και L_b είναι οι μέσοι όροι του παρατηρούμενου αριθμού υποκαταστάσεων ανά θέση (δηλαδή τα μήκη των κλάδων) από τον κοινό πρόγονο των

ομάδων A και B, τότε $L_a = L_b$ είναι η μηδενική υπόθεση όταν ισχύει ένα σταθερό μοριακό ρολόι ($\delta = L_a - L_b = 0$). Εκτιμώντας τη διακύμανση του δ , μπορούμε να ελέγξουμε την απόκλιση του από το μηδέν (και κατά συνέπεια τη σταθερότητα του εξελικτικού ρυθμού μεταξύ των γραμμών A και B) με ένα two tailed normal deviate test.

β) ο έλεγχος του μήκους των κλάδων (branch length test) των Takezaki, Rzhetsky & Nei (1995) που είναι ενσωματωμένος στο πρόγραμμα LINTRE της Takezaki. Σε αυτό τον έλεγχο εξετάζεται η απόκλιση του μήκους του κλάδου (από τη ρίζα μέχρι την κορυφή) κάθε αλληλουχίας από το μέσο όρο όλων των αλληλουχιών εκτός της εξωομάδας. Όπως και στην περίπτωση του ελέγχου σχετικού ρυθμού δύο ομάδων (two cluster test), η απόκλιση του δ από το μηδέν μπορεί να εξεταστεί με ένα two tailed normal deviate test. Η εκτίμηση του μήκους των κλάδων γίνεται με τη κοινή μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (ordinary least square method).

2.3.5. Προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες αναλύσεις της παρούσας διατριβής.

Όνομασία	Εφαρμογή	Προέλευση
MEGA 2.0	Υπολογισμός γενετικών αποστάσεων p, Jukes-Cantor, Kimura, Tamura-Nei Κατασκευή δένδρων Neighbor-Joining, Minimum evolution.	Kumar et al., 2001
PAUP 4.0	Κατασκευή δένδρων Maximum Parsimony, Maximum likelihood	Swofford
MODELTEST	Υπολογισμός του κατάλληλου μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης	Posada & Crandall, 1998
LINTRE	Έλεγχος του μήκους των κλάδων (branch length test)	Takezaki
PHYLTEST 2.0	Έλεγχος σχετικού εξελικτικού ρυθμού δύο ομάδων (two cluster relative rate test)	Kumar
DnaSP 3.50	Υπολογισμός της νουκλεοτιδικής ποικιλότητας	Rozas, J & R. Rozas, 1999
GAMMA	Υπολογισμός γάμμα παραμέτρου (α)	Gu & Zhang, 1997
GCG	Στοίχιση αλληλουχιών (alignment)	

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έγινε προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας 515 βάσεων της COI από 118 διαφορετικά άτομα. Από αυτά, τα 105 ανήκαν στο *M. kotschy* και αντιπροσωπεύουν 43 διαφορετικούς πληθυσμούς, τα 11 σε άλλα είδη της οικογένειας Gekkonidae (5 άτομα *Cyrtopodion scaber*, 1 άτομο *Hemidactylus turcicus* και 5 άτομα *Tarentola mauritanica*) και 2 άτομα από το είδος *Podarcis erhardii* (οικογένεια Lacertidae). Από τις 105 αλληλουχίες του *M. kotschy* προέκυψαν 63 διαφορετικοί απλότυποι. Στον πίνακα 3.1 δίδεται ο κωδικός κάθε απλότυπου, ο αριθμός των ατόμων που αντιστοιχούν σε κάθε απλότυπο και η περιοχή από την οποία συλλέχθηκαν τα δείγματα. Δεν υπάρχουν πληθυσμοί που να μοιράζονται τον ίδιο απλότυπο, εκτός από τους πληθυσμούς της Βόρειας Ελλάδας που περιέχουν ένα κοινό απλότυπο. Έτσι, κάθε διαφορετικός απλότυπος εμφανίζεται εντός ενός μόνο πληθυσμού. Στη συνέχεια όλες οι αναλύσεις δεν περιλαμβάνουν τους απλότυπους της *P. erhardii*.

3.1. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Μεταξύ των 63 διαφορετικών απλοτύπων του *M. kotschy* το 38,4% των νουκλεοτιδικών θέσεων (192 από τις 515) είναι μεταβλητές, έχουν δηλαδή υποστεί τουλάχιστον μία νουκλεοτιδική υποκατάσταση. Η συντριπτική πλειοψηφία των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων είναι σιωπηλές (98%) ενώ μόνο σε 4 θέσεις (2%) προκαλείται αμινοξική υποκατάσταση. Οι περισσότερες αλλαγές παρατηρούνται στην 3^η θέση των κωδικονίων (85,9% των μεταβλητών θέσεων) και οι υπόλοιπες στην 1^η θέση, ενώ δεν παρατηρείται καμιά αλλαγή 2^{ης} θέσης. Είναι χαρακτηριστικό ότι η 3^η θέση όλων των κωδικονίων (εκτός μίας-θέση 378 της αλληλουχίας) έχουν υποστεί τουλάχιστον μία υποκατάσταση. Όλες οι υποκαταστάσεις 3^{ης} θέσης είναι σιωπηλές, λόγω του εκφυλισμένου μιτοχονδριακού γενετικού κώδικα. Από τις υποκαταστάσεις της 1^{ης} θέσης, οι περισσότερες είναι σιωπηλές και είναι αποκλειστικά μεταπτώσεις μεταξύ

Πίνακας 3.1: Οι κωδικές ονομασίες των διαφορετικών απλοτύπων που βρέθηκαν, ο αριθμός των ατόμων που αντιστοιχούν σε κάθε απλότυπο, η περιοχή από την οποία συλλέχθηκαν τα αντίστοιχα άτομα και ο α/α κάθε περιοχής που αντιστοιχεί στον πίνακα 2.1 και την εικόνα 2.1.

Κωδικός απλοτύπου	άτομα	Περιοχή	α/α περιοχής
NGreec1_8	1	Κοκάρτζα Κιλκίς	1
Ngreec2_1	1	Σφενδάμη Πιερίας	2
NGreec1_8	2		
	1	Καταχάς Πιερίας	3
	4	Κεφαλόβρυσο Ελασσώνας	4
Alon_1	1	ν. Αλόνησος	5
Perist_1	1	ν. Περιστερά	6
Spelop_1	1	Στούπα (Ν. Πελ/νησος)	7
Npelop1_1	1	Νεράτζα (Β. Πελ/νησος)	8
Npelop2_2	2		
Npelop3_1	1		
Aegina_1	1	ν. Αίγινα	9
Tinos1_4	4	ν. Τήνος	10
Tinos2_1	1		
Kythir1_1	1	ν. Κύθηρα	11
Kythir2_1	1		
AntiKr_5	5	ν. Αντικήθυρα	12
Pontik_1	1	ν. Ποντικονήσι	13
Petalid_2	2	ν. Πεταλίδα	14
Psilor_4	4	Ψηλορείτης (Κρήτη)	15
Glaron	1	ν. Γλαρονήσι	16
Avgo	5	ν. Αυγό	17
Psira_1	1	ν. Ψείρα	18
Chrysi	5	ν. Χρυσή	19
Gavdos1_1	1	ν. Γαύδος	20
Gavdos2_4	4		
Gavdos3_1	1		
Milos1_2	2	ν. Μήλος	21
Milos2_1	1		
Milos3_2	2		
Milos4_1	1		
Serif1_2	2	ν. Σέριφος	22
Serif2_4	4		
Paros1_6	6	ν. Πάρος	23

Πίνακας 3.1 (συνέχεια): Οι κωδικές ονομασίες των διαφορετικών απλοτύπων που βρέθηκαν, ο αριθμός των ατόμων που αντιστοιχούν σε κάθε απλότυπο, η περιοχή από την οποία συλλέχθηκαν τα αντίστοιχα άτομα και ο α/α κάθε περιοχής που αντιστοιχεί στον πίνακα 2.1 και την εικόνα 2.1.

Amorgos_1	1	ν. Αμοργός	24
Astyp1_1	1	ν. Αστυπάλαια	25
Astyp2_2	2		
Astyp3_1	1		
Astyp4_1	1		
TR1_1	1	Τρία νησιά (ν. Πεταλίδα)	26
TR2_1	1		
Sofr1_1	1	ν. Σοφράνο	27
Sofr2_1	1		
Astak1_1	1	ν. Αστακίδα	28
Astak2_1	1		
Kasos1_1	1	ν. Κάσος	29
Kasos2_3	3		
Kasos3_1	1		
Karpat1_1	1	ν. Κάρπαθος	30
Karpat2_1	1		
Karpat3_1	1		
Prason1_1	1	ν. Πρασονήσι (Ρόδος)	31
Prason2_1	1		
Fournoi_1	1	ν. Φούρνοι	32
Marathi_1	1	ν. Μαράθι	33
A_giorg_1	1	ν. Άγιος Γεώργιος	34
Kastell_1	1	ν. Καστελόριζο	35
Akscheh_1	1	Akschehir	36
Silifke_1	1	Σελεύκεια	37
Adana_1	1	Άδανα	38
Israel_1	1	Ισραήλ	39
Cyprus1_1	1	Κύπρος	40
Cyprus2_1	1		41
Cyprus3_1	1		42
Cyprus4_1	1		43
Cscab_5c	5	<i>C. scaber</i>	
Hture_ly1	1	<i>H. turcicus</i>	
TarTun_2	2	<i>T. mauritanica</i> Τυνησία	
TarCret_1	1	<i>T. mauritanica</i> Ντία	
TarKef_2	2	<i>T. mauritanica</i> Κεφαλλονιά	

T (θυμίνης) και C (κυτοσίνης) του αμινοξέος της Λευκίνης. Οι υπόλοιπες 4 υποκαταστάσεις 1^{ης} θέσης προκαλούν αμινοξική αλλαγή. Συγκεκριμένα:

1. στη θέση 55 της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, οι απλότυποι από Μαράθι και Φούρνους έχουν G αντί για A (Βαλίνη αντί για Ισολευκίνη),

2. στη θέση 238, οι απλότυποι από Κύπρο, Φούρνους, Μαράθι, Ισραήλ, Αδανα, Σοφράνο, Τρία Νησιά έχουν A αντί για G (Ισολευκίνη αντί για Βαλίνη)

3. στη θέση 403, οι απλότυποι από Κρήτη και τις γύρω βραχονησίδες έχουν T αντί G (Σερίνη αντί για Αλανίνη)

4. στη θέση 409, οι απλότυποι από τη Χρυσή έχουν A αντί για G (Θρεονίνη αντί για Αλανίνη).

Στον πίνακα 3.2 δίνεται συνοπτικά η πληροφορία για το ποσοστό των μεταβλητών θέσεων και πως αυτές κατανέμονται μεταξύ των θέσεων των κωδικονίων, καθώς και το ποσοστό σιωπηλών και μη σιωπηλών μεταλλαγών, για τους απλοτύπους του *M. kotschy* και για όλους τους απλοτύπους μαζί (εκτός αυτών της *P. erhardii*). Στο Παράρτημα 2 δίνεται το σύνολο των αλληλουχιών καθώς και πίνακας με τις μεταβλητές θέσεις των αντίστοιχων αμινοξικών αλληλουχιών.

Παρόμοια εικόνα ως προς τον νουκλεοτιδικό πολυμορφισμό της COI εμφανίζεται και σε άλλα είδη ζώων. Για παράδειγμα, μεταξύ των 23 ειδών κολεοπτέρων του γένους *Hegeter* από τις Κανάριες νήσους, για ένα τμήμα 438 βάσεων της COI, το 32% των θέσεων είναι πολυμορφικές και από αυτές το 85 % αφορά στις 3^{ες} θέσεις των κωδικονίων και το υπόλοιπο 15% στις 1^{ες} θέσεις (Juan et al., 1996). Ομοίως, για τη *Drosophila obscura* για ένα τμήμα 496 βάσεων της COI, το 27% των θέσεων είναι πολυμορφικές και από αυτές το 88% αφορά υποκαταστάσεις 3^{ης} θέσης (Gleason et al., 1997).

Όσον αφορά τις αμινοξικές υποκαταστάσεις, αυτές είναι ελάχιστες μεταξύ συγγενικών ειδών, επειδή η COI είναι το πιο συντηρητικό μιτοχονδριακό γονίδιο (από αυτά που κωδικοποιούν πρωτεΐνες) λόγω της μεγάλης λειτουργικής σημασίας του πρωτεϊνικού της προϊόντος στην αναπνευστική αλυσίδα. Είναι χαρακτηριστικό ότι μεταξύ ψαριών και αμφιβίων η αμινοξική ομοιότητα είναι 93% (Meyer, 1993).

Πίνακας 3.2: Ποσοστό των μεταβλητών θέσεων στο σύνολο της αλληλουχίας (στις παρενθέσεις οι απόλυτοι αριθμοί), ανά θέση κωδικωνίου για το σύνολο των αντίστοιχων θέσεων και για το σύνολο της αλληλουχίας, καθώς και το ποσοστό σιωπηλών και μη σιωπηλών υποκαταστάσεων για το σύνολο των μεταβλητών θέσεων.

	Ποσοστό μεταβλητών θέσεων στο σύνολο της αλληλουχίας	Ποσοστό μεταβλητών θέσεων ανά θέση κωδικωνίου (1 ^η γραμμή), και ως προς το σύνολο των μεταβλητών θέσεων (2 ^η γραμμή)			Ποσοστό σιωπηλών υποκαταστάσεων ως προς το σύνολο των μεταβλητών θέσεων	Ποσοστό μη σιωπηλών υποκαταστάσεων ως προς το σύνολο των μεταβλητών θέσεων
		1 ^η θέση	2 ^η θέση	3 ^η θέση		
Οι αλληλουχίες του <i>M. kotschy</i>	38,4% (198/515)	16,3% (28/172)	0% (0/172)	99,4% (170/171)	98% (194/198)	2% (4/198)
		14,1% (28/198)	0% (0/198)	85,9% (170/198)		
Όλες οι αλληλουχίες (εκτός <i>P. erhardii</i>)	43,3% (223/515)	26,7% (46/172)	3,5% (6/172)	100% (171/171)	92,4% (206/223)	7,6% (17/223)
		20,6% (46/223)	2,7% (6/223)	76,7% (171/223)		

Υπολογίστηκε η μέση συχνότητα των νουκλεοτιδίων για το σύνολο της αλληλουχίας και ανά κωδικονιακή θέση, για όλους τους απλοτύπους (Πίνακας 3.3). Για το σύνολο της αλληλουχίας, η συχνότητα κάθε νουκλεοτιδίου δεν απέχει ιδιαίτερα πολύ από την κατάσταση ισορροπίας (κάθε νουκλεοτίδιο να έχει συχνότητα 25%). Όμως στην 3^η θέση, η οποία περιέχει και το μεγαλύτερο ποσοστό φυλογενετικά πληροφοριακών θέσεων, η συχνότητα του G είναι αρκετά χαμηλή (περίπου 12%)

Πίνακας 3.3: Μέση συχνότητα των νουκλεοτιδίων ανά κωδικονιακή θέση και στο σύνολο της αλληλουχίας για όλους τους απλοτύπους.

	A	C	G	T	G+C
1^η θέση	23,42	26,39	32,90	17,29	59,29
2^η θέση	13,98	29,74	12,83	43,55	42,57
3^η θέση	31,88	34,94	12,18	20,99	47,12
Σύνολο αλληλουχίας	23,05	30,34	19,32	27,30	49,66

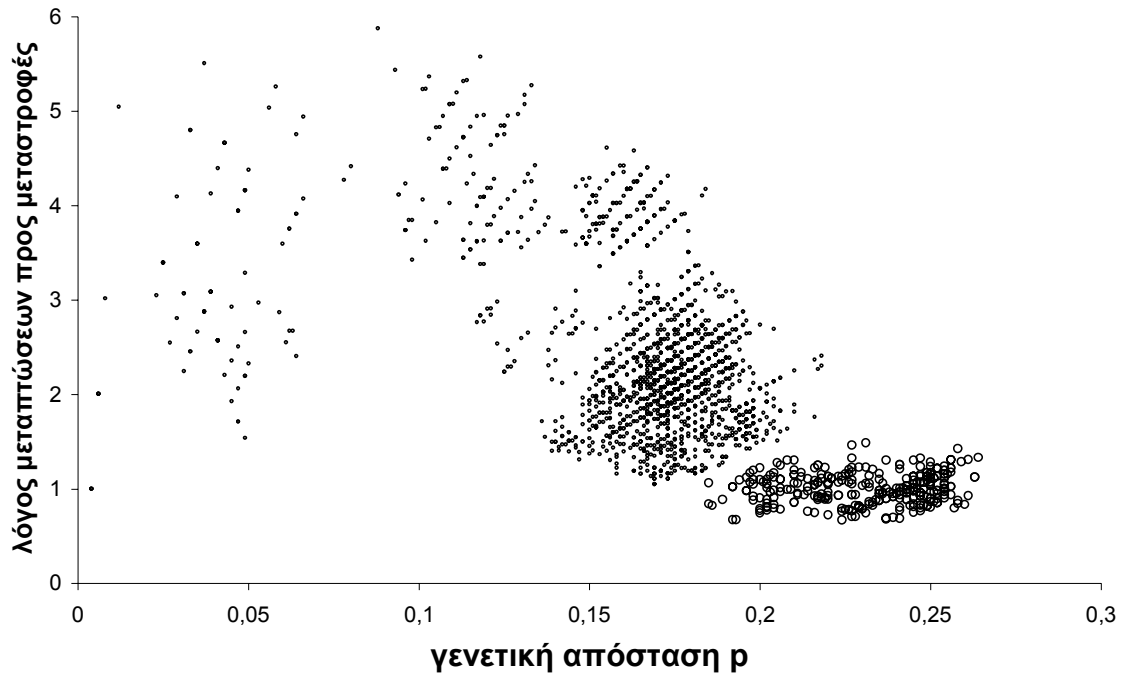
3.2. ΛΟΓΟΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΤΑΣΤΡΟΦΕΣ

Στο mtDNA των ζώων, ο ρυθμός που συμβαίνουν μεταπτώσεις, είναι μεγαλύτερος από αυτόν των μεταστροφών. Έτσι, αρχικά, ο λόγος μεταπτώσεων προς μεταστροφές (R) είναι υψηλός, ενώ όσο αυξάνει η γενετική απόσταση των αλληλουχιών, ο λόγος μειώνεται, μέχρι να σταθεροποιηθεί σε ένα πλατώ μεταξύ των τιμών 0,4-0,5. Αρχικά, οι μεταπτώσεις συσσωρεύονται γραμμικά, σε σχέση με τη γενετική απόσταση των αλληλουχιών, αλλά γρήγορα, λόγω πολλαπλών υποκαταστάσεων στην ίδια θέση, παρατηρείται κορεσμός. Αντίθετα, οι μεταστροφές συσσωρεύονται με μικρότερο ρυθμό και η συσσώρευσή τους είναι γραμμική, ακόμα και για μεγάλες γενετικές αποστάσεις. Επιπλέον, οι μεταστροφές δεν επηρεάζονται από μεταπτώσεις που γίνονται στην ίδια θέση.

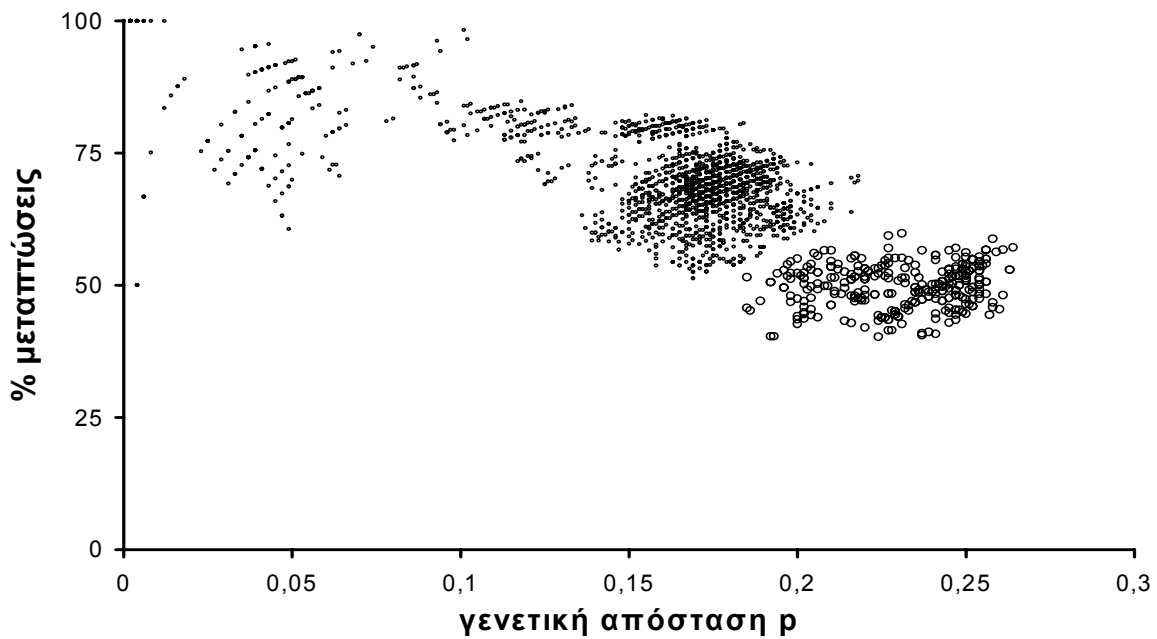
Στην εικόνα 3.1 φαίνεται ο λόγος μεταπτώσεων προς μεταστροφές σε σχέση με τη γενετική απόσταση p (% νουκλεοτιδική διαφορά) μεταξύ όλων των ζευγών των αλληλουχιών. Για όλες τις ενδοειδικές συγκρίσεις, ο λόγος είναι μεγαλύτερος του 1 και για γενετική απόσταση $p < 0,13$ είναι μεγαλύτερος του 2. Για τις διαειδικές συγκρίσεις, κυμαίνεται μεταξύ 0.6-1.5. Στην εικόνα 3.2 δίνεται η ίδια πληροφορία, μόνο που οι μεταπτώσεις είναι εκφρασμένες ως επί τοις εκατό ποσοστό του συνόλου των υποκαταστάσεων. Για τις ενδοειδικές συγκρίσεις οι μεταπτώσεις είναι περισσότερες από το 50% των αλλαγών, ενώ για τις διαειδικές συγκρίσεις κυμαίνεται μεταξύ 40 – 60%.

3.3. ΈΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Όλες οι νουκλεοτιδικές θέσεις της αλληλουχίας δεν έχουν την ίδια πιθανότητα να υποστούν υποκατάσταση. Οι θέσεις στις οποίες μπορούν να προκληθούν σιωπηλές μεταλλαγές (όλες οι 3^{ες} θέσεις των κωδικονίων και λίγες 1^{ες} θέσεις) είναι μεταβλητές, ενώ οι θέσεις στις οποίες μια μεταλλαγή προκαλεί αμινοξική υποκατάσταση (οι περισσότερες 1^{ες} θέσεις και όλες οι 2^{ες} θέσεις των κωδικονίων) είναι πρακτικά αμετάβλητες (εκτός από ελάχιστες θέσεις στις οποίες μπορούν να προκληθούν «αποδεκτές» λειτουργικά αμινοξικές υποκαταστάσεις). Αφού το σύνολο των 3^{ων} θέσεων έχει υποστεί υποκαταστάσεις και αυτές οι θέσεις αντιπροσωπεύουν το 85% των μεταβλητών θέσεων, πρέπει να ελεγχθεί ο βαθμός κορεσμού τους. Γι' αυτό το λόγο

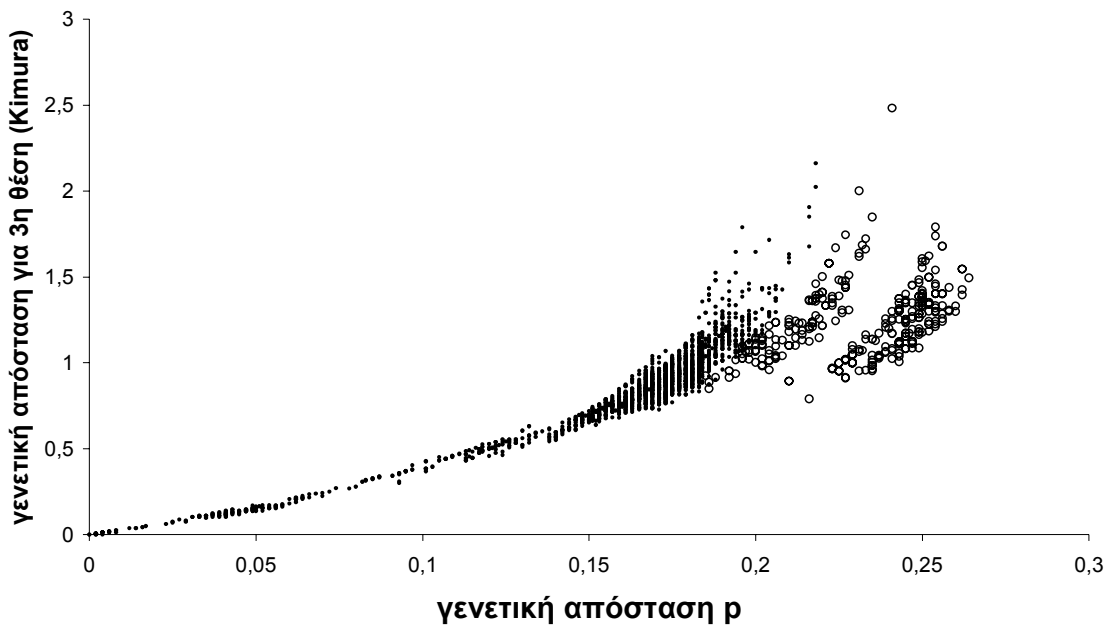


Εικόνα 3.1: Λόγος μεταπτώσεων προς μεταστροφές σε σχέση με τη γενετική απόσταση r . Με σημεία συμβολίζονται οι συγκρίσεις μεταξύ των απλοτύπων του *M. kotschyi* ενώ με κύκλους οι συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών.



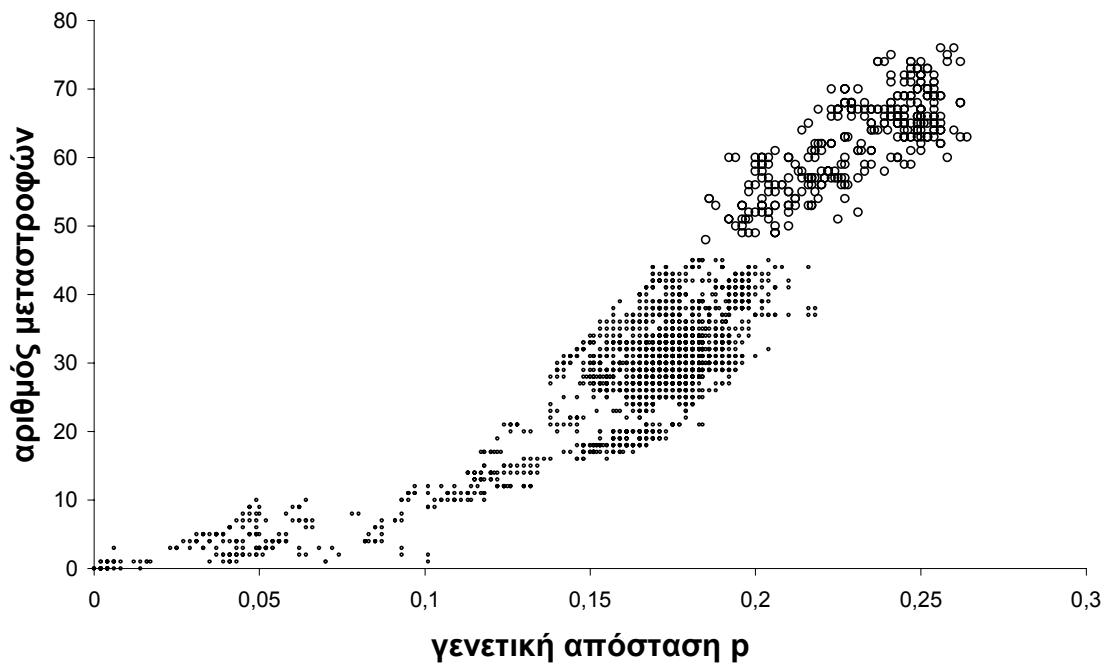
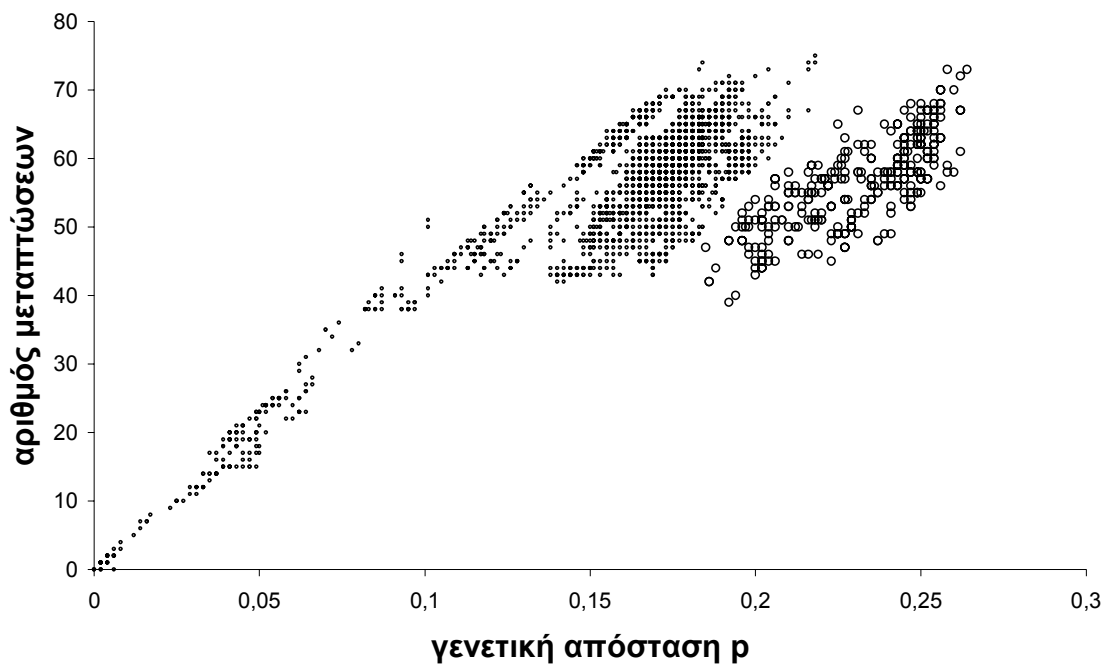
Εικόνα 3.2: Επί τοις εκατό μεταπτώσεις (ως προς το σύνολο των νουκλεϊδικών αλλαγών) σε σχέση με τη γενετική απόσταση r . Με σημεία συμβολίζονται οι συγκρίσεις μεταξύ των απλοτύπων του *M. kotschyi* ενώ με κύκλους οι συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών.

κατασκευάστηκε διάγραμμα των διορθωμένων γενετικών αποστάσεων για τις 3^{ες} θέσεις των κωδικονίων (που εκτιμήθηκαν με βάση το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura) σε συνάρτηση με την απόσταση p για το σύνολο των θέσεων των αλληλουχιών (εικόνα 3.3). Στο διάγραμμα φαίνεται ότι για $p < 0,13$ η σχέση είναι σχεδόν γραμμική αλλά στη συνέχεια για την ίδια τιμή p εκτιμώνται διαφορετικές τιμές, και αυτό γίνεται εντονότερο όσο αυξάνει η γενετική απόσταση. Μάλιστα, για τιμές $p > 0,17$ οι διορθωμένες γενετικές αποστάσεις ξεπερνούν τη μονάδα, γεγονός που φανερώνει υψηλό κορεσμό.



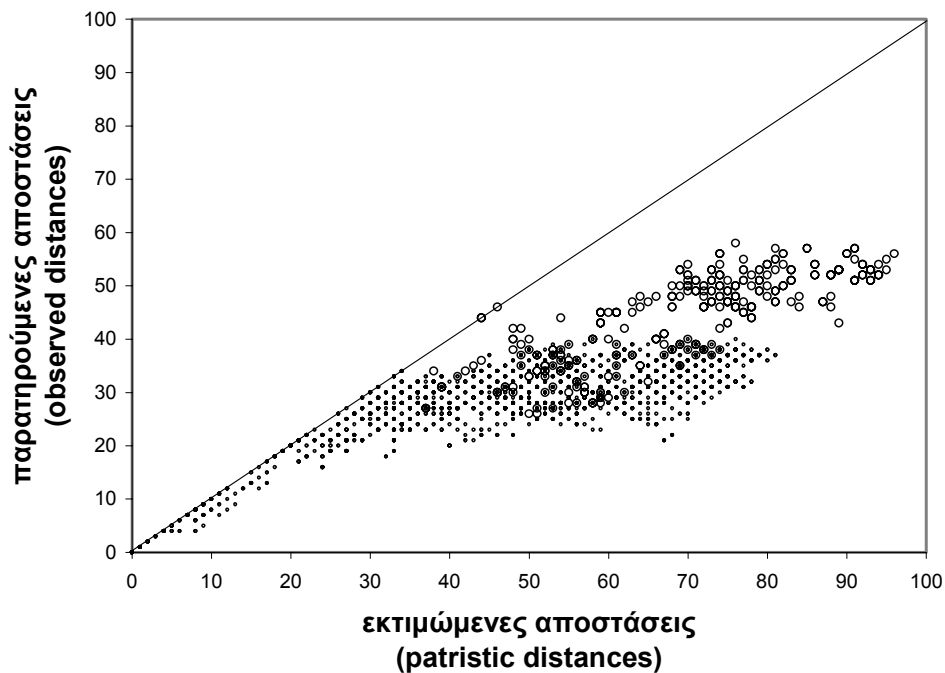
Εικόνα 3.3: Η γενετική απόσταση υπολογισμένη μόνο για τις υποκαταστάσεις 3^{ης} θέσης (με το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura) σε σχέση με τη γενετική απόσταση p . Με σημεία συμβολίζονται οι συγκρίσεις μεταξύ των απλοτύπων του *M. kotschyi* ενώ με κύκλους οι συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών.

Για να ελεγχθεί ο βαθμός κορεσμού χωριστά για τις μεταπτώσεις και μεταστροφές, κατασκευάστηκε διάγραμμα για τον αριθμό των μεταπτώσεων και των μεταστροφών σε σχέση με τη συνολική γενετική απόσταση p (εικόνα 3.4). Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, για $p < 0,13$ οι μεταπτώσεις συσσωρεύονται γραμμικά αλλά για μεγαλύτερες τιμές p φθάνουν σε υψηλό βαθμό κορεσμού. Αντίθετα, οι μεταστροφές δεν φαίνεται να υφίστανται πρόβλημα κορεσμού ακόμα και για μεγάλες γενετικές αποστάσεις.



Εικόνα 3.4: Αριθμός μεταπτώσεων (Α) και αριθμός μεταστροφών (Β) σε σχέση με τη γενετική απόσταση p . Με σημεία συμβολίζονται οι συγκρίσεις μεταξύ των απλοτύπων του *M. kotschyi* ενώ με κύκλους οι συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών.

Τέλος, κατασκευάστηκε το διάγραμμα παρατηρούμενων αποστάσεων (adjusted character distances) ως προς τις εκτιμώμενες αποστάσεις (patristic distances), που προέκυψαν από μια ανάλυση φειδωλότητας με το πρόγραμμα PAUP 4.0. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.5 η καμπύλη προσεγγίζει αρχικά τη διαγώνιο αλλά στη συνέχεια αποκλίνει από αυτή και σχηματίζει οροφή (πλατώ), γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχει υψηλός βαθμός ομοπλασίας.



Εικόνα 3.5: Διάγραμμα συσχέτισης παρατηρούμενων (observed) προς εκτιμώμενες (patristic) γενετικές αποστάσεις, με βάση ανάλυση φειδωλότητας των δεδομένων με το PAUP 4.0. Με σημεία συμβολίζονται οι συγκρίσεις μεταξύ των απλοτύπων του *M. kotschyi* ενώ με κύκλους οι συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών.

3.4. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΠΟΣΤΑΣΕΩΝ

Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MODELTEST (Posada & Crandall 1998) για την επιλογή του μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης που ταιριάζει καλύτερα στα δεδομένα. Το μοντέλο που επιλέχθηκε είναι το Γενικό Αντιστρεπτό Μοντέλο με ποσοστό αμετάβλητων νουκλεοτιδικών θέσεων $I = 0,5422$ και παράμετρο γάμμα για τις μεταβλητές θέσεις $\alpha = 0,9413$. Οι συχνότητα των νουκλεοτιδίων για τις μεταβλητές θέσεις είναι

συχνότητα A = 0,2838

συχνότητα C = 0.3525

συχνότητα G = 0.1476

συχνότητα T = 0.2161

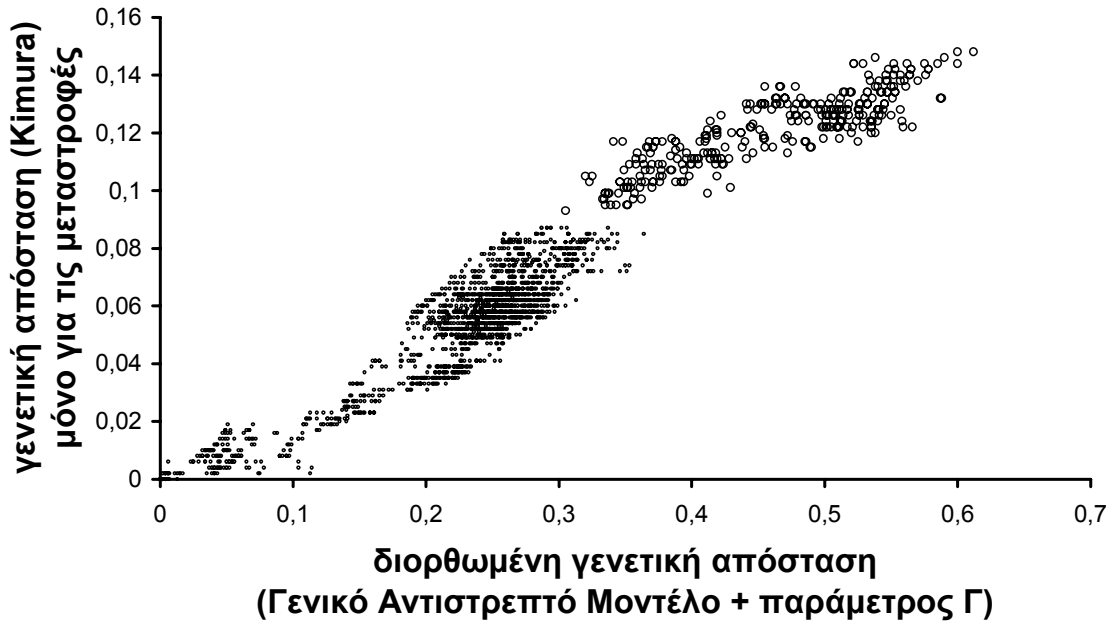
και ο πίνακας του ρυθμού υποκαταστάσεων μεταξύ των διαφορετικών νουκλεοτιδίων

	A	C	G
C	1.0000		
G	11.8969	0.5946	
T	0.5946	7.2347	1.0000

Στο παράρτημα 4.1 δίνονται οι γενετικές αποστάσεις των απλοτύπων υπολογισμένες με βάση το προηγούμενο μοντέλο από το πρόγραμμα PAUP. Επιπλέον στο παράρτημα 4.2 δίνονται οι γενετικές αποστάσεις που υπολογίστηκαν με βάση την απόσταση p και στο παράρτημα 4.3 με βάση το μοντέλο του Kimura μόνο για τις μεταστροφές (MEGA 2.0).

Κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα συσχετισμού των γενετικών αποστάσεων που υπολογίστηκαν με βάση το Γενικό Αντιστρεπτό Μοντέλο σε σχέση με τη γενετική απόσταση του Kimura μόνο για τις μεταστροφές (εικόνα 3.6). Η συσχέτιση είναι σχετικά γραμμική, γεγονός που υποδεικνύει ότι αυτοί οι δύο τρόποι εκτίμησης των γενετικών αποστάσεων εκφράζουν αρκετά ικανοποιητικά το βαθμό διαφοροποίησης των μελετούμενων taxa. Οι γενετικές αποστάσεις που υπολογίστηκαν με βάση το Γενικό

Αντιστρεπτό Μοντέλο, φαίνεται να διορθώνουν ικανοποιητικά για πολλαπλές υποκαταστάσεις ενώ οι μεταστροφές δεν υφίστανται (υψηλή) ομοπλασία.



Εικόνα 3.6: Η γενετική απόσταση υπολογισμένη μόνο για τις μεταστροφές (με το διαπαραμετρικό μοντέλο του Kimura) σε σχέση με τη διορθωμένη γενετική απόσταση (από MODELTEST). Με σημεία συμβολίζονται οι συγκρίσεις μεταξύ των απλοτύπων του *M. kotschy* ενώ με κύκλους οι συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών.

Επιπλέον, υπολογίστηκαν οι μέσες γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ομάδων απλοτύπων που προέκυψαν από τη φυλογενετική ανάλυση που παρατίθεται στη συνέχεια του κεφαλαίου. Ο υπολογισμός των μέσων αποστάσεων έγινε α) με βάση το μοντέλο των Tamura-Nei (+ την παράμετρο Γ) (πίνακας 3.4) και β) με βάση το διαπαραμετρικό μοντέλο του Kimura μόνο για τις μεταστροφές (πίνακας 3.5). Και στις δύο περιπτώσεις ο υπολογισμός έγινε με τη βοήθεια του φυλογενετικού προγράμματος MEGA 2.0 (Kumar et al., 2001)

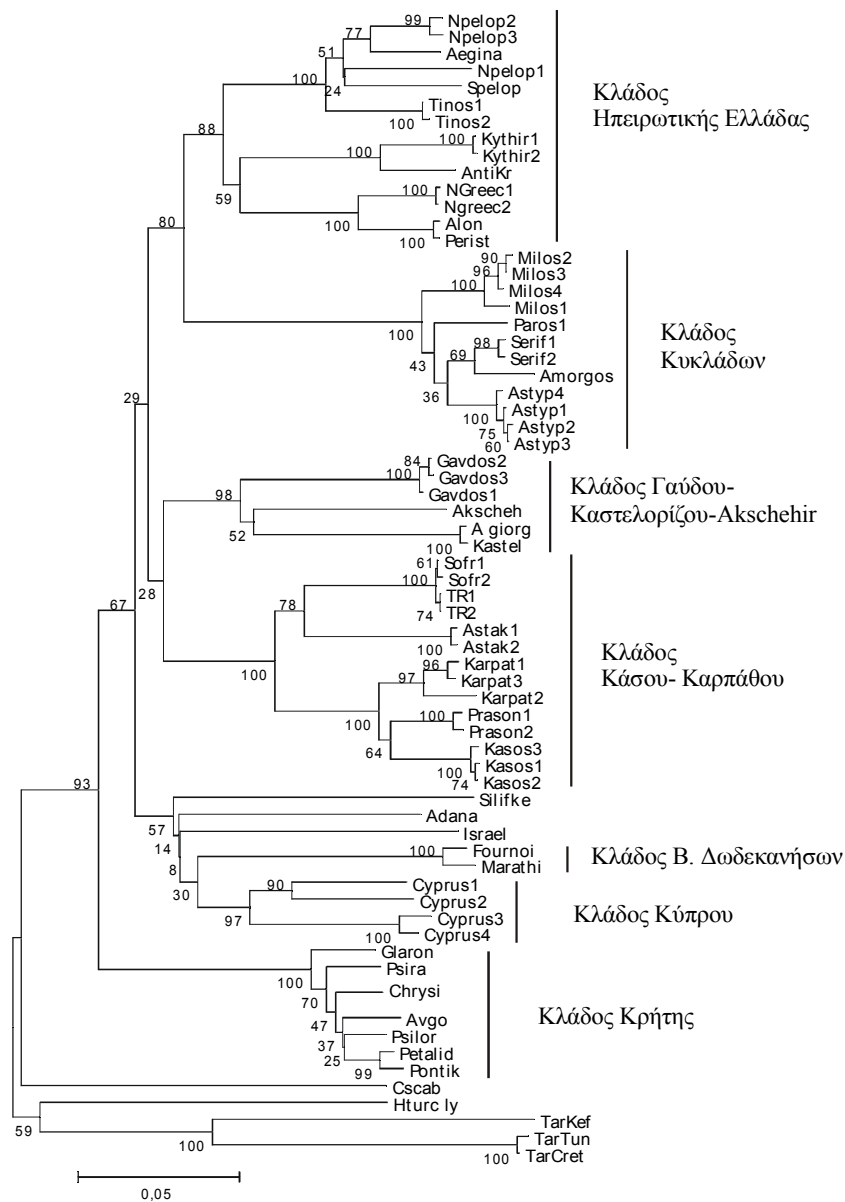
3.5. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΔΡΩΝ

3.5.1. Μέθοδοι ομαδοποίησης γενετικών αποστάσεων

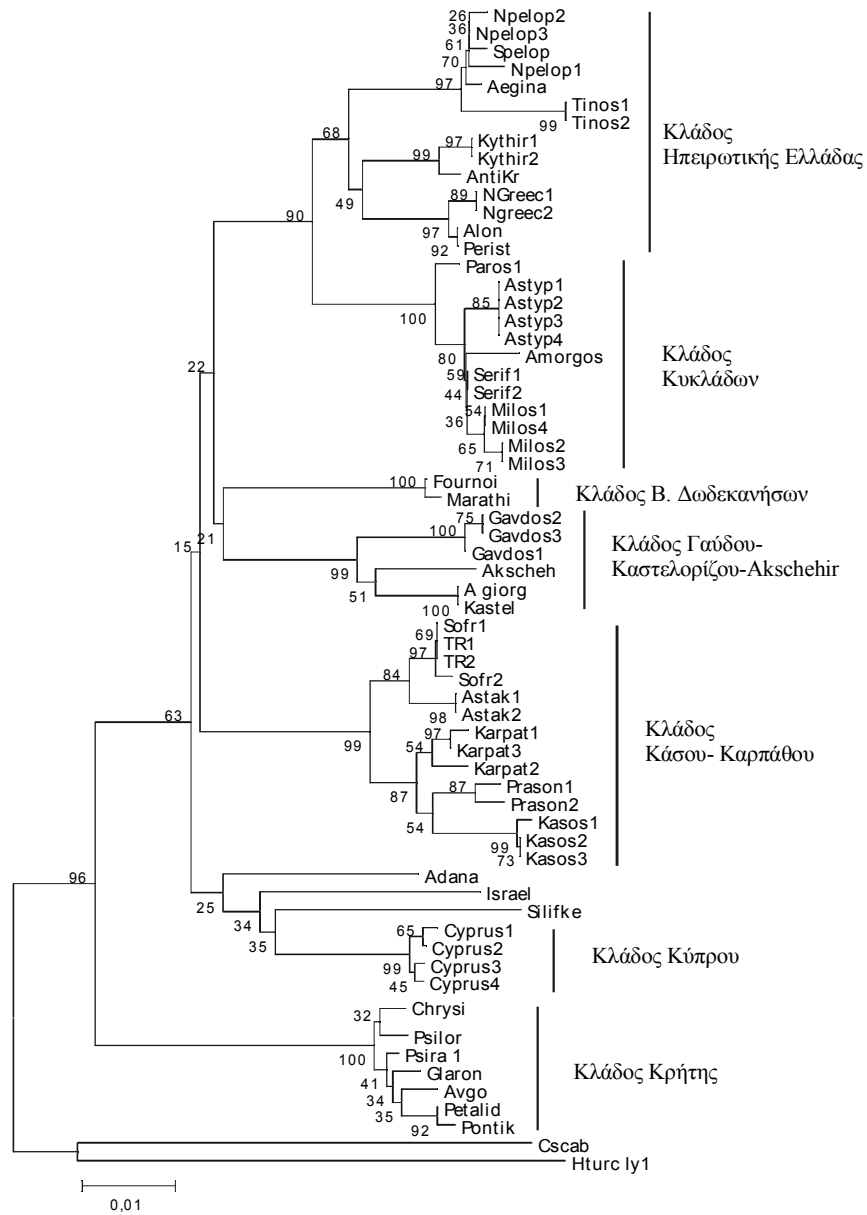
Κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δένδρα με τις μεθόδους Neighbour - Joining και Ελάχιστης Εξέλιξης (Minimum Evolution) με 1000 επαναλήψεις bootstrap στο πρόγραμμα MEGA version 2.0 (Kumar et al. 2001). Δοκιμάστηκαν διάφορες μέθοδοι εκτίμησης γενετικών αποστάσεων, από απλές (p-distance, Jukes-Cantor και Kimura 2p) μέχρι πιο σύνθετες (Tamura-Nei με παράμετρο γάμμα). Επίσης, κατασκευάστηκαν δένδρα μόνο από τις μεταστροφές χρησιμοποιώντας τη γενετική απόσταση p, και του Kimura. Ως εξωομάδες, για τη ριζοθέτηση του δένδρου, χρησιμοποιήθηκαν οι απλότυποι από το *Cyrtopodion scaber* (που είναι το πλησιέστερο φυλογενετικά είδος από τα διαθέσιμα) και το *Hemidactylus turcicus* και σε κάποιες περιπτώσεις, επιπρόσθετα, τα δείγματα της *Tarentola*.

Όλα τα δένδρα που παράχθηκαν εμφανίζουν παρόμοια τοπολογία. Είναι χαρακτηριστικό ότι τα δένδρα που προκύπτουν από απλούστερα μοντέλα εκτίμησης γενετικών αποστάσεων φαίνεται να δίνουν συστηματικά κάπως καλύτερες τοπολογίες με σχετικά υψηλότερες τιμές bootstrap. Αυτή η παρατήρηση είναι σύμφωνη με τη γενική διαπίστωση ότι όταν ο εξελικτικός ρυθμός είναι παρόμοιος για όλες τις εξελικτικές γραμμές και ο λόγος των μεταπτώσεων προς τις μεταστροφές δεν είναι πολύ μεγάλος, τότε η απόσταση p φαίνεται ότι οδηγεί πιο συχνά στη σωστή τοπολογία σε σχέση με άλλες μεθόδους, ακόμα και αν οι γενετικές αποστάσεις είναι μεγάλες (Tajima & Takezaki, 1994; Takahashi & Nei, 2000). Αυτό ισχύει ειδικά όταν το μήκος της αλληλουχίας είναι σχετικά μικρό (Nei 1996).

Οι απλότυποι της *Tarentola* είναι οι πλέον απομακρυσμένοι εξελικτικά από τους υπόλοιπους, έτσι ώστε να μην είναι κατάλληλη η χρήση τους ως εξωομάδων. Παρόλα αυτά, σε κάποιες περιπτώσεις (κυρίως όταν χρησιμοποιούνται απλούστερα μοντέλα) φαίνεται να μην επηρεάζουν την τοπολογία του δένδρου, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις αυξάνουν ελαφρά την στατιστική σημαντικότητα των κλάδων (ελαφρά υψηλότερες τιμές bootstrap). Στην εικόνα 3.7 φαίνεται το φυλογενετικό δένδρο NJ κατασκευασμένα με βάση το μοντέλο Jukes-Cantor για το σύνολο των υποκαταστάσεων και στην εικόνα 3.8 με βάση την απόσταση p μόνο για τις μεταστροφές.



Εικόνα 3.7: Δένδρο Neighbour - joining με βάση το μοντέλο των Jukes-Cantor. Οι αλληλουχίες Cscab, Hturc_ly, TarKef, TarTun, TarCret χρησιμοποιήθηκαν ως εξωομάδες. Έγιναν 1000 επαναλήψεις bootstrap. Οι αριθμοί στους κόμβους του δένδρου αντιπροσωπεύουν τις τιμές bootstrap. Για την κατασκευή του δένδρου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA 2.0 (Kumar et al., 2001).



Εικόνα 3.8: Δένδρο Neighbour - joining μόνο για τις μεταστροφές με βάση την απόσταση p. Οι αλληλουχίες Cscab, Hturc_ly χρησιμοποιήθηκαν ως εξωομάδες. Έγιναν 1000 επαναλήψεις bootstrap. Οι αριθμοί στους κόμβους του δένδρου αντιπροσωπεύουν τις τιμές bootstrap. Για την κατασκευή του δένδρου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA 2.0 (Kumar et al., 2001).

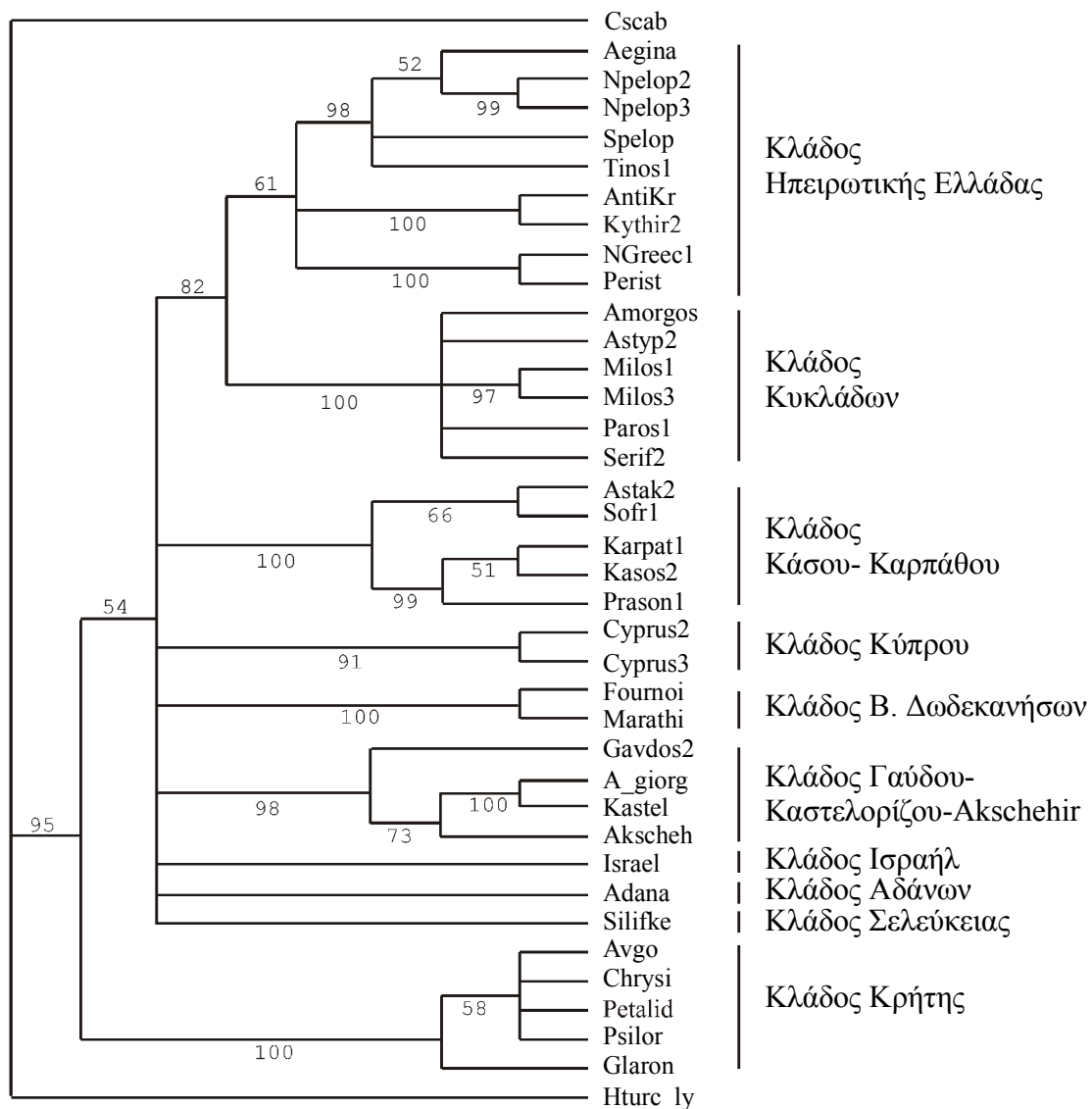
3.5.2. Μέθοδοι μέγιστης φειδωλότητας

Κατασκευάστηκε δένδρο με τη μέθοδο μέγιστης φειδωλότητας (με το πρόγραμμα PAUP 4.0b8), χωρίς στάθμιση των χαρακτήρων, χρησιμοποιώντας την ευρετική μέθοδο αναζήτησης του πιο φειδωλού δένδρου, και εκτιμώντας τη στατιστική σημαντικότητα των κλάδων με 1000 επαναλήψεις bootstrap. Δεν χρησιμοποιήθηκαν όλοι οι απλότυποι του *M. kotschyi*, αλλά επιλέχθηκαν 36 αντιπροσωπευτικοί (συνήθως ο πιο κοινός από κάθε πληθυσμό). Αυτό έγινε για να περιοριστεί ο υπολογιστικός χρόνος σε λογικά πλαίσια). Ως εξωομάδες χρησιμοποιήθηκαν το *C. scaber* και το *H. turcicus* αλλά όχι οι απλότυποι της *Tarentola* γιατί έχουν πολύ μεγάλη ομοπλασία σε σχέση με τους υπόλοιπους. Το δένδρο που προέκυψε είχε πολύ χαμηλές τιμές bootstrap, και όλοι σχεδόν οι κύριοι κλάδοι κατέρρεαν στη βάση του δένδρου στο 50% διάγραμμα συναποδοχής (consensus tree). Αυτό είναι λογικό αφού υπάρχει πολύ υψηλή ομοπλασία.

Γι αυτό το λόγο έγινε σταθμισμένη ανάλυση φειδωλότητας. Δοκιμάστηκαν οι εξής σταθμίσεις 1) μεγαλύτερα βάρη στις μεταστροφές 3^{ης} θέσης απ' ότι στις μεταπτώσεις, 2) μεγαλύτερα βάρη στις μεταλλάξεις 1^{ης} και 2^{ης} θέσης, 3) συνδυασμός των δύο προηγούμενων. Τα καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν στην 1^η περίπτωση. Η 2^η περίπτωση δεν βελτίωσε καθόλου τα αποτελέσματα, αφού οι αλλαγές 1^{ης} θέσης είναι κυρίως σιωπηλές και υφίστανται παρόμοια ομοπλασία με αυτή των 3^{ων} θέσεων, ενώ οι αλλαγές 2^{ης} θέσης είναι πολύ λίγες και κάποιες από αυτές υφίστανται επίσης ομοπλασία.

Δοκιμάστηκαν διαφορετικά βάρη υπέρ των μεταστροφών 3^{ης} θέσης (3:1, 5:1, 10:1) και οι τοπολογίες που προέκυψαν συνέκλιναν με τις τοπολογίες των μεθόδων γενετικών αποστάσεων. Μεγαλύτερα βάρη υπέρ των μεταστροφών δίνουν υψηλές τιμές bootstrap σε κλάδους των οποίων η σύνδεση δεν φαίνεται να στηρίζεται από τις άλλες φυλογενετικές αναλύσεις και ούτε ταιριάζει με τα βιογεωγραφικά δεδομένα. Η στάθμιση που τελικά προτιμήθηκε ήταν η 3:1 (εικόνα 3.9). Το πλέον φειδωλό δένδρο είχε μήκος 1858 βήματα και οι δείκτες ήταν:

Consistency index (CI) = 0.3154, Homoplasy index (HI) = 0.6846, Retention index (RI) = 0.6371, Rescaled consistency index (RC) = 0.2009.



Εικόνα 3.9: Δενδρόγραμμα μέγιστης φειδωλότητας (maximum parsimony) 50% πλειονηφικής συναποδοχής. Στις μεταστροφές 3ης θέσης δόθηκε τριπλασιο βάρος σε σχέση με τις υπόλοιπες υποκαταστάσεις. Οι αλληλουχίες Cscab, Hturb_ly χρησιμοποιήθηκαν ως εξωομάδες. Έγιναν 1000 επαναλήψεις bootstrap. Οι αριθμοί στους κόμβους του δένδρου αντιπροσωπεύουν τις τιμές bootstrap. Για την κατασκευή του δένδρου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PAUP 4.0

3.5.3. Μέθοδος μέγιστης πιθανοφάνειας.

Η ορθότητα των δενδρογραμμάτων που παράγουν οι μέθοδοι μέγιστης πιθανοφάνειας εξαρτάται από την επιλογή του κατάλληλου μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης.

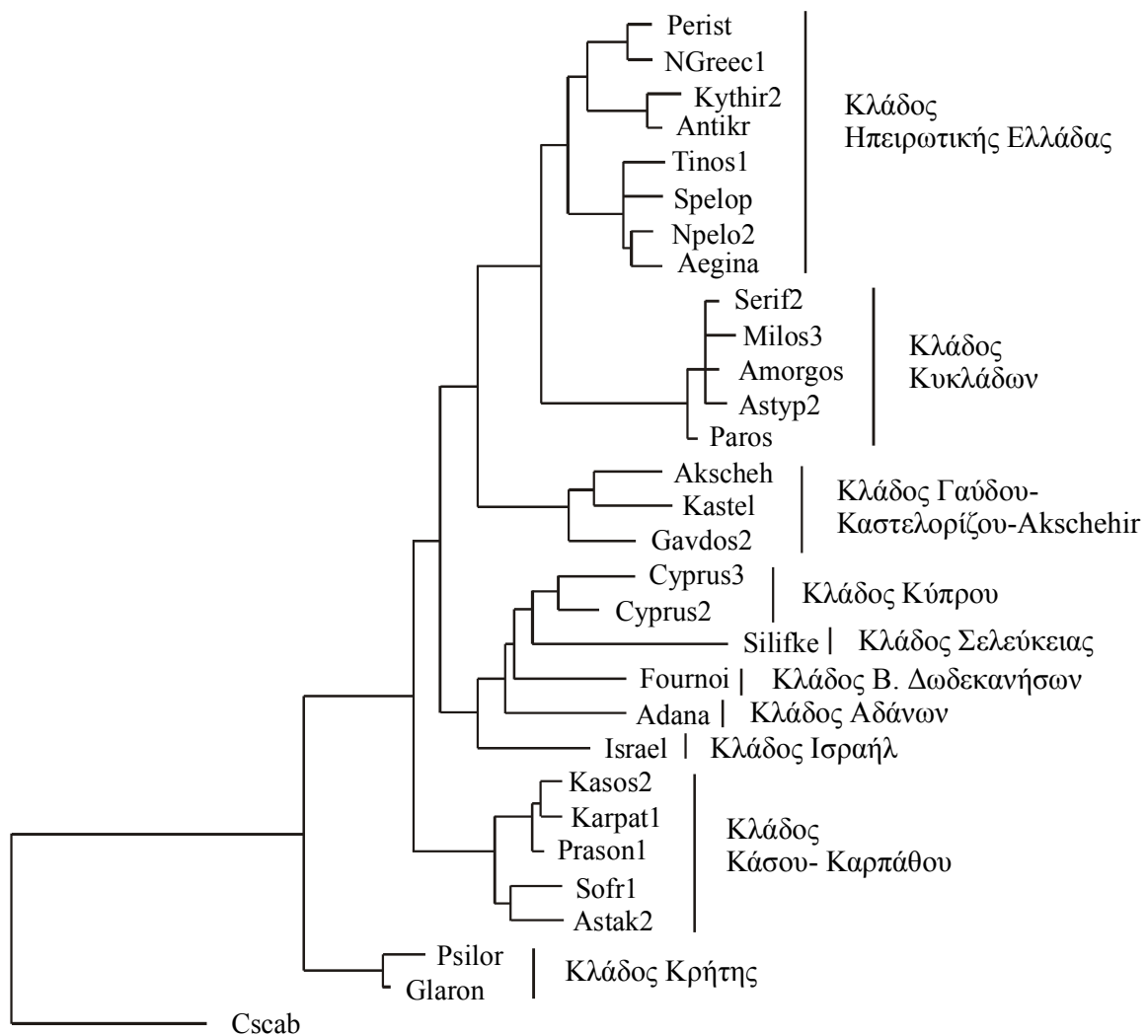
Επειδή η μέθοδος μέγιστης πιθανοφάνειας είναι, υπολογιστικά, πολύ χρονοβόρα, χρησιμοποιήθηκε ένα αντιπροσωπευτικό υποσύνολο των αλληλουχιών (29 αλληλουχίες του *M. kotschy* και το *C. scaber* ως εξωομάδα. Το μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης που επιλέχθηκε είναι το Γενικό Αντιστρεπτό Μοντέλο, που υποδείχθηκε ως το πιο κατάλληλο για τα δεδομένα, από το πρόγραμμα MODELTEST. Οι παράμετροι του μοντέλου δόθηκαν στην παράγραφο 3.4.

Οι παράμετροι αυτές ενσωματώθηκαν στο πρόγραμμα ανάλυσης φειδωλότητας του PAUP 4.0b8. Για την αναζήτηση του δένδρου με τη μεγαλύτερη πιθανοφάνεια χρησιμοποιήθηκε η ευρετική μέθοδος αναζήτησης με τη χρήση του αλγορίθμου αναδιάταξης κλάδων Nearest Neighbor Interchange (NNI). Το αρχικό δένδρο προέκυψε με διαδοχική προσθήκη των αλληλουχιών. Το δένδρο με τη μεγαλύτερη τιμή πιθανοφάνειας είχε τιμή $-\ln L = 4658.5722$ και φαίνεται στην εικόνα 3.10. Έγιναν επίσης 100 επαναλήψεις bootstrap, ξεκινώντας κάθε φορά από ένα Neighbour-joining δένδρο, με τη χρήση του ίδιου αλγορίθμου αναζήτησης όπως προηγουμένως και θέτοντας χρονικό περιορισμό 10 λεπτών για κάθε επανάληψη. Το 50% δενδρόγραμμα συναποδοχής που προέκυψε ήταν σχεδόν ίδιο με αυτά των άλλων μεθόδων και δίνεται στην εικόνα 3.11

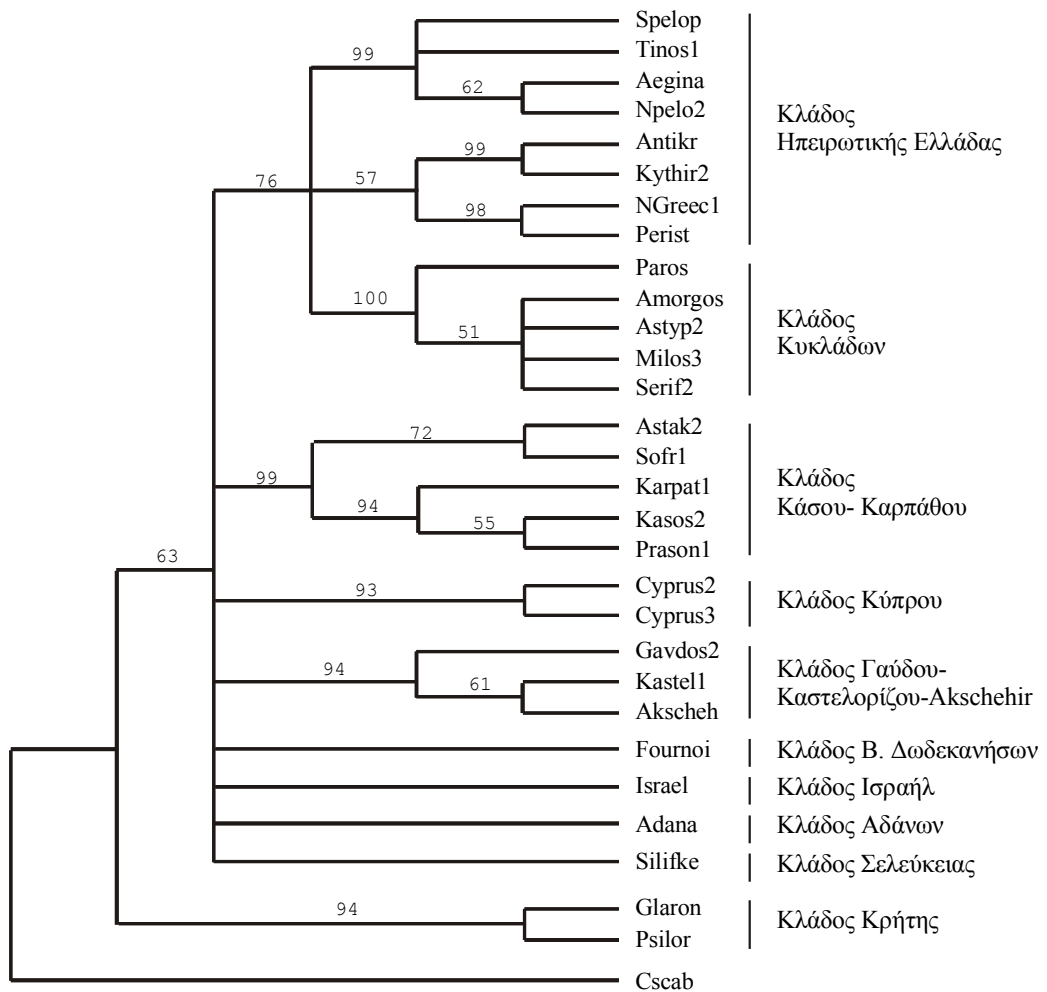
3.5.4. Περιγραφή της τοπολογίας των δένδρων

Όλες οι φυλογενετικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται να συγκλίνουν σε μια κοινή τοπολογία. Η γενική περιγραφή της τοπολογίας αυτής είναι η ακόλουθη:

α) Οι απλότυποι κάθε πληθυσμού και κάθε νησιού σχηματίζουν μονοφυλετικές ομάδες. Η μόνη εξαίρεση είναι ο πληθυσμός της Β. Πελοποννήσου, όπου ο ένας από τους τρεις απλότυπους (Npelop1) ομαδοποιείται χωριστά από τους άλλους δύο.



Εικόνα 3.10: Το δένδρο με τη μεγαλύτερη τιμή μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood). Χρησιμοποιήθηκε το Γενικό Αντιστρεπτό Μοντέλο που υποδείχθηκε από το πρόγραμμα MODELTEST. Η αλληλουχία Cscab χρησιμοποιήθηκε ως εξωομάδα. Για την κατασκευή του δένδρου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PAUP 4.0



Εικόνα 3.11: Δενδρόγραμμα μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) 50% πλειοψηφικής συναποδοχής. Χρησιμοποιήθηκε το Γενικό Αντιστρεπτό Μοντέλο που υποδείχθηκε από το πρόγραμμα MODELTEST. Έγιναν 100 επαναλήψεις bootstrap. Η αλληλουχία Cscab χρησιμοποιήθηκε ως εξωομάδα. Έγιναν 100 επαναλήψεις bootstrap. Οι αριθμοί στους κόμβους του δένδρου αντιπροσωπεύουν τις τιμές bootstrap. Για την κατασκευή του δένδρου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PAUP 4.0.

β) Σχηματίζονται οι εξής κύριοι μονοφυλετικοί κλάδοι, οι οποίοι παρουσιάζουν συγκεκριμένη γεωγραφική κατανομή και στους οποίους δόθηκαν τα ακόλουθα συμβατικά ονόματα:

1) **«Κλάδος Κρήτης»:** Περιλαμβάνει τους απλότυπους από Κρήτη και περιφερειακά νησιά (Πεταλίδα, Ποντικονήσι, Γλαρονήσι, Αυγό, Ψείρα, Χρυσή)

2) **«Κλάδος Κάσου-Καρπάθου»:** Περιλαμβάνει τους απλότυπους από Κάσο, Κάρπαθο και Πρασονήσι (μονοφυλετικός κλάδος) μαζί με τους απλότυπους από τα νησιά ΒΔ της Καρπάθου, Σοφράνο, Τρία νησιά και Αστακίδα (μονοφυλετικός κλάδος).

3) **«Κλάδος Κυκλάδων»:** Περιλαμβάνει τους απλότυπους από Κεντρικές και νότιες Κυκλάδες (Πάρος, Σέριφος, Μήλος, Αμοργός, Αστυπάλαια)

4) **«Κλάδος Ηπειρωτικής Ελλάδας»:** Περιλαμβάνει τους απλότυπους από Πελοπόννησο, Αίγινα και Τήνο («κλάδος Πελοποννήσου»), Βόρεια Ελλάδα και Σποράδες («κλάδος Β. Ελλάδας»), Κύθηρα, Αντικύθηρα («κλάδος Κυθήρων-Αντικυθήρων»)

5) **«Κλάδος Β. Δωδεκανήσων»:** Περιλαμβάνει τους απλότυπους από Φούρνους και Μαράθι

6) **«Κλάδος Γαύδου – Καστελόριζου – Akschehir»:** Περιλαμβάνει τον κλάδο των απλοτύπων της Γαύδου, τον κλάδο των απλοτύπων από το Καστελόριζο και τον Αγ. Γεώργιο και τον κλάδο με τον απλότυπο από το Akschehir (κεντρική Τουρκία).

7) **«Κλάδος Κύπρου»:** Περιλαμβάνει τους απλότυπους από την Κύπρο

8) **«Κλάδος Αδάνων»:** Περιλαμβάνει τους απλότυπους από τα Άδανα

9) **«Κλάδος Ισραήλ»:** Περιλαμβάνει τον απλότυπο από το Ισραήλ

10) **«Κλάδος Σελεύκειας»:** Περιλαμβάνει τον απλότυπο από τη Σελεύκεια

Οι κλάδοι αυτοί, σε όλες τις φυλογενετικές αναλύσεις, στηρίζονται από τιμές bootstrap που συνήθως υπερβαίνουν το 90%. Επιπλέον, ο κλάδος των Κυκλάδων συνδέεται με τον κλάδο της Ηπειρωτικής Ελλάδας με υψηλές τιμές bootstrap (>76%) . Επίσης, ο κλάδος της Κρήτης φαίνεται να διαχωρίστηκε νωρίτερα από τους υπόλοιπους (τιμές bootstrap 54-70%). Οι απλότυποι από την Κύπρο, τα Άδανα, το Ισραήλ και τη Σελεύκεια σε κάποιες φυλογενετικές αναλύσεις εμφανίζονται να σχηματίζουν έναν

μονοφυλετικό κλάδο, ο οποίος όμως στηρίζεται με τιμές bootstrap μικρότερες του 60%. Όλες οι υπόλοιπες συνδέσεις των κύριων κλάδων του δένδρου δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Όλοι οι κύριοι κλάδοι που στηρίζονται με υψηλές τιμές bootstrap σχηματίζουν μεταξύ τους μια πολυτομία, εκτός από τον κλάδο της Κρήτης που διαχωρίζεται πριν από την πολυτομία.

3.6. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΕΝΤΟΣ ΚΑΘΕ ΝΗΣΙΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΤΑΣΗ ΤΟΥ ΝΗΣΙΟΥ.

Για τις περιοχές από τις οποίες είχαν αναλυθεί τρία ή περισσότερα άτομα, υπολογίστηκε η νουκλεοτιδική ποικιλότητα π με τη βοήθεια του προγράμματος DnaSP 3.0 (Rozas & Rozas, 1999). Η νουκλεοτιδική ποικιλότητα υπολογίζεται με βάση τον τύπο

$$\pi = \frac{1}{[n(n-1)/2]} \frac{\sum_{i<j} \Pi_{ij}}{L}$$

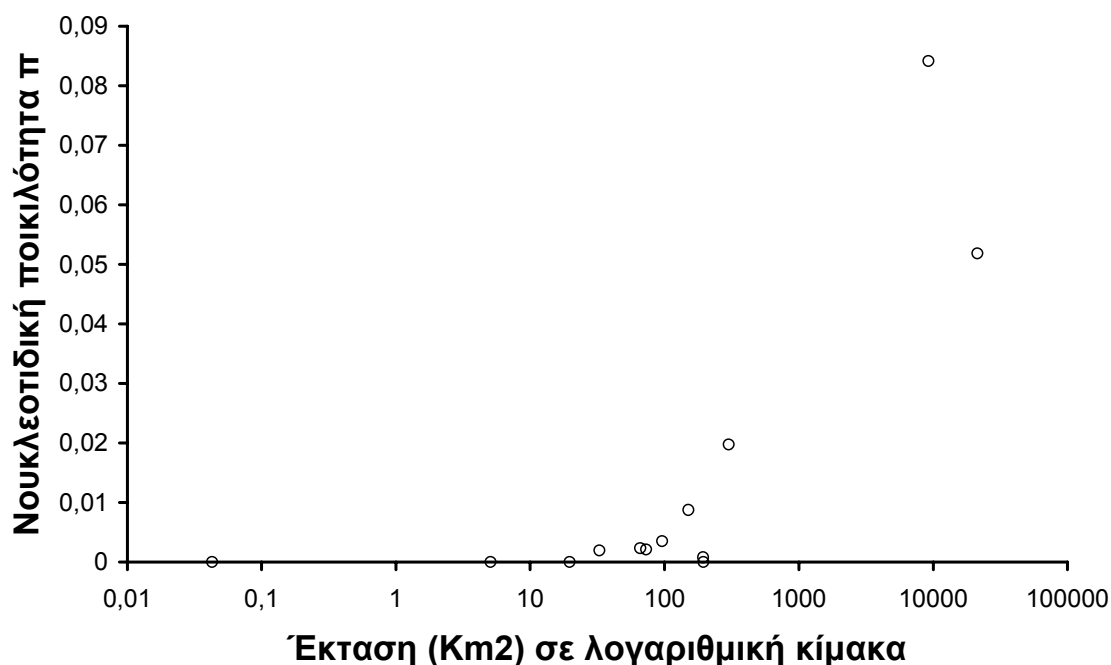
όπου n ο αριθμός των αλληλουχιών του δείγματος, Π_{ij} ο αριθμός των νουκλεοτιδικών διαφορών μεταξύ των αλληλουχιών i και j , και L το μήκος της αλληλουχίας.

Στον Πίνακα 3.6 δίνεται η νουκλεοτιδική ποικιλότητα π για διάφορες περιοχές, η μέγιστη γενετική απόσταση (υπολογισμένη με το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura) μεταξύ των απλοτύπων κάθε περιοχής, η έκταση της περιοχής, ο αριθμός των αλληλουχιών και οι διαφορετικοί απλότυποι.

Με βάση τα δεδομένα αυτά κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα διασποράς για τη νουκλεοτιδική ποικιλότητα π σε σχέση με την έκταση της αντίστοιχης περιοχής σε λογαριθμική κλίμακα (εικόνα 3.12). Από το διάγραμμα φαίνεται ότι σε νησιά με έκταση μικρότερη των 100 Km² η νουκλεοτιδική ποικιλότητα είναι σχεδόν μηδενική ενώ για τα μεγαλύτερα νησιά υπάρχει σαφής θετική συσχέτιση μεταξύ νουκλεοτιδικής ποικιλότητας και έκτασης περιοχής.

Πίνακας 3.6: Για κάθε περιοχή δίνεται η νουκλεοτιδική ποικιλότητα π , η μέγιστη γενετική απόσταση μεταξύ των απλοτύπων με βάση το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura, η έκταση της περιοχής, ο αριθμός των αλληλουχιών και οι διαφορετικοί απλότυποι

Περιοχή	Έκταση περιοχής (Km ²)	αριθμός αλληλουχιών	Διαφορετικοί απλότυποι	Μέγιστη γενετική απόσταση K2P	Νουκλεοτιδική Ποικιλότητα π
Αυγό	0,043	5	1	0	0
Χρυσή	5,1	5	1	0	0
Αντικύθηρα	19,7	5	1	0	0
Πάρος	194,5	6	1	0	0
Τήνος	194,3	5	2	0,002	0,0008
Γαύδος	32,7	6	3	0,006	0,0019
Σέριφος	73,2	6	2	0,004	0,0021
Κάσος	66	5	5	0,006	0,0023
Αστυπάλαια	95,9	5	4	0,008	0,0035
Μήλος	150,6	6	4	0,016	0,0087
Κάρπαθος	301	3	3	0,03	0,0197
Πελοπόννησος	21379	5	4	0,08	0,0518
Κύπρος	9251	4	4	0,113	0,0842



Εικόνα 3.12: Νουκλεοτιδική ποικιλότητα εντός των νησιών σε σχέση με την έκτασή τους.

3.7. ΈΛΕΓΧΟΙ ΣΧΕΤΙΚΟΥ ΡΥΘΜΟΥ

Με τη βοήθεια του ελέγχου σχετικού ρυθμού δύο ομάδων (two cluster relative rate test) των Takezaki, Rzhetsky & Nei (1995) που είναι ενσωματωμένος στο πρόγραμμα PHYLTEST 2.0 του Kumar, ελέγχθηκε αν κάποιοι κλάδοι του δένδρου εξελίσσονται ταχύτερα από κάποιους άλλους. Κυρίως θέλαμε να ελέγξουμε την υπόθεση ότι πληθυσμοί που έχουν διατηρήσει μικρό δραστικό μέγεθος για μεγάλα χρονικά διαστήματα, εμφανίζουν ταχύτερο εξελικτικό ρυθμό σε σχέση με πληθυσμούς που έχουν μεγαλύτερο δραστικό μέγεθος. Σύμφωνα με τη θεωρία της ουδετερότητας του Kimura (1980), ο εξελικτικός ρυθμός των ουδέτερων μεταλλαγών εξαρτάται μόνο από το ρυθμό μεταλλαγής και είναι ανεξάρτητος από το N_e . Η τροποποιημένη θεωρία των ελαφρώς επιβλαβών μεταλλαγών της Ohta (1976, 1992), όμως, προβλέπει ότι υπάρχει εξάρτηση του εξελικτικού ρυθμού από το N_e , και ότι όσο μικρότερο είναι το N_e τόσο ταχύτερος θα είναι ο εξελικτικός ρυθμός.

Στην περίπτωση του *M. kotschyi* είναι πολύ πιθανό πληθυσμοί που έχουν παραμείνει νησιωτικοί για μεγάλες χρονικές περιόδους, να έχουν διατηρήσει αρκετά μικρότερο N_e σε σχέση με τους ηπειρωτικούς. Έτσι οι «νησιωτικοί» κλάδοι των Ν. Κυκλάδων, της Κάσου-Καρπάθου, των Κυθήρων-Αντικυθήρων, της Γαύδου, της Κρήτης, της Κύπρου ελέγχθηκαν σε σχέση με τους ηπειρωτικούς πληθυσμούς της Πελοποννήσου, Β. Ελλάδας και Μ. Ασίας αλλά και μεταξύ τους, χρησιμοποιώντας ως εξωομάδα το *C. scaber* ή την πλησιέστερη εξωομάδα ως προς τους συγκρινόμενους κλάδους, με βάση την τοπολογία του φυλογενετικού δένδρου.

Για τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων, της διακύμανσης και συνδιακύμανσης επιλέχθηκε το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura.

Οι περιπτώσεις στις οποίες ήταν στατιστικά σημαντική η διαφορά στον εξελικτικό ρυθμό μεταξύ των συγκρινόμενων κλάδων ήταν μεταξύ του κλάδου των Κυκλάδων και του κλάδου της Πελοποννήσου ή/και της Β. Ελλάδας όταν ως εξωομάδα χρησιμοποιούνταν ο κλάδος της Κρήτης μόνος ή και με το *C. scaber*.

Επίσης, ελέγχθηκε αν κάποιοι κλάδοι του φυλογενετικού δένδρου εξελίσσονται με διαφορετικό ρυθμό από το μέσο ρυθμό των κλάδων του δένδρου, με τον έλεγχο του μήκους των κλάδων (branch length test) των Takezaki, Rzhetsky & Nei (1995), που είναι ενσωματωμένος στο πρόγραμμα LINTRE της Takezaki. Ως εξωομάδα χρησιμοποιήθηκε

το *C. scaber*. Έγιναν τρεις διαφορετικοί έλεγχοι, με τη χρήση διαφορετικού κάθε φορά μοντέλου για τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων. Χρησιμοποιήθηκαν:

- α) το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura,
- β) το μοντέλο των Tamura-Nei με γάμμα απόσταση ($\alpha=0,2$),
- γ) το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura μόνο για τις μεταστροφές.

Όταν χρησιμοποιήθηκε το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura για όλες τις νουκλεοτιδικές θέσεις, οι αλληλουχίες που οι κλάδοι τους ήταν μακρύτεροι από το μέσο όρο ήταν οι αλληλουχίες της ομάδας των Ν. Κυκλάδων και της Σελεύκειας, ενώ οι αλληλουχίες της Γαύδου και της ομάδας της Κρήτης εξελίσσονταν βραδύτερα από το μέσο όρο.

Όταν χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο των Tamura-Nei με απόσταση γάμμα ($\alpha=0,2$), (η οποία υπολογίστηκε για το σύνολο της αλληλουχίας με τη βοήθεια του προγράμματος Gamma (Gu & Zhang, 1997)) τότε κανείς κλάδος δεν διέφερε από τον μέσο όρο. Αυτό προφανώς συμβαίνει γιατί όσο πιο πολύπλοκο είναι το μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης που χρησιμοποιείται τόσο αυξάνει η διακύμανση και το τυπικό σφάλμα οπότε ο έλεγχος δεν μπορεί να ανιχνεύσει διαφορές.

Όταν, τέλος, χρησιμοποιήθηκε το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura μόνο για τις μεταστροφές, οι αλληλουχίες της ομάδας των Ν. Κυκλάδων (εκτός Πάρου, Σερίφου), των Κυθήρων-Αντικυθήρων, η Τήνος, Ν. Πελοπόννησος είχαν μακρύτερους κλάδους από το μέσο όρο, ενώ η Αστακίδα, Σοφράνο, Τρία Νησιά και η Ψείρα, βραχύτερους.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΠΟΣΤΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε ότι το *M. kotschy* αποτελείται από πληθυσμούς με έντονη γεωγραφική διαφοροποίηση, που χωρίζονται από πολύ μεγάλες γενετικές αποστάσεις (μοντέλο I του Avise). Η μέγιστη γενετική απόσταση που διαπιστώθηκε ήταν μεταξύ απλοτύπων της Κρήτης και των Κυκλάδων (απόσταση p 0,22, διορθωμένη απόσταση 0,34) και οι κύριοι κλάδοι του φυλογενετικού δένδρου χωρίζονται από γενετικές αποστάσεις που ξεπερνούν το 0,20. Τόσο μεγάλες γενετικές αποστάσεις είναι ασυνήθιστες σε ενδοειδικό επίπεδο. Συνήθως, τέτοιου επιπέδου γενετική διαφοροποίηση παρατηρείται μεταξύ διαφορετικών ειδών ή ακόμα και διαφορετικών γενών. Για παράδειγμα, μεταξύ των πρωτευόντων (άνθρωπος, χιμπατζής, γορίλας, ουραγκοτάγκος, Siamang) οι γενετικές αποστάσεις για το ομόλογο τμήμα της κυτοχρωμικής οξειδάσης δεν υπερβαίνουν το 0,24 ενώ μεταξύ ανθρώπου και χιμπατζή είναι περίπου 0,12. Φυσικά το επίπεδο γενετικής διαφοροποίησης δεν είναι ευθέως ανάλογο με το βαθμό γενετικής απομόνωσης και ειδογένεσης. Υπάρχουν είδη σε φάση έντονης ειδογένεσης, όπως τα ψάρια Chichlidae της λίμνης Βικτώρια, που χωρίζονται από πολύ μικρές γενετικές αποστάσεις, και είδη που αποτελούνται από πληθυσμούς που χωρίζονται από μεγάλες γενετικές αποστάσεις.

Από τις μεγαλύτερες ενδοειδικές γενετικές αποστάσεις που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία είναι για το *Tigriopus californicus*, ένα είδος κωπηπόδου που εξαπλώνεται κατά μήκος των δυτικών ακτών της Β. Αμερικής από την Αλάσκα μέχρι την Καλιφόρνια (0,23 για το ίδιο τμήμα της COI) (Edmands, 2001). Στα ερπετά, πολύ μεγάλες ενδοειδικές αποστάσεις έχουν αναφερθεί για την *Tarentola mauritanica*, μεταξύ πληθυσμών της από το Μαρόκο και την Ιβηρική χερσόνησο (0,154 για το κυτόχρωμα b)(Nogales, 1998).

4.2. ΦΥΛΟΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Οι διάφορες φυλογενετικές αναλύσεις φαίνεται να συγκλίνουν σε μία συγκεκριμένη τοπολογία του γονιδιακού δένδρου της COI. Παρότι τα δεδομένα έχουν υψηλό βαθμό ομοπλασίας για τις συγκρίσεις μεταξύ αλληλουχιών με μεγάλη γενετική απόσταση, εντούτοις περιέχουν αξιόπιστη φυλογενετική πληροφορία. Το μεγαλύτερο μέρος αυτής της πληροφορίας περιέχεται στις τρίτες θέσεις των κωδικονίων, που είναι οι πλέον επιδεκτικές σε ομοπλασία. Είναι κοινή πρακτική, σε φυλογενετικές αναλύσεις δεδομένων με μεγάλη γενετική διαφοροποίηση, οι θέσεις αυτές να παραλείπονται ή να τους δίνονται μικρότερα βάρη κατά την ανάλυση. Όμως, υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει ότι οι τρίτες θέσεις περιέχουν σημαντική φυλογενετική πληροφορία και αποδίδουν καλύτερα τη σωστή τοπολογία, άρα δεν πρέπει να θεωρούνται εξ ορισμού παραπλανητικές (Björklund, 1999). Επιπλέον, οι μεταστροφές των τρίτων θέσεων μπορούν να επιλύσουν δύσκολες τοπολογίες, ακόμα και όταν οι μεταπτώσεις τρίτης θέσης έχουν φθάσει σε κορεσμό (Yoder et al., 1996). Τέλος, αναλύσεις του συνόλου του μιτοχονδριακού DNA διαφόρων σπονδυλοζώων έδειξαν ότι η COI ανήκει στα γονίδια εκείνα που παράγουν αρκετά συχνά τη σωστή ή σχεδόν σωστή τοπολογία (Russo et al., 1996).

Το φυλογενετικό δένδρο που προέκυψε αποτελείται από βαθιούς μονοφυλετικούς κλάδους, που αντιστοιχούν σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και διαχωρίζονται από γενετικές αποστάσεις μεγαλύτερες του 0,18. Ο κλάδος της Κρήτης φαίνεται να ξεχωρίζει νωρίτερα από τους υπόλοιπους, ενώ ο κλάδος των Κυκλάδων ενώνεται με τον κλάδο της Ηπειρωτικής Ελλάδας [(Πελοπόννησος, Αίγινα, Τήνος),(Β. Ελλάδα, Β. Σποράδες), (Κύθηρα-Αντικήθυρα)]. Όλες οι υπόλοιπες συνδέσεις των κύριων κλάδων στηρίζονται με πολύ χαμηλές τιμές bootstrap, και σχηματίζουν πολυτομία στο δενδρόγραμμα πλειοψηφικής συναποδοχής.

Οι πολυτομίες στη φυλογενετική ανάλυση συνήθως θεωρούνται ως αδυναμία επίλυσης των φυλογενετικών σχέσεων στο συγκεκριμένο κόμβο του δένδρου, λόγω χαμηλής διακριτικής ικανότητας των δεδομένων («μαλακές» πολυτομίες). Ταχείες κλαδογενέσεις είναι πιθανό να εμφανίζονται ως πολυτομίες, αν το μήκος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας είναι σχετικά μικρό. Σε κάποιες, όμως, περιπτώσεις μια πολυτομία μπορεί να είναι πραγματική («σκληρή» πολυτομία) αν αντιπροσωπεύει σχεδόν ταυτόχρονο διαχωρισμό κάποιων taxa, λόγω π.χ. κάποιου κοινού

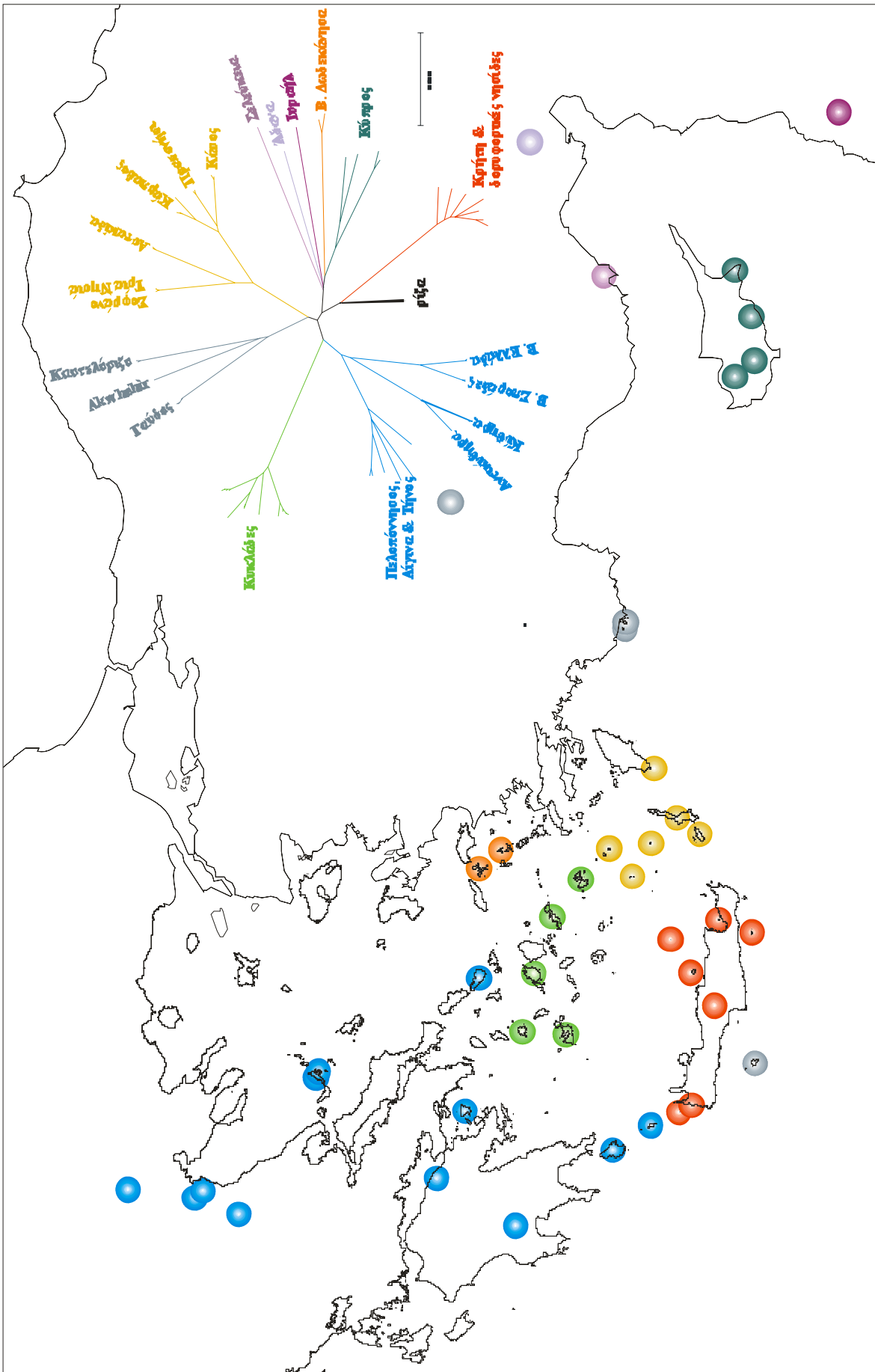
βικαριανιστικού γεγονότος (Maddison, 1989). Πάντως, η επίλυση της βιολογικής υπόστασης των πολυτομιών περιπλέκεται από το γεγονός ότι η πολυτομία αντιπροσωπεύει τη μηδενική υπόθεση για τη φυλογενετική αναπαράσταση (όλα τα taxa ισαπέχουν) και συνεπώς δεν μπορεί να αποδειχθεί. Οι Walsh et al. (1999), για ένα είδος πουλιού, υπολόγισαν ότι μήκος μιτοχονδριακής αλληλουχίας 215-1237 βάσεων είναι αρκετό για να διαχωρίσει κλάδους που χώρισαν 100.000 χρόνια ο ένας από τον άλλο πριν από 2,6 εκ. χρόνια. Για το *M. kotschy* αυτό το διακριτικό όριο πρέπει να είναι αρκετά μεγαλύτερο, καθώς οι κλάδοι της πολυτομίας διαχωρίστηκαν αρκετά παλαιότερα και με δεδομένο ότι υπάρχει υψηλή ομοπλασία, ειδικά στο επίπεδο σύνδεσης αυτών των κλάδων. Επομένως, είναι μάλλον παρακινδυνευμένο να θεωρήσει κανείς ότι ο χωρισμός όλων αυτών των κλάδων συνέβηκε σχεδόν ταυτόχρονα, λόγω κάποιου κοινού βιογεωγραφικού συμβάντος, αν και δεν αποκλείεται αυτό να ισχύει για κάποιους από αυτούς.

Το γενικό φυλογεωγραφικό πρότυπο που αναδείχθηκε αντιστοιχεί στην Κατηγορία I κατά Avise (2000): βαθιά γενεαλογικά δένδρα με τις κύριες γενεαλογικές γραμμές σε αλλοπατρία. Το πρότυπο αυτό παρατηρείται μεταξύ πληθυσμών που εξαπλώνονται σε μεγάλες γεωγραφικές περιοχές, έχουν χαμηλή ικανότητα διασποράς και γονιδιακής ροής και έχουν χωριστεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Η αντιστοιχία των κύριων κλάδων με περιοχές που γνωρίζουμε από την παλαιογεωγραφία ότι είχαν διαχωριστεί μεταξύ τους (Κρήτη, Κάσος-Κάρπαθος, Νότιες Κυκλάδες κτλ) φανερώνει ότι η σημερινή κατανομή και διαφοροποίηση του *M. kotschy* είναι κυρίως αποτέλεσμα βικαριανιστικών φαινομένων.

Στη συνέχεια εξετάζονται αναλυτικότερα τα φυλογεωγραφικά πρότυπα που προέκυψαν. Στην εικόνα 4.1 δίνονται οι ομαδοποιήσεις των απλοτύπων πάνω στο χάρτη μαζί με ένα αντιπροσωπευτικό φυλογενετικό δένδρο. Κάθε διαφορετικό χρώμα αντιστοιχεί σε έναν από τους κύριους κλάδους.

α. Κλάδος Κρήτης

Ο κλάδος αυτός περιλαμβάνει τους πληθυσμούς από την Κρήτη και τις δορυφορικές της νησίδες αλλά όχι τη Γαύδο. Εξετάστηκε ένας πληθυσμός από την Κρήτη, από την περιοχή της Νίδας (Ψηλορείτης) και πληθυσμοί από έξι δορυφορικές νησίδες, την Πεταλίδα και το Ποντικονήσι στα δυτικά, το Γλαρονήσι δίπλα στη Ντία, το



Εικόνα 4.1 : Οι ομαδοποιήσεις των περιοχών δειγματοληψίας με βάση το δένδρο των απλοτύπων του *M. koisielagi*. Το δένδρο είναι Neighbor-joining με απόσταση Jukes - Cantor όπως της εικόνας 3.7. Κάθε κύριος κλάδος (με διαφορετικό χρώμα) στηρίζεται με τιμές bootstrap μεγαλύτερες από 90%.

Αυγό ΒΑ της Ντία, την Ψείρα στον κόλπο του Μιραμπέλλου, και τη Χρυσή (Γαΐδουρονήσι) νότια της Ιεράπετρας. Όλοι αυτοί οι απλότυποι σχηματίζουν μια μονοφυλετική ομάδα με μέση και μέγιστη γενετική απόσταση 0,035 και 0,051 αντίστοιχα.

Στην Κρήτη, η παρουσία του *M. kotschy* είναι εντοπισμένη και φαίνεται να απουσιάζει από το μεγαλύτερο μέρος του νησιού. Έχει αναφερθεί, εκτός από την περιοχή του Ψηλορείτη απ' όπου συλλέχθηκε, στα Λευκά Όρη (Stepanek, 1944), το Ακρωτήρι Χανίων, τον Άγιο Νικόλαο, τη Σητεία (Wettstein 1953), και στο όρος Στρούμπουλας (Μυλωνάς, προσωπική παρατήρηση). Σε όλες σχεδόν τις γύρω νησίδες το είδος βρίσκεται σε αφθονία, ενώ φαίνεται να απουσιάζει από τη Ντία αλλά όχι από τις γειτονικές σ' αυτή βραχονησίδες.

Από την φυλογενετική ανάλυση των απλοτύπων δεν εμφανίζεται κάποιο συγκεκριμένο φυλογεωγραφικό πρότυπο. Εκτός από την Πεταλίδα και το Ποντικονήσι, που λόγω γεωγραφικής γειννίας έχουν μικρή γενετική απόσταση (0,02) και ομαδοποιούνται μαζί, όλοι οι άλλοι απλότυποι (και του Ψηλορείτη) σχηματίζουν μια πολυτομία, με το Γλαρονήσι να διαχωρίζεται νωρίτερα (bootstrap 50-70%). Με δεδομένο ότι όλες σχεδόν οι νησίδες ήταν ενωμένες με την Κρήτη κατά τις τελευταίες παγετώδεις περιόδους, μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι πληθυσμοί τους αποτελούσαν μέρος των πληθυσμών της Κρήτης. Η έλλειψη γεωγραφικής δομής, επιπλέον, υποδεικνύει ότι οι απλότυποι των πληθυσμών των νησίδων είναι τυχαία δείγματα μιας μεγάλης πολυμορφικής γονιδιακής δεξαμενής που ζούσε στην Κρήτη. Σε ενδοπληθυσμιακό επίπεδο οι πληθυσμοί της Νίδας, του Αυγού και της Χρυσής, από τους οποίους έχουν αναλυθεί 4-5 άτομα, εμφανίζονται μονομορφικοί. Εξαιτίας του μικρού μεγέθους των πληθυσμών των νησίδων αναμένουμε ότι θα έχουν χαμηλό πολυμορφισμό. Ακόμα και αν αρχικά, κατά το χωρισμό τους από τη «μητρική» Κρήτη, περιείχαν μεγαλύτερο πολυμορφισμό, μέσα σε σχετικά λίγες γενιές θα έτειναν να γίνουν μονομορφικοί.

Λόγω της ελλιπούς γνώσης της κατανομής των πληθυσμών του *M. kotschy* στην Κρήτη και της απουσίας άλλων «κρητικών» πληθυσμών από τη φυλογενετική ανάλυση δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε τη γενετική δομή των πληθυσμών της Κρήτης, τον πολυμορφισμό τους και το βαθμό γενετικής ροής που υπάρχει μεταξύ τους. Είναι επίσης πιθανό ότι η εξάπλωση του *M. kotschy* στην Κρήτη περιορίστηκε κατά τη διάρκεια του Ολόκαινου. Πάντως, το γεγονός ότι στην ανάλυση έχουν συμπεριληφθεί

πληθυσμοί από νησίδες, από διαφορετικές περιοχές περιμετρικά της Κρήτης, μας κάνει να πιστεύουμε ότι έχει αποκαλυφθεί το μεγαλύτερο μέρος της γενετικής ποικιλότητας.

Η Κρήτη έχει διαχωριστεί από τις γειτονικές περιοχές εδώ και τουλάχιστον 5,3 εκ. χρόνια, με το τέλος της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου. Κατά τη διάρκεια του Πλειοκαίνου (5,3 – 1,8 εκ. χρόνια) αποτελούνταν από ένα σύμπλεγμα μικρότερων νησιών, που αντιστοιχούσαν χονδρικά στους σημερινούς ορεινούς της όγκους (Dermitzakis, 1987). Κατά το Πλειστόκαινο, ανυψώνεται και παίρνει το σημερινό της περίπου σχήμα. Αν θεωρήσουμε ότι οι απλότυποι των ατόμων *M. kotschyi* της Κρήτης εξελίσσονται με βάση τον κλασικό ρυθμό του 2% νουκλεοτιδική διαφοροποίηση ανά ένα εκ. χρόνια, τότε ο πιο παλιός κοινός μιτοχονδριακός πρόγονος έζησε περίπου πριν από 2,5 εκ. χρόνια. Συνεπώς, η σημερινή νουκλεοτιδική διαφοροποίηση συνέβη κυρίως κατά τη διάρκεια του Πλειστοκαίνου. Πιθανοί φυλογεωγραφικοί διαχωρισμοί, που αντιστοιχούσαν στα νησιά του Πλειστοκαίνου δεν έχουν επιβιώσει στη σημερινή φυλογεωγραφική δομή των πληθυσμών.

β. Κλάδος Κάσου – Καρπάθου

Ο κλάδος αυτός περιέχει τρεις επιμέρους κλάδους: έναν κλάδο που περιλαμβάνει την Κάσο, Κάρπαθο και Πρασονήσι, έναν που περιλαμβάνει τη νησίδα Αστακίδα και έναν τρίτο που περιλαμβάνει τις νησίδες Πεταλίδα (από το σύμπλεγμα Τρία Νησιά) και Σοφράνο. Ο κλάδος της Αστακίδας συνδέεται με τον κλάδο Τρία Νησιά-Σοφράνο, και απέχουν μεταξύ τους γενετική απόσταση 0,10 και αυτοί οι δύο συνδέονται με τον κλάδο της Κάσου-Καρπάθου-Πρασονησίου, με τον οποίο η μέση γενετική τους απόσταση είναι 0,13. Ο κλάδος της Κάσου-Καρπάθου-Πρασονησίου εμφανίζεται ως τριχοτομία και οι κλάδοι των τριών αυτών νησιών χωρίζονται μεταξύ τους με γενετικές αποστάσεις 0,051-0,058.

Από την παλαιογεωγραφία γνωρίζουμε ότι στις αρχές του Πλειοκαίνου η Κάρπαθος ήταν ενωμένη μέσω της Ρόδου με τη Μικρά Ασία (Daams & Van de Weerd, 1980). Κατά το ανώτερο Πλειόκαινο το νησί σχεδόν βυθίστηκε εντελώς και αποκόπηκε από τη Ρόδο (Boger & Dermitzakis, 1985). Κατά το Πλειστόκαινο η Κάρπαθος έλαβε τη σημερινή της γεωγραφική διαμόρφωση και πιθανώς υπήρξε για κάποιο διάστημα ενωμένη με την Κάσο (Δερμιτζάκης, 1990). Η Ρόδος (της οποίας το νοτιότερο άκρο είναι το Πρασονήσι) παρέμεινε ενωμένη με τη Μικρά Ασία μέχρι το τέλος του Πλειοκαίνου και κατά το Πλειστόκαινο έγινε νησί. Όσον αφορά τις νησίδες Σοφράνο,

Τρία Νησιά και Αστακίδα δεν υπάρχουν διαθέσιμα παλαιογεωγραφικά στοιχεία. Οι νησίδες αυτές, σήμερα, χωρίζονται από πολύ μεγάλα βάθη και πιθανώς να μην συνδέθηκαν μεταξύ τους και με άλλες γειτονικές περιοχές από την κρίση αλατότητας του Μεσσηνίου.

Η παρουσία του *M. kotschyi* στις νησίδες αυτές πιθανά να οφείλεται σε διασπορά από τον προγονικό πληθυσμό της Κάσου – Καρπάθου – Ρόδου. Όμως, και η ανταγωνιστική υπόθεση του βικαριανιστικού χωρισμού κατά το τέλος της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου (5,3 εκ. χρόνια πριν) δεν μπορεί να αποκλειστεί. Ο κυριότερος λόγος είναι ότι, αποδεχόμενοι το «κλασικό» μοριακό ρολόι για το μιτοχονδριακό DNA, ο διαχωρισμός του κλάδου των νησίδων από το σύμπλεγμα Κάσου-Καρπάθου-Πρασονησίου τοποθετείται λίγο πριν ή κατά τη διάρκεια της κρίσης αλατότητας.

Όσον αφορά τις βραχονησίδες Τρία νησιά και Σοφράνο, οι απλότυποι των πληθυσμών τους παρουσιάζουν πολύ μικρή διαφοροποίηση (0,004). Αν δεν πρόκειται για λάθος (κατά τη συλλογή των δειγμάτων ή την ανάλυσή τους), τότε πρόκειται για ένα φαινόμενο διασποράς που συνέβηκε πολύ πρόσφατα (Ανώτερο Πλειστόκαινο – Ολόκαινο) από το ένα νησί στο άλλο. Θα ήταν ενδιαφέρον να αναλυθούν και νέα άτομα από αυτά τα νησιά, καθώς και από τα γειτονικά τους, ώστε να επιβεβαιωθεί το γεγονός και ει δυνατό να διαπιστωθεί και η κατεύθυνση της διασποράς.

Όσον αφορά τον κλάδο Κάσου-Καρπάθου-Πρασονησίου, η γενετική απόσταση που χωρίζει τους απλότυπους του Πρασονησίου από τους αντίστοιχους της Κάσου – Καρπάθου, θα μπορούσε να αντιστοιχιστεί με τον παλαιογεωγραφικό χωρισμό της Καρπάθου από τη Ρόδο κατά το ανώτερο Πλειόκαινο. Η γενετική απόσταση μεταξύ Κάσου – Καρπάθου είναι αντίστοιχου μεγέθους αλλά πολύ πιθανά ο διαχωρισμός των αντίστοιχων πληθυσμών να είναι νεότερος (μέσα στο Πλειστόκαινο).

Τέλος, ένα ενδιαφέρον στοιχείο είναι ότι ο συνολικός κλάδος «Κάσου – Καρπάθου» σχηματίζει μια πολυτομία, όπως προαναφέρθηκε, με τους υπόλοιπους κύριους κλάδους του δένδρου (μεταξύ αυτών και με τους κλάδους των Β. Δωδεκανήσων και Καστελόριζου). Κατά συνέπεια, στη συγκεκριμένη φυλογεωγραφική ανάλυση δεν «εμφανίζεται» ο χωρισμός της Ρόδου από τη Μικρά Ασία στην αρχή του Πλειστοκαίνου. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι για το *M. kotschyi* μεταξύ Ρόδου και Β. Δωδεκανήσων-Καστελορίζου υπήρχαν παλαιότεροι γεωγραφικοί φραγμοί, είτε ότι η παρουσία του στο Πρασονήσι οφείλεται σε διασπορά από την Κάσο - Κάρπαθο. Το πρόβλημα αυτό πιθανά να διαλευκανθεί με την ανάλυση πληθυσμών από άλλα νησιά

περιμετρικά της Ρόδου (από τη Ρόδο δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής αναφορές για την παρουσία του είδους) και από πληθυσμούς περιοχών της Μ. Ασίας εγγύτερων στη Ρόδο.

γ. Κλάδος Κυκλάδων

Ο κλάδος των Ν. Κυκλάδων περιλαμβάνει τους απλότυπους από την Μήλο, Σέριφο, Πάρο, Αμοργό και Αστυπάλαια. Διαχωρίζεται από τον κλάδο της Ηπειρωτικής Ελλάδας (στον οποίο περιλαμβάνεται και η Τήνος) με γενετικές αποστάσεις που υπερβαίνουν το 0,24. Μεταξύ των απλοτύπων των διαφόρων νησιών η μέγιστη γενετική απόσταση είναι 0,061 και η μέση γενετική τους απόσταση, υπολογισμένη μόνο για τον κύριο απλότυπο από κάθε νησί, 0,045. Όπως και στην περίπτωση του κλάδου της Κρήτης, οι απλότυποι μεταξύ των νησιών δεν παρουσιάζουν κάποιο σαφές φυλογεωγραφικό πρότυπο.

Από την παλαιογεωγραφία είναι γνωστό ότι οι Κυκλάδες αποτελούσαν μια λίγο πολύ ενιαία στεριά που διαχωρίστηκε από την Ηπειρωτική Ελλάδα στα δυτικά και τη Μ. Ασία στα ανατολικά κατά τη διάρκεια του Τορτονίου. Κατά την κρίση αλατότητας του Μεσσηνίου επανενώθηκε με τις περιοχές αυτές, ενώ κατά τη διάρκεια του Πλειοκαίνου, οι κεντρικές και νότιες Κυκλάδες (Πάρος, Νάξος, Σίκινος, Ίος, Φολέγανδρος, Κουφονήσια, Αμοργός, Μήλος, Σίφνος) αποτελούν ενιαία στεριά που χωρίζεται από τις υπόλοιπες Κυκλάδες μέσω στενών θαλασσιών διαύλων (Anastasakis & Dermitzakis, 1990). Η Σέριφος με την Κύθνο παραμένουν απομονωμένες μέχρι και το ανώτερο Πλειστοκαίνο. Κατά τη διάρκεια του Πλειστοκαίνου οι εναλλασσόμενες παγετώδεις και μεσοπαγετώδεις περίοδοι, προκάλεσαν έντονο ευστατισμό, με οκτώ διαδοχικές υποχωρήσεις και ανυψώσεις της στάθμης της θάλασσας, που σε συνδυασμό με τον έντονο τεκτονισμό της περιοχής κάνουν αδύνατη την ακριβή αναπαράσταση της παλαιογεωγραφίας της περιοχής. Πάντως, κατά το μέσο Πλειστόκαινο, οι Κυκλάδες αποχωρίζονται από την Εύβοια και σχηματίζουν νησιωτικά συγκροτήματα με άγνωστη γεωγραφία. Κατά την περίοδο των μέγιστων υποχωρήσεων της στάθμης της θάλασσας, τα περισσότερα νησιά των Κυκλάδων ενώθηκαν μεταξύ τους.

Η έλλειψη σαφούς φυλογεωγραφικού προτύπου, προφανώς οφείλεται σε ανάμιξη των πληθυσμών που συνέβη κατά τη διάρκεια των παγετωδών περιόδων του Πλειστοκαίνου, όταν πολλά από τα νησιά ενώθηκαν μεταξύ τους. Πάντως, σήμερα, οι πληθυσμοί που αναλύθηκαν εμφανίζονται μονοφυλετικοί για κάθε νησί και δεν φαίνεται να περιέχουν απλότυπους από άλλες περιοχές. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι πολλοί

από τους πληθυσμούς διήλθαν από στενωπό, οπότε λόγω γενετικής παρέκκλισης επικράτησε τυχαία κάποιος από τους απλοτύπους της κοινής γονιδιακής δεξαμενής. Μία περίπτωση παραφυλίας εντός ενός νησιού διαπιστώθηκε από τον Α. Ρόκα (1997), που ανέλυσε δείγματα από τη Μήλο, την Κίμωλο και μια ενδιάμεση βραχονησίδα. Στην περιοχή Πολλώνια της Μήλου, που βρίσκεται πλησιέστερα προς την Κίμωλο και χωρίζεται από αυτή με ρηχό θαλάσσιο διάυλο, ο τοπικός πληθυσμός *M. kotschy* περιέχει τους απλοτύπους του πληθυσμού της Κιμώλου. Αντίθετα οι πληθυσμοί από το υπόλοιπο νησί σχηματίζουν χωριστό μονοφυλετικό κλάδο και εμφανίζουν ένα λίγο πολύ παμμικτικό πρότυπο. Αυτό πιθανώς οφείλεται σε μια δευτερογενή επαφή των πληθυσμών με την ένωση των νησιών κατά την τελευταία παγετώδη περίοδο. Εάν αναλυθούν περισσότερα άτομα από τα νησιά και από πολλές διαφορετικές περιοχές είναι πιθανό ότι θα βρεθούν παρόμοιες περιπτώσεις.

Είναι αξιοσημείωτο, ότι ενώ οι κεντρικές και νότιες Κυκλάδες ενώθηκαν με την Τήνο κατά τη διάρκεια του Πλειστοκαίνου, δεν διαπιστώθηκε με την παρούσα μελέτη, ανταλλαγή απλοτύπων. Θα είχε ενδιαφέρον η ανάλυση πληθυσμών και από τα υπόλοιπα νησιά των Κυκλάδων, ιδιαίτερα αυτών μεταξύ Τήνου και Πάρου, ώστε να οριοθετηθεί με ακρίβεια η περιοχή που εξαπλώνεται ο κλάδος των «Κυκλάδων».

δ. Κλάδος «Ηπειρωτικής Ελλάδας»

Ο κλάδος της «Ηπειρωτικής Ελλάδας» περιλαμβάνει τρεις επιμέρους κλάδους: τον κλάδο της Β. Ελλάδας, τον κλάδο της Πελοποννήσου και τον κλάδο Κυθίων-Αντικυθίων. Οι τρεις αυτοί κλάδοι σχηματίζουν μια τριχοτομία και χωρίζονται με μέση γενετική απόσταση 0,155.

Ο κλάδος της Β. Ελλάδας περιλαμβάνει τον κλάδο των απλοτύπων από διαφορετικούς πληθυσμούς της Β. Ελλάδας (από Ελασσόνα, Πιερία, Κιλκίς) και τον κλάδο των Β. Σποράδων (Αλόνησος και Περιστέρα). Οι δύο αυτοί κλάδοι χωρίζονται με μέση γενετική απόσταση 0,054.

Ο κλάδος της Πελοποννήσου περιλαμβάνει απλοτύπους από τη Βόρεια και Νότια Πελοπόννησο, από την Αίγινα και την Τήνο. Ο πληθυσμός της Β. Πελοποννήσου εμφανίζει πολύ μεγάλη γενετική ποικιλότητα και η μέγιστη γενετική απόσταση μεταξύ των τριών απλοτύπων που βρέθηκαν είναι 0,078. Ο πληθυσμός αυτός δεν είναι μονοφυλετικός καθώς οι δύο πιο συγγενείς απλοτύποι συνδέονται πρώτα με τον

απλότυπο της Αίγινας και κατόπιν με τον τρίτο απλότυπο και τους απλότυπους από Ν. Πελοπόννησο και Τήνο. Η σύνδεση όλων των απλοτύπων δεν εμφανίζει κάποιο σαφές φυλογεωγραφικό πρότυπο.

Ο κλάδος των Κυθήρων-Αντικυθήρων αποτελείται από τους απλοτύπους των Κυθήρων και των Αντικυθήρων που απέχουν μεταξύ τους γενετική απόσταση 0,058.

Από τα γεωλογικά δεδομένα γνωρίζουμε ότι όλες αυτές οι περιοχές ήταν ενωμένες μεταξύ τους, μέχρι τουλάχιστον το τέλος της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου. Κατά το Πλειόκαινο, η Πελοπόννησος εμφανίζεται ως νησί που διαχωρίζεται από τη Στερεά Ελλάδα στα Βόρεια και τα Κύθηρα - Αντικύθηρα στα νότια (Δερμιτζάκης 1981). Κατά το Πλειστόκαινο, η Πελοπόννησος συνδέεται με τη Στερεά Ελλάδα με γέφυρες ξηράς. Τα Κύθηρα κατά το Μέσο Πλειστόκαινο εμφανίζονται ως νησί (Δερμιτζάκης 1990) και δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένο αν κατά τη διάρκεια κάποιων παγετωδών περιόδων συνδέθηκαν με την Πελοπόννησο, αν και βρίσκονται πολύ κοντά. Τα Αντικύθηρα αποτέλεσαν και αυτά ξεχωριστό νησί κατά τη διάρκεια του Πλειστοκαίνου, ενώ είναι πιθανή κάποια χερσαία επικοινωνία με τα Κύθηρα, καθώς ενώνονται με την ισοβαθή των 200 μέτρων. Η Αίγινα κατά τη διάρκεια της τελευταίας παγετώδους περιόδου ήταν ενωμένη με την Πελοπόννησο. Η Τήνος μέσω της Ν. Εύβοιας και της Αττικής ήταν ενωμένη με την Πελοπόννησο, ενώ από το Μέσο – ανώτερο Πλειστόκαινο πρέπει να χωρίστηκε με στενό θαλάσσιο διάυλο από την Εύβοια Όσον αφορά τις Β. Σποράδες, πρέπει να ήταν ενωμένες με την Κεντρική Ελλάδα μέχρι και το Πλειστόκαινο.

Η τριχοτομία που παρατηρείται μεταξύ Β. Ελλάδας, Πελοποννήσου και Κυθήρων-Αντικυθήρων, πιθανώς αντιστοιχεί στο χωρισμό των περιοχών αυτών κατά τη διάρκεια του Πλειοκαίνου. Η μεταγενέστερη σύνδεση Πελοποννήσου και Στερεάς Ελλάδας κατά το Πλειστόκαινο (και ίσως η αμφίβολη σύνδεση Πελοποννήσου - Κυθήρων) δεν ανέτρεψαν το παρατηρούμενο φυλογεωγραφικό πρότυπο (κάτι ανάλογο με αυτό που συνέβη στην περίπτωση της Τήνου και των κεντρικών –νότιων Κυκλάδων). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι παρόλο ότι ενώθηκαν οι αντίστοιχες στεριές, οι διαχωρισμένοι πληθυσμοί δεν ήρθαν σε επαφή λόγω άλλων γεωγραφικών ή οικολογικών φραγμών ή και αν ήρθαν δεν επιβίωσαν ή δεν ανιχνεύθηκαν απλότυποι που να δείχνουν ότι συνέβηκε κάτι τέτοιο.

Στην περίπτωση της Πελοποννήσου είναι σαφές ότι υπάρχουν πληθυσμοί μερικώς απομονωμένοι γεωγραφικά, γεγονός που επιτρέπει τη διατήρηση μεγάλης ποικιλομορφίας μιτοχονδριακών απλοτύπων, αλλά και την ανάμιξή τους, ώστε τελικά να

μην υπάρχει ένα σαφές γεωγραφικό πρότυπο. Σήμερα, η κατανομή του *M. kotschy* στην Πελοπόννησο είναι εντοπισμένη, ενώ στο μεγαλύτερο μέρος της φαίνεται να έχει αραιούς πληθυσμούς ή να απουσιάζει. Μάλιστα, στη Β. Πελοπόννησο (απ' όπου συλλέχθηκε και ο πληθυσμός με την μεγάλη ενδοπληθυσμιακή διαφοροποίηση), το είδος βρίσκεται κυρίως σε ανθρωπογενείς κατασκευές (εγκαταλελειμμένες αποθήκες, σπίτια), γεγονός που γεννά υποψίες για πιθανή συμμετοχή του ανθρώπου στο ανακάτεμα των απλοτύπων.

Η γενετική απόσταση που χωρίζει την Τήνο από τους υπόλοιπους απλότυπους της Πελοποννήσου (0,06-0,08), προφανώς δεν αντιστοιχεί στο χωρισμό της Τήνου από τη Ηπειρωτική Ελλάδα, αλλά στο μεγαλύτερο μέρος αντιπροσωπεύει προϋπάρχουσα γενετική ποικιλομορφία. Η σύνδεση των απλοτύπων της Τήνου και Πελοποννήσου δείχνει ότι με την επανασύνδεση της Πελοποννήσου με τη στερεά Ελλάδα στο κατώτερο Πλειόκαινο και Πλειστόκαινο, υπήρξε μετανάστευση ατόμων προς την περιοχή των βορείων Κυκλάδων, που αντικατέστησε παλαιότερους απλότυπους, αν υποθέσουμε ότι υπήρχαν παλαιότεροι πληθυσμοί στην περιοχή. Θα ήταν ενδιαφέρον να αναλυθούν πληθυσμοί από τη Στερεά Ελλάδα και τη Θεσσαλία, ώστε να εντοπιστεί το γεωγραφικό όριο που διαχωρίζει τον κλάδο της Πελοποννήσου από αυτόν της Β. Ελλάδας.

Ο γενετική απόσταση που χωρίζει τους απλότυπους Κυθήρων-Αντικυθήρων (0,058) και Β. Ελλάδας – Β. Σποράδων (0,054) υποδεικνύει ότι οι αντίστοιχοι πληθυσμοί διαχωρίστηκαν κάποια στιγμή στο ανώτερο Πλειόκαινο ή στο Πλειστόκαινο.

ε. Κλάδος Β. Δωδεκανήσων

Ο κλάδος των Β. Δωδεκανήσων περιλαμβάνει δύο απλότυπους από τους Φούρνους και το Μαράθι (δίπλα στους Λειψούς) που χωρίζονται με γενετική απόσταση 0,017. Τα νησιά των Β. Δωδεκανήσων, από τη Σάμο έως την Κω περικλείονται από την ισοβαθή των 120 μέτρων και ήταν ενωμένα μεταξύ τους και με τις απέναντι μικρασιατικές ακτές κατά το μέγιστο της τελευταίας παγετώδους περιόδου. Συνεπώς οι πληθυσμοί από τους Φούρνους και το Μαράθι έχουν διαχωριστεί πρόσφατα. Οι απλότυποι αυτοί είναι σχεδόν βέβαιο, με βάση την παλαιογεωγραφική ιστορία, ότι συνδέονται στενά με τους απλότυπους των πληθυσμών των απέναντι μικρασιατικών ακτών. Πάντως, από τους απλότυπους των πληθυσμών της Κεντρικής και ΝΑ Τουρκίας, που περιλαμβάνονται στην παρούσα εργασία, χωρίζονται από γενετικές αποστάσεις που

υπερβαίνουν το 19%, γεγονός που δηλώνει την ύπαρξη ισχυρών βιογεωγραφικών φραγμών που λειτουργούν για αρκετά εκ. χρόνια.

στ. Κλάδος Γαύδου, Καστελόριζου, Akschehir

Ο κλάδος αυτός αποτελείται από τρεις επιμέρους κλάδους που σχηματίζουν μια τριχοτομία και χωρίζονται μεταξύ τους από γενετικές αποστάσεις περίπου 0,143. Ο ένας επιμέρους κλάδος περιλαμβάνει τους απλότυπους της Γαύδου, ο δεύτερος τους απλότυπους από το Καστελόριζο και τη γειτονική του νησίδα Αγ. Γεώργιος και ο τρίτος τον απλότυπο από ένα άτομο από το Akschehir (περιοχή των λιμνών της Κεντρικής Τουρκίας).

Η σύνδεση της Γαύδου με τις περιοχές της Κεντρικής και ΝΔ Μ. Ασίας είναι το πλέον περίεργο φυλογεωγραφικό πρότυπο της παρούσας μελέτης. Τα παλαιογεωγραφικά δεδομένα δεν προσφέρουν κάποια πιθανή εξήγηση και έτσι θα πρέπει να καταφύγουμε στην υπόθεση της διασποράς από τη Μ. Ασία προς της Γαύδο (για αναλυτικότερη συζήτηση περί διασποράς βλ. παρ. 4.3). Αν δεχθούμε το κλασικό μοριακό ρολόι για το μιτοχονδριακό DNA, ο κοινός πρόγονος των απλότυπων της Γαύδου και της Μ. Ασίας τοποθετείται περίπου στα 7 εκ. χρόνια, γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι η διασπορά πιθανά να συνέβηκε κατά την περίοδο της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου.

Όσον αφορά τους απλότυπους του Καστελόριζου και του Αγ. Γεωργίου, η γενετική τους απόσταση είναι πολύ μικρή (0,004) και συμβαδίζει με τον πρόσφατο χωρισμό των νησιών στις αρχές του Ολόκαινου. Τα νησιά αυτά ήταν επίσης ενωμένα με τις απέναντι μικρασιατικές ακτές και, προφανώς, οι απλότυποί τους αντιπροσωπεύουν μέρος της γενετικής δεξαμενής των γειτονικών ηπειρωτικών πληθυσμών. Οι απλότυποι αυτοί χωρίζονται από τον αντίστοιχο πληθυσμό του Akschehir και προφανώς η οροσειρά του Ταύρου δρα ως γεωγραφικό φράγμα που έχει απομονώσει εδώ και εκατομμύρια χρόνια τους αντίστοιχους πληθυσμούς.

ζ. Κλάδος Κύπρου

Από την Κύπρο αναλύθηκαν τέσσερα διαφορετικά άτομα από τέσσερις διαφορετικές περιοχές του νησιού και προέκυψαν τέσσερις διαφορετικοί απλότυποι που η μέγιστη γενετική τους απόσταση φθάνει το 0,11. Και στην περίπτωση των πληθυσμών

της Κύπρου, προφανώς, ισχύει το μοντέλο που περιγράφηκε για την Πελοπόννησο και άλλες περιοχές, δηλαδή σχετικά απομονωμένοι τοπικοί πληθυσμοί μεταξύ των οποίων υπάρχει περιορισμένη γονιδιακή ροή. Επειδή από κάθε τοπικό πληθυσμό αναλύθηκε ένα μόνο άτομο, δεν είναι δυνατό να εξαχθούν συμπεράσματα για τον ενδοπληθυσμιακό πολυμορφισμό και το ποσοστό της γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών. Πάντως, οι μεγάλες γενετικές αποστάσεις πιθανώς να υποδεικνύουν την ύπαρξη κάποιου παλαιού βιογεωγραφικού φράγματος μεταξύ διαφορετικών περιοχών του νησιού.

Οι απλότυποι της Κύπρου χωρίζονται από τους αντίστοιχους των γειτονικών ακτών της Μ. Ασίας (Άδανα, Σελεύκεια) και του Ισραήλ με γενετικές αποστάσεις κατά μέσο όρο 0,187, που με βάση το κλασικό μοριακό ρολόι του μιτοχονδριακού DNA, συγκλίνουν σε ένα κοινό πρόγονο περίπου 9 εκ. χρόνια πριν.

Από τη γεωλογία γνωρίζουμε ότι η ύπαρξη της Κύπρου ως νησιού μπορεί να χρονολογηθεί εδώ και 15 εκ. χρόνια περίπου (Δερμιτζάκης 1990). Η Κύπρος αναδύθηκε από τον πυθμένα της Μεσογείου χωρίς να συνδεθεί ποτέ με τις γειτονικές ηπειρωτικές περιοχές. Πιθανώς, η μόνη περίοδος κατά την οποία συνδέθηκε με τη Μικρά Ασία ήταν κατά την κρίση αλατότητας του Μεσσηνίου (Hadjisterkotis et al., 2000). Η ύπαρξη μιας τέτοιας σύνδεσης ενισχύεται από το γεγονός ότι στην Κύπρο υπάρχουν πολλά είδη φυτών Ευρω-Σιβηρικής, Ιρανο-Τουρανικής και Σαχαρο-Αραβικής προέλευσης (Zohary, 1973). Πέρα από μια ερμηνεία για την παρουσία του *M. kotschyi* στην Κύπρο μέσω διασποράς, μπορούμε να ισχυριστούμε ότι πιθανώς η εξάπλωσή του στην Κύπρο συνέβηκε κατά τη διάρκεια της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου. Ακόμα και αν δεν υπήρξε πλήρης σύνδεση, είναι σίγουρο ότι οι ξηρές της Κύπρου και της Μικράς Ασίας βρέθηκαν εκείνη την περίοδο πολύ κοντά ώστε να είναι πολύ πιο εύκολο να φθάσει με διασπορά στην Κύπρο

η. Υπόλοιπες περιοχές Μ. Ασίας και Ισραήλ.

Από τη Σελεύκεια, τα Άδανα και το Β. Ισραήλ αναλύθηκε ένα μόνο άτομο ανά περιοχή. Οι τρεις απλότυποι χωρίζονται μεταξύ τους με γενετικές αποστάσεις περίπου 0,20. Σε κάποιες φυλογενετικές αναλύσεις οι κλάδοι αυτοί μαζί με τον κλάδο της Κύπρου και των Β. Δωδεκανήσων σχηματίζουν μια μονοφυλετική ομάδα, η οποία όμως στηρίζεται με σχετικά χαμηλές τιμές bootstrap. Προφανώς, οι απλότυποι αυτοί προέρχονται από διαφορετικούς γεωγραφικά απομονωμένους πληθυσμούς, που

χωρίζονται από μεγάλα βιογεωγραφικά φράγματα. Επειδή δεν έχουν αναλυθεί περισσότερα άτομα από κάθε πληθυσμό δεν μπορούμε να γνωρίζουμε την ενδοπληθυσμιακή ποικιλότητα (που πολύ πιθανόν να είναι υψηλότερη από αυτή που παρατηρήθηκε στην Κύπρο και την Πελοπόννησο) καθώς και το αν υπάρχει κάποια ανάμιξη των απλοτύπων από διαφορετικές περιοχές. Γενικά πάντως, οι πληθυσμοί της Μ. Ασίας παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και θα άξιζε να γίνει μια αντίστοιχη μελέτη μ' αυτή που έγινε για την περιοχή του Αιγαίου.

4.3. ΦΑΙΝΟΜΕΝΑ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ

Η σημερινή κατανομή του *M. kotschyi*, όπως είδαμε, φαίνεται να διαμορφώθηκε κυρίως μέσω βικαριανιστικών φαινομένων. Υπάρχουν όμως κάποιες περιπτώσεις που δεν μπορούν να εξηγηθούν με βάση τέτοιες ερμηνείες, τουλάχιστο με το σημερινό επίπεδο γνώσεων για την παλαιογεωγραφία της περιοχής. Το πιο ακραίο παράδειγμα είναι η περίπτωση του πληθυσμού της Γαύδου, που στο φυλογενετικό δένδρο σχηματίζει μονοφυλετικό κλάδο με τους πληθυσμούς από το Καστελόριζο και το Akschehir (με τιμές bootstrap μεγαλύτερες του 90%) και απέχει από αυτούς γενετική απόσταση 0,14. Η μόνη εξήγηση για το συγκεκριμένο φυλογεωγραφικό πρότυπο είναι η διασπορά από τη νότια Μικρά Ασία προς τη Γαύδο. Άλλες περιπτώσεις στις οποίες δεν υπήρχε σύνδεση των περιοχών με βάση τη σημερινή παλαιογεωγραφική γνώση και η φυλογεωγραφική κατανομή μπορεί να ερμηνευθεί μόνο μέσω υποθέσεων διασποράς, είναι η περίπτωση της νησίδας Αυγού και των νησίδων Σοφράνο και Τρία Νησιά. Σήμερα, η νησίδα Αυγό χωρίζεται από την Κρήτη με βάθη πολύ μεγαλύτερα των 200 μέτρων και δεν πρέπει να υπήρχε σύνδεση μεταξύ τους καθ' όλη τη διάρκεια του Πλειστοκαίνου. Στην περίπτωση των νησίδων Σοφράνο και Τρία Νησιά, οι απλότυποι μεταξύ των δύο νησιών έχουν μία μόνο νουκλεοτιδική διαφορά που είναι είτε αποτέλεσμα πολύ πρόσφατης διασποράς (αν δεν πρόκειται για κάποιο λάθος κατά τη δειγματοληψία ή την ανάλυση των δειγμάτων).

Γενικά οι σαύρες και ιδιαίτερα τα Gekkonidae, φαίνεται να είναι ικανά να διασπαρούν σε μεγάλες αποστάσεις και να εποικήσουν ωκεάνια νησιά, όπως οι Κανάριες Νήσοι (βλ. Thorpe, Nogales). Μία από τις πιο ακραίες περιπτώσεις διασποράς που έχει αναφερθεί, είναι για το γένος *Neotarentola* που εποίκησε την Κούβα, πριν από 23 εκ. χρόνια, με προέλευση την Αφρική, κάνοντας ένα διατλαντικό ταξίδι 6000 Km, πιθανώς ακολουθώντας το βόρειο ισημερινό ρεύμα (Carranza et al. 2000).

Δύο ερωτήματα γεννιούνται από αυτή τη διαπίστωση. Το πρώτο, πιο ειδικό ερώτημα είναι γιατί αφού το *M. kotschyi* μπόρεσε να διασπαρθεί μέχρι τη Γαύδο από τη Μ. Ασία, δεν εποίκησε και ενδιάμεσες γεωγραφικά περιοχές όπως το σύμπλεγμα Κάσου Καρπάθου και την Κρήτη. Το δεύτερο, πιο γενικό ερώτημα είναι αν το *M. kotschyi* φαίνεται να έχει τόσο μεγάλες ικανότητες διασποράς, γιατί δεν παρατηρήθηκαν

περισσότερα τέτοια φαινόμενα, ειδικά σε περιπτώσεις όπου κάποιες περιοχές έχουν γεωγραφική γειτνίαση, όπως για παράδειγμα η Κάσος με την Κρήτη.

Όσον αφορά το πρώτο ερώτημα, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η διασπορά είναι ένα τυχαίο και σπάνιο φαινόμενο και δεν είναι πάντα σύμφωνο με την ιδέα της συντομότερης οδού, παρότι αν το δούμε από πιθανολογική άποψη, η πιθανότητα εποίκησης αυξάνει όσο πιο κοντά είναι το νησί στόχος και όσο μεγαλύτερη έκταση έχει. Μία περίπτωση παρόμοια με αυτή της Γαύδου έχει παρατηρηθεί στις Κανάριες νήσους για το είδος *Tarentola boettgeri*, όπου η εποίκηση του νησιού El Hierro δεν έχει συμβεί από το πλησιέστερο νησί La Gomera αλλά από τα πιο μακρινά νησιά Selvages, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι δρόμοι εποίκησης μπορεί να καθορίζονται από άλλους παράγοντες, πέρα από τη γεωγραφική γειτνίαση και την κατεύθυνση των θαλάσσιων ρευμάτων (Nogales et al. 1998).

Σχετικά με το δεύτερο ερώτημα, αν τελικά δεχτούμε ότι το *M. kotschy* έχει δυνατότητα διασποράς πάνω από θαλάσσια φράγματα, και ότι περιπτώσεις όπως αυτή της Γαύδου, όντως οφείλονται σε τυχαία διασπορά και όχι σε κάτι άλλο, θα πρέπει λογικά να δεχτούμε ότι έχουν συμβεί και άλλες τέτοια γεγονότα στην εξελικτική ιστορία του είδους. Το γιατί δεν παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη μπορεί να οφείλεται σε δύο λόγους: πρώτον, μπορεί σε σημερινούς πληθυσμούς να υπάρχουν και απλότυποι που προέρχονται από διασπορά αλλά δεν συλλέχθηκαν και δεύτερον, μπορεί τέτοιοι απλότυποι να έχουν εξαφανιστεί από τους σημερινούς πληθυσμούς. Και οι δύο αυτές υποθέσεις πιθανώς ισχύουν αλλά η δεύτερη φαίνεται να έχει ευρύτερη ισχύ. Από τα δεδομένα φαίνεται ότι η εξάπλωση του *M. kotschy* στην περιοχή του Αιγαίου είναι αρχικά αποτέλεσμα βικαριανισμού. Αν συνέβησαν μεταγενέστερα γεγονότα διασποράς, θα έγιναν προς περιοχές όπου ήδη ζούσαν πληθυσμοί *M. kotschy*. Οι μετανάστες προφανώς αποτελούσαν ένα ελάχιστο κλάσμα του πληθυσμού στον οποίο εντάχθηκαν και η πιθανότητα επιβίωσης των μιτοχονδριακών απλοτύπων που μετέφεραν ήταν πολύ μικρή. Αντίθετα, μετανάστες που εποίκισαν κενά από *M. kotschy* νησιά, εγκαθίδρυσαν πληθυσμούς που περιείχαν αποκλειστικά τους δικούς τους μιτοχονδριακούς απλότυπους. Τέτοιες πρέπει να είναι οι περιπτώσεις της Γαύδου και του Αυγού (και προφανώς άλλων νησιών που δεν έχουν ερευνηθεί), που δεν είχαν προηγούμενη σύνδεση με περιοχές που φιλοξενούσαν πληθυσμούς του είδους.

Για τη Γαύδο γνωρίζουμε ότι το νησί αναδύθηκε για τελευταία φορά από τη θάλασσα κατά το Πλειόκαινο – Πλειστόκαινο χωρίς προηγούμενη σύνδεση με την Κρήτη (Φασουλάς Χ., προσωπική επικοινωνία). Όντας ένα «άδειο» από πανίδα και

χλωρίδα νησί, εποικήθηκε από οργανισμούς που προήλθαν κυρίως από την κοντινή Κρήτη. Σε κάποιες λίγες περιπτώσεις παρατηρούνται και οργανισμοί που δεν φαίνεται να προήλθαν από την Κρήτη αλλά από άλλες περιοχές της Α. Μεσογείου. Στα φυτά υπάρχει το παράδειγμα της *Callitriche pulchra* που εκτός της Γαύδου απαντάται στη Β.Α. Λιβύη, η *Periploca angustifolia* που απαντάται στη Γαύδο και τη Χρυσή καθώς επίσης και στη Μάλτα, Σικελία και Β. Αφρική και η *Chlamydophora tridentata* που απαντάται στη Β. Αφρική, τα Ανατολικά νησιά του Αιγαίου και την Κύπρο (στοιχεία από Turland et al. 1993). Για τις αράχνες υπάρχει το παράδειγμα των συγγενικών ειδών *Berlandina plumalis* και *Pterotracha lentiginosa*. Το πρώτο είδος εξαπλώνεται στη Β. Αφρική και τις νότιο μεσογειακές χώρες μέχρι την Κίνα, είναι κυρίαρχο στη Γαύδο, ενώ για την Κρήτη έχει αναφερθεί μια μοναδική εμφάνιση στον Αποσελέμη (Χατζάκη Μ., προσωπική επικοινωνία). Αντιθέτως, το δεύτερο είδος είναι κυρίαρχο στην Κρήτη και απουσιάζει από τη Γαύδο. Για τα χερσαία μαλάκια υπάρχει η περίπτωση της *Cochlicella conoidea* που απαντάται στη Γαύδο και το Ελαφονήσι, απουσιάζει από την Κρήτη και απαντάται επίσης στη Μάλτα και το Ισραήλ (Βαρδινογιάννη 1994).

Ως συμπέρασμα των προλεχθέντων μπορούμε να ισχυριστούμε ότι από τη στιγμή που μεγάλης κλίμακας βικαριανιστικά γεγονότα έχουν διαμορφώσει την εξάπλωση ενός είδους σε μια περιοχή, δευτερογενή γεγονότα διασποράς, ακόμα και αν συμβαίνουν με σχετικά μεγάλη συχνότητα, έχουν ελάχιστες πιθανότητες να αφήσουν ίχνη στη μιτοχονδριακή φυλογεωγραφία του είδους.

4.4. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΕΝΤΟΣ ΤΩΝ ΝΗΣΙΩΝ

Ο βασικός σκοπός αυτής της διατριβής δεν ήταν η μελέτη της διαφοροποίησης των πληθυσμών του *M. kotschyi* εντός κάθε νησιού και ως εκ τούτου τα δεδομένα δεν είναι επαρκή για να έχουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα. Παρόλα αυτά, έχουμε αρκετές ενδείξεις για να εξάγουμε κάποια σχετικά ασφαλή συμπεράσματα. Κατ' αρχήν, είναι σαφές ότι υπάρχει θετική συσχέτιση της νουκλεοτιδικής ποικιλότητας εντός κάθε νησιού με την έκταση του νησιού. Πληθυσμιακά δείγματα από νησιά μικρού μεγέθους, όπως το Αυγό, η Χρυσή, τα Αντικύθηρα έχουν μηδενική ποικιλότητα ενώ αντίθετα στην Κύπρο ή την Πελοπόννησο παρατηρείται πολύ υψηλή γενετική ποικιλότητα και η μέγιστη διαφοροποίηση μεταξύ των απλοτύπων ξεπερνάει το 0,10. Για τα νησιά μεσαίου μεγέθους η νουκλεοτιδική ποικιλότητα κυμαίνεται από σχεδόν μηδενική έως 0,02 και η μέγιστη γενετική απόσταση παρατηρήθηκε μεταξύ των απλοτύπων της Καρπάθου (0,03).

Επειδή αναλύθηκαν λίγα άτομα από κάθε περιοχή και η δειγματοληψία δεν έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να είμαστε σίγουροι ότι αποκαλύφθηκε το μεγαλύτερο μέρος της ποικιλότητας, είναι βέβαιο ότι σε πολλές περιπτώσεις υπάρχει υποεκτίμηση. Για παράδειγμα το δείγμα της Πάρου (n=6) εμφανίζει μηδενική διαφοροποίηση και αυτό πιθανώς οφείλεται στο ότι τα άτομα αυτά συλλέχθηκαν από μια περιορισμένη περιοχή και υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να είναι συγγενή μεταξύ τους. Από την άλλη, σε περιοχές όπως η Κύπρος, που χρησιμοποιήθηκε ένα άτομο από διαφορετικές περιοχές του νησιού, η νουκλεοτιδική ποικιλότητα υπερεκτιμάται αλλά έχει αποκαλυφθεί ένα μεγάλο μέρος της διαφοροποίησης των απλοτύπων. Παρά τις όποιες αδυναμίες υπάρχουν για έναν ακριβή προσδιορισμό της ενδοπληθυσμιακής διαφοροποίησης, το πρότυπο που προκύπτει είναι σαφές.

Όπως επισημαίνει ο Avise (2000), μέσα σε ένα πληθυσμό οι μιτοχονδριακοί απλότυποι αντιπροσωπεύουν διαφορετικές μητρικές γραμμές και συνδέονται γενεαλογικά φθάνοντας πίσω στο παρελθόν σε ένα κοινό προγονικό απλότυπο. Η ιεραρχική δομή των απλοτύπων (το πρότυπο διακλάδωσης σε ένα φυλογενετικό δένδρο) και το πόσο πίσω στο παρελθόν βρίσκεται ο κοινός πρόγονος εξαρτώνται από διάφορες δημογραφικές παραμέτρους του πληθυσμού. Οι κύριες παράμετροι είναι το δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος και η διαφορική αναπαραγωγή των θηλυκών. Όλα τα θηλυκά σε κάθε γενιά δεν αφήνουν τον ίδιο αριθμό απογόνων. Ως συνέπεια, το γονιδιακό δενδρόγραμμα του mtDNA αλλάζει σε κάθε γενιά καθώς ορισμένοι κλάδοι

εξαφανίζονται ή φθίνουν ενώ άλλοι επεκτείνονται. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται «τυχαίος διαχωρισμός των εξελικτικών γραμμών» (stochastic lineage sorting) και εξαρτάται άμεσα από το δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος N_e . Για συγκεκριμένο σταθερό N_e , δεν θεωρείται πιθανή η διατήρηση δύο ή περισσότερων «ιδρυτικών» εξελικτικών γραμμών για παραπάνω από $4N_e$ γενιές. Η πληθυσμιακή αύξηση αναστέλλει την εξαφάνιση των γενεαλογικών γραμμών και συνεπώς αυξάνει την πιθανότητα μια γενεαλογική γραμμή να επιβιώσει για ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα. Αντίθετα, σε πληθυσμούς που φθίνουν ή έχουν διέλθει από στενωπό μειώνεται δραματικά η πιθανότητα επιβίωσης μιας γενεαλογικής γραμμής. Συνεπώς, οι μιτοχονδριακοί απλότυποι θα έχουν πιο πρόσφατο κοινό πρόγονο.

Στην περίπτωση του *M. kotschy*, μπορούμε γενικά να θεωρήσουμε ότι όσο μικρότερη έκταση έχει ένα νησί τόσο μικρότερο θα είναι το μέγεθος του αντίστοιχου πληθυσμού και άρα πιο πρόσφατη η καταγωγή των μιτοχονδριακών απλοτύπων. Όμως, η μιτοχονδριακή διαφοροποίηση που παρατηρείται στα μεγαλύτερα νησιά και την Πελοπόννησο είναι πολύ μεγάλη για να εξηγηθεί μόνο με βάση το δραστικό μέγεθος. Για παράδειγμα, αν θεωρήσουμε ότι στην περίπτωση του πληθυσμού της Καρπάθου η μέση μιτοχονδριακή διαφοροποίηση είναι 0,02 και αν δεχτούμε ότι το μιτοχονδριακό DNA εξελίσσεται με ρυθμό 2% ανά εκ. χρόνια και ο χρόνος γενιάς είναι 2 έτη, τότε προκύπτει μια μέση εκτίμηση του θηλυκού δραστικού μεγέθους του πληθυσμού $N_e=125.000$, που είναι υπερβολικά μεγάλη για να είναι αληθινή.

Η πιο πιθανή εξήγηση είναι ότι στα μεγαλύτερα νησιά οι πληθυσμοί είναι γεωγραφικά δομημένοι σε υποπληθυσμούς μεταξύ των οποίων υπάρχει περιορισμένη γονιδιακή ροή. Μια συνέπεια της μακράς απομόνωσης διαφορετικών πληθυσμών, σε γενεαλογικό επίπεδο, είναι η διατήρηση παλαιών μητρικών γενεαλογικών γραμμών. Στην πράξη, αυτό σημαίνει ότι η εξελικτική συνέχεια των απομονωμένων πληθυσμών εξισορροπεί την εξαφάνιση γενεαλογικών γραμμών μέσα στο είδος, και έτσι μεγαλώνει την απόσταση από τον κοινό πρόγονο (coalescent time), πολύ περισσότερο απ' ότι αναμένεται για ένα ενιαίο πληθυσμό του ίδιου συνολικού μεγέθους (Nei and Takahata, 1993).

Αντίστοιχα μεγάλες ενδοειδικές αποστάσεις έχουν παρατηρηθεί και σε άλλους οργανισμούς, όπως στα σαλιγκάρια *Cepaea nemoralis* και *Helix aspersa* (Thomaz et al., 1996), όπου η διαφοροποίηση των μιτοχονδριακών απλοτύπων υπερβαίνει το 10%. Οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι το εξελικτικό δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος εμφανίζεται να είναι ασυνήθιστα μεγάλο εξαιτίας της υποδιαίρεσης κάθε είδους σε χιλιάδες μερικώς

απομονωμένους τοπικούς δήμους, που συνδέονται μεταξύ τους με stepping stone γονιδιακή ροή.

Μεγάλες γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ατόμων ενός νησιού έχουν βρεθεί και σε άλλα είδη ερπετών. Για παράδειγμα, στο νησί Gran Canaria, το είδος *Tarentola boettgeri* (Sauria: Gekkonidae) εμφανίζει γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των βόρειων και νότιων πληθυσμών του ίση με 11% για το κυτόχρωμα b (Nogales et al., 1998), και αντίστοιχα στο νησί της Τενερίφης, το συγγενές είδος *T. delalandii* ίση με 12,9% (Gübitz et al., 2000). Η διαφοροποίηση αυτή αντικατοπτρίζει παλαιότερους χωρισμούς των σημερινών νησιών σε μικρότερα νησιά, είτε οφείλεται σε απομονώσεις των αντίστοιχων πληθυσμών λόγω άλλων γεωγραφικών φραγμών.

Τελικά, σχετικά με τη δημογραφία του *M. kotschyi*, μπορούμε να συμπεράνουμε τα ακόλουθα. Στα μεγαλύτερα νησιά και στις ηπειρωτικές περιοχές η εξάπλωση του δεν είναι συνεχής. Σχηματίζει σχετικά πυκνούς πληθυσμούς σε ευνοϊκούς βιότοπους, που διαχωρίζονται από περιοχές όπου το είδος έχει αραιούς πληθυσμούς ή απουσιάζει. Έτσι έχουμε μάλλον ένα μοντέλο τοπικών δήμων που ανταλλάσσουν μεταξύ τους γονίδια, σε μικρό ή μεγάλο βαθμό, έτσι ώστε να συγκρατείται μεγάλο ποσοστό πολυμορφισμού, αλλά ταυτόχρονα να υπάρχει αρκετά μεγάλη ανάμιξη των διαφοροποιημένων απλοτύπων.

Στην περίπτωση των πληθυσμών της Β. Ελλάδας παρατηρείται μια απόκλιση από το γενικό πρότυπο. Εκεί οι πληθυσμοί από μια μεγάλη γεωγραφική περιοχή (από την Ελασσώνα μέχρι σχεδόν τα σύνορα με την Π.Γ.Δ. της Μακεδονίας) εμφανίζουν σχεδόν μηδενική νουκλεοτιδική διαφοροποίηση. Στις περιοχές αυτές το είδος ζει σχεδόν αποκλειστικά σε ανθρωπογενείς κατασκευές (σπίτια, αποθήκες). Πιθανώς η εξάπλωση του στις περιοχές αυτές έγινε πολύ πρόσφατα και με τη βοήθεια του ανθρώπου, από κάποιο πληθυσμό της Κεντρικής Ελλάδας. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι κατά τη διάρκεια της τελευταίας παγετώδους περιόδου, το *M. kotschyi* απουσίαζε από τις βόρειες περιοχές της σημερινής του εξάπλωσης, λόγω του ψυχρού κλίματος και της απουσίας κατάλληλων βιοτόπων και επεκτάθηκε προς τα βόρεια τις τελευταίες χιλιάδες χρόνια, με τη βοήθεια του ανθρώπου. Στα βόρεια της κατανομής του το είδος ζει κυρίως σε ανθρωπογενείς κατασκευές, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της ανθρωπόχωρης μεταφοράς του. Υπάρχουν, όμως και κάποιοι απομονωμένοι πληθυσμοί στα βόρεια άκρα της κατανομής (στην Π.Γ.Δ. της Μακεδονίας και στη Βουλγαρία) που έχουν χαρακτηριστεί ως διαφορετικά μορφολογικά υποείδη και πιθανώς να αποτελούν πληθυσμούς που απομονώθηκαν σε κάποια προηγούμενη μεσοπαγετώδη περίοδο. Αυτοί οι πληθυσμοί δεν

έχουν συμπεριληφθεί στην παρούσα μελέτη, οπότε δεν μπορούμε προς το παρόν να επιβεβαιώσουμε την παραπάνω υπόθεση με τη βοήθεια γενετικών δεικτών.

4.5. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΒΙΟΓΕΩΓΡΑΦΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Μία από τις μορφές γενεαλογικής συμφωνίας που διακρίνει ο Avise (1996) για την εξαγωγή φυλογενετικών συμπερασμάτων, είναι η συμφωνία των γενεαλογικών διαχωρισμών με τα γεωγραφικά όρια παραδοσιακά αναγνωρισμένων βιογεωγραφικών περιοχών. Μια τέτοια συμφωνία φανερώνει ότι υπάρχουν κοινοί, ιστορικά, βιογεωγραφικοί παράγοντες που διαμορφώνουν τις ενδοπληθυσμιακές φυλογενέσεις και τις κατανομές των οργανισμών.

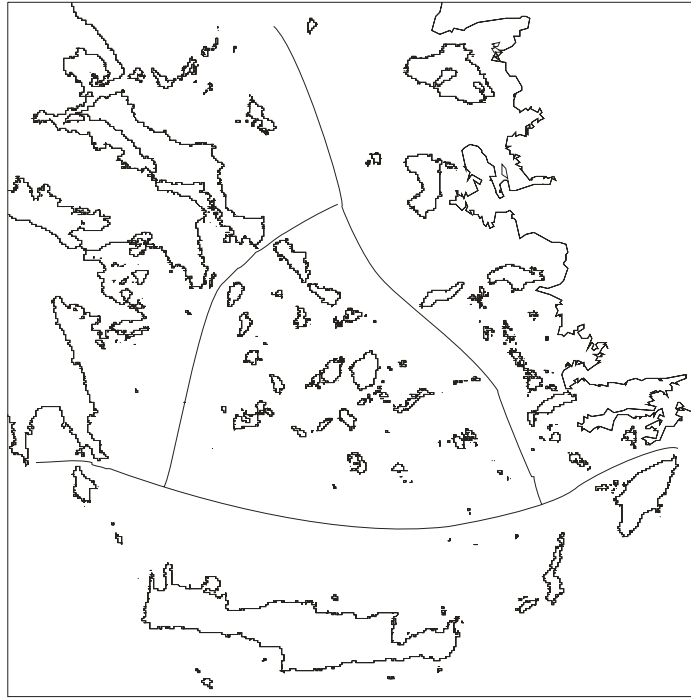
Στην περίπτωση του *M. kotschy* φαίνεται ότι οι κύριοι κλάδοι του μοριακού δένδρου αντιστοιχούν σε ξεχωριστές βιογεωγραφικές περιοχές αρκετών διαφορετικών ομάδων οργανισμών. Δυστυχώς, δεν υπάρχει καμία πλήρης βιογεωγραφική μελέτη για την όλη την περιοχή του Αιγαίου και τις γειτονικές περιοχές γι' αυτό αναγκαστικά οι συγκρίσεις θα γίνουν με βάση αποσπασματικά στοιχεία από διάφορες βιογεωγραφικές μελέτες.

Για τις ακόλουθες ομάδες φαίνεται να υπάρχει πιο ολοκληρωμένη βιογεωγραφική πληροφορία: για τα φυτά (Rechinger 1943, 1950), για τα χερσαία μαλάκια των Κυκλάδων (Μυλωνάς 1982) και των νησιών του νότιου Αιγαίου (Βαρδινογιάννη 1994), για τα χερσαία ισόποδα του κεντρικού Αιγαίου (Σφενδουράκης 1994) και για τα Κολεόπτερα των νησιών του νότιου Αιγαίου (Τριχάς 1996).

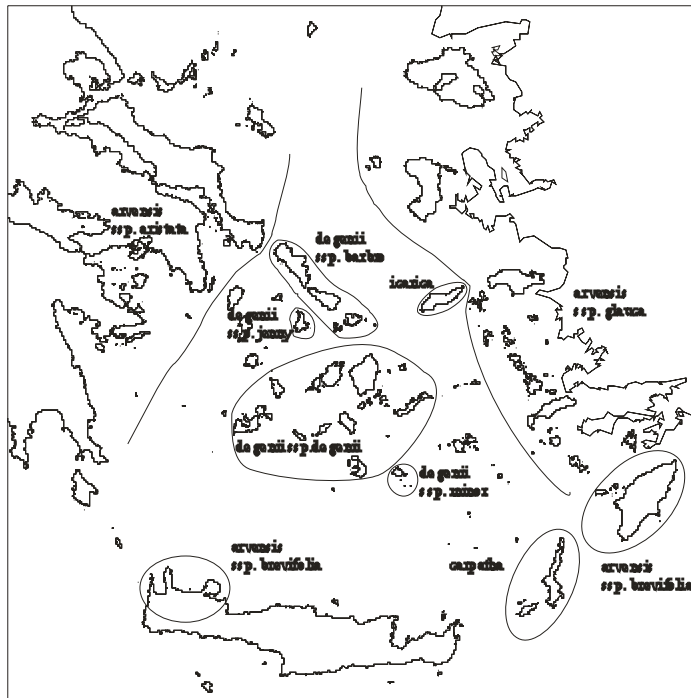
Ο Rechinger (1943, 1950) χώρισε το Αιγαίο ανάλογα με τη χλωρίδα του σε τέσσερις φυτογεωγραφικές περιοχές (εικόνα 4.2): α) την περιοχή του νότιου Αιγαίου με πολλά ενδημικά είδη, β) την περιοχή του ανατολικού Αιγαίου με έντονη την επίδραση της μικρασιατικής χλωρίδας, γ) την περιοχή του δυτικού Αιγαίου με χλωρίδα όμοια με της Ηπειρωτικής Ελλάδας, δ) την περιοχή του κεντρικού Αιγαίου, που αν και μοιάζει η χλωρίδα του με της ηπειρωτικής Ελλάδας, έχει ιδιαίτερο χαρακτήρα.

Ο Strid (1970) δίνει ένα χάρτη για τα πρότυπα εξάπλωσης των ταξινομικών μορφών του φυτού *Nigella arvensis* στην περιοχή του Αιγαίου (εικόνα 4.3). Οι περιοχές που εξαπλώνονται τα διαφορετικά υποείδη αντιστοιχούν σχεδόν απόλυτα στις περιοχές που αντιπροσωπεύουν οι κύριοι κλάδοι του φυλογενετικού δένδρου του *M. kotschy*.

Σχετικά με τα χερσαία μαλάκια της περιοχής του Αιγαίου, ο Μυλωνάς (1982) θεωρεί ότι τόσο η εξάπλωση των ενδημικών ειδών και υποειδών του Αιγαίου όσο και η εξάπλωση του συνόλου των ειδών, δείχνουν ότι η μαλακοπανίδα των Κυκλάδων



Εικόνα 4.2 : Διάρθρωση του Αιγαίου σε φυτογεωγραφικές περιοχές κατά Rechinger (1943, 1950)



Εικόνα 4.3 : Κατανομή του συμπλέγματος της *Nigella arvensis* στην περιοχή του Αιγαίου (από Strid 1970).

σχετίζεται περισσότερο με την ηπειρωτική Ελλάδα παρά με τις Ανατολικές περιοχές και την Κρήτη. Όμως τα κοινά είδη μεταξύ ηπειρωτικής Ελλάδας και Κυκλάδων εκτείνονται μόνο στα νησιά που βρίσκονται κοντά στα ηπειρωτικά παράλια (Κέα, Κύθνος, Άνδρος, Τήνος) και που σύμφωνα με την άποψή του ανήκουν ζωογεωγραφικά περισσότερο στην ηπειρωτική Ελλάδα παρά στις Κυκλάδες. Με βάση αυτή την άποψη οι υπόλοιπες Κυκλάδες αποκτούν μια ιδιαίτερη και ανεξάρτητη θέση μέσα στο Αιγαίο με ένα ιδιαίτερα ψηλό ποσοστό ενδημισμού.

Για την περιοχή του Νότιου Αιγαϊακού τόξου η Βαρδινογιάννη (1994) συμπεραίνει ότι όλα σχεδόν τα νησιά του τόξου φαίνεται να είχαν ανεξάρτητη εξέλιξη, όσον αφορά τη μαλακοπανίδα τους. Η Κρήτη είναι το πιο παλιό νησί του τόξου με πολύ υψηλό ποσοστό ενδημικών ειδών (~50%) και αρκετά απομονωμένη από όλα τα άλλα νησιά του Αιγαίου. Οι δορυφορικές νησίδες της Κρήτης και η Γαύδος απομονώθηκαν από την Κρήτη σε διάφορες χρονικές περιόδους. Τα Κύθηρα εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με την Πελοπόννησο αλλά όχι με τα Αντικύθηρα με τα οποία η ένωση ήταν παλιότερη. Η Κάσος και η Κάρπαθος φαίνεται να είχαν ανεξάρτητη ιστορία και να ενώθηκαν μόνο πρόσφατα. Η Κάρπαθος μοιάζει περισσότερο με τη Ρόδο παρά με οποιοδήποτε άλλο νησί του τόξου γεγονός που συμφωνεί με την παλαιογεωγραφική άποψη ότι τα δύο αυτά νησιά ξεχώρισαν μεταξύ τους στα τέλη Πλειοκαίνου αρχές Πλειστοκαίνου. Τέλος, η Ρόδος εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με τη Μ. Ασία.

Για τα χερσαία ισόποδα των νησιών του κεντρικού Αιγαίου, ο Σφενδουράκης (1994) διαπιστώνει ότι υπάρχει ένας βασικός βιογεωγραφικός διαχωρισμός μεταξύ των Κυκλάδων και των νησιών του ανατολικού Αιγαίου (πλην της Ικαρίας), ενώ η Κέα, Κύθνος, Άνδρος και Τήνος σχετίζονται με τις γειτονικές ηπειρωτικές περιοχές.

Όσον αφορά τα εδαφικά κολεόπτερα του νότιου Αιγαϊακού τόξου (και συγκεκριμένα τις οικογένειες Carabidae και Tenebrionidae) ο Τριχάς (1996) αναφέρει ότι διακρίνονται τρεις ζωογεωγραφικές περιοχές, μια δυτική (Κύθηρα-Αντικύθηρα), μια κεντρική (Κρήτη και δορυφορικές νησίδες) και μια ανατολική (Κάσος – Κάρπαθος – Ρόδος). Τα Κύθηρα εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με την Πελοπόννησο από την οποία πρέπει να απομονώθηκαν πολύ πρόσφατα. Η Κρήτη φαίνεται να έχει απομονωθεί από το τέλος του Μεσσηνίου. Οι δορυφορικές της νησίδες απομονώθηκαν απ' αυτήν σε διάφορες χρονικές περιόδους, η Γαύδος πιο παλιά από τις υπόλοιπες, ενώ οι πιο κοντινές πολύ πιο πρόσφατα. Πιο πολύπλοκη, σύμφωνα με τα πανιδικά στοιχεία, εμφανίζεται η εξέλιξη Καρπάθου, Κάσου και Αντικυθήρων. Η Κάρπαθος δείχνει σαφείς συσχετισμούς

τόσο με την Κάσο όσο και με τη Ρόδο ενώ τα Αντικύθηρα δείχνουν σαφείς συσχετισμούς με τα Κύθηρα και οριακό συσχετισμό με την Κρήτη.

Σχετικά με την περιοχή της Μ. Ασίας, η διαφοροποίηση του *M. kotschyi* σε υποείδη και ο αντίστοιχος φυλογεωγραφικός χωρισμός με βάση τα μοριακά δεδομένα, αντιστοιχούν αρκετά καλά στο χωρισμό της Μ. Ασίας σε βιογεωγραφικές περιοχές, όπως π.χ. για τα είδη χερσαίων μαλακίων της οικογένειας Zonitidae (Riedel, 1994).

Οι παλαιογεωγραφικές διαπιστώσεις με τις οποίες φαίνεται να συγκλίνουν οι διάφορες βιογεωγραφικές μελέτες και τα φυλογεωγραφικά πρότυπα του *M. kotschyi* είναι οι εξής:

- Η Κρήτη είναι η περιοχή που απομονώθηκε πρώτη και έχει διατηρήσει αυτή την απομόνωση από το τέλος της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου.
- Η Κάρπαθος, η Κάσος και η Ρόδος εμφανίζουν ομοιότητες μεταξύ τους και η Κάρπαθος με τη Ρόδο ήταν συνδεδεμένες μέχρι τα τέλη του Πλειοκαίνου - αρχές Πλειστοκαίνου, ενώ η Κάσος με την Κάρπαθο είχαν βέβαιη σύνδεση εντός του Πλειστοκαίνου.
- Οι κεντρικές και νότιες Κυκλάδες εμφανίζονται ως ιδιαίτερη περιοχή που ήταν χωρισμένη από τις υπόλοιπες κατά το Πλειόκαινο και έχουν μεγαλύτερη ομοιότητα με την ηπειρωτική Ελλάδα απ' ό,τι με άλλες περιοχές. Οι βόρειες Κυκλάδες έχουν στενή σύνδεση με την ηπειρωτική Ελλάδα από την οποία απομονώθηκαν σχετικά πρόσφατα, εντός του Πλειστόκαινου.
- Μεταξύ των νησιών του ανατολικού Αιγαίου και της Μ. Ασίας από τη μια και των Κυκλάδων-Ηπειρωτικής Ελλάδας από την άλλη, υπάρχει ισχυρό βιογεωγραφικό φράγμα που πιθανώς αντιστοιχεί στη δημιουργία θαλάσσιου φράγματος (η μεσοελληνική αύλακα) που δημιουργήθηκε πριν από 8 περίπου εκ. χρόνια.

Τα σημεία στα οποία φαίνεται να υπάρχει ασυμφωνία μεταξύ των γενικότερων βιογεωγραφικών αντιλήψεων και των φυλογεωγραφικών προτύπων του *M. kotschyi* είναι τα ακόλουθα: Οι διάφορες βιογεωγραφικές αναλύσεις φανερώσουν μεγαλύτερη ομοιότητα των Κυθίων με την Πελοπόννησο παρά με τα Αντικύθηρα, όπως συμβαίνει στο *M. kotschyi*, και αντίστοιχα της Ρόδου με τη Μ. Ασία παρά με το συγκρότημα Κάσου – Καρπάθου. Επιπλέον, η Γαύδος ομαδοποιείται με την Κρήτη αν και φαίνεται να έχει απομονωθεί απ' αυτήν αρκετά παλιά.

Από τα παραπάνω είναι σαφές ότι υπάρχει καλή συμφωνία της φυλογεωγραφίας του *M. kotschyi* (με βάση το γονιδιακό δένδρο της COI) και των βιογεωγραφικών δεδομένων για διάφορες ομάδες οργανισμών με τα κύρια παλαιογεωγραφικά γεγονότα που συνέβησαν στην περιοχή του Αιγαίου. Η διαπίστωση αυτή υποδεικνύει ότι το γονιδιακό δένδρο εκφράζει αρκετά πιστά τους αντίστοιχους διαχωρισμούς των πληθυσμών και αντικατοπτρίζει τα παλαιογεωγραφικά γεγονότα που τους προκάλεσαν.

4.6. ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΟΣ ΡΥΘΜΟΣ

Σύμφωνα με τη θεωρία της ουδετερότητας του Kimura (1980), ο εξελικτικός ρυθμός ισούται με το ρυθμό μεταλλαγής και είναι ανεξάρτητος από το δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος. Συνεπώς φαινόμενα που επιδρούν στο πληθυσμιακό μέγεθος, όπως οι πληθυσμιακές στενωποί, δεν θα έχουν επίδραση στον εξελικτικό ρυθμό. Η Ohta (1973, 1974, 1976, 1992), όμως, προέβλεψε ότι κάτω από ένα μοντέλο σχεδόν ουδέτερων ή ελάχιστα επιβλαβών μεταλλαγών, το πληθυσμιακό μέγεθος θα έχει επίδραση στο ρυθμό της μοριακής εξέλιξης. Αν θεωρήσουμε ότι ένα μεγάλο μέρος των κατά Kimura ουδέτερων μεταλλαγών δεν είναι απόλυτα ουδέτερες, αλλά έχουν ένα πολύ μικρό συντελεστή επιλογής s ($s < 1/2N_e$), τότε ο ρυθμός των ουδέτερων μεταλλαγών αντιπροσωπεύει το άθροισμα όλων των μεταλλακτικών ρυθμών μέχρι το συντελεστή επιλογής $s = 1/2N_e$. Επομένως, ο ουδέτερος μεταλλακτικός ρυθμός είναι συνάρτηση του δραστικού πληθυσμιακού μεγέθους και όταν το τελευταίο μειώνεται ο εξελικτικός ρυθμός αυξάνεται (Ohta, 1976). Έτσι, η Ohta (1976) προέβλεψε ότι οι πληθυσμοί μικρού μεγέθους ή πληθυσμοί που υπόκεινται σε πληθυσμιακές στενωπούς ή σε ιδρυτικά γεγονότα, θα πρέπει να εμφανίζουν αυξημένο ρυθμό μοριακής εξέλιξης.

Οι DeSalle & Templeton (1988), με τη χρήση RFLP's, έδειξαν ότι κάτι τέτοιο ισχύει για ορισμένες εξελικτικές γραμμές των ειδών *Drosophila* από τα νησιά της Χαβάης. Πιο συγκεκριμένα, η εξελικτική γραμμή, τα μέλη της οποίας είχαν υποστεί διαδοχικές πληθυσμιακές στενωπούς και ιδρυτικά γεγονότα, είχε εξελιχθεί τρεις φορές ταχύτερα από τη γραμμή που τα μέλη της είχαν προέλθει από μεγάλους προγονικούς πληθυσμούς χωρίς ιδρυτικά γεγονότα. Και άλλες πιο πρόσφατες μελέτες (π.χ. Emerson et al. 1999, για τα κολεόπτερα του γένους *Calathus* από τις Κανάριες νήσους) έδειξαν ότι νησιωτικοί πληθυσμοί που διήλθαν από πληθυσμιακές στενωπούς εξελίσσονται ταχύτερα. Οι Thorpe et al., (1994) χρησιμοποίησαν αυτή τη διαπίστωση για να βρουν ποιος είναι ο εποικιστής και ποιος ο προγονικός πληθυσμός, σε ζεύγη νησιωτικών πληθυσμών που εμφανίζονταν ως αδελφά taxa στη φυλογενετική ανάλυση. Θεώρησαν ότι σε ένα δένδρο Fitch-Margoliash ο μακρύτερος κλάδος ενός τέτοιου ζεύγους είναι πιο πιθανό να αντιστοιχεί στον εποικιστή.

Όσον αφορά το *M. kotschy*, η υποψία για έναν αυξημένο εξελικτικό ρυθμό γεννήθηκε λόγω των ασυνήθιστα μεγάλων γενετικών αποστάσεων που ανιχνεύθηκαν.

Επιπλέον, θέλαμε να ελέγξουμε αν κάποιοι νησιωτικοί πληθυσμοί, που πιθανόν να διατήρησαν μικρό δραστικό πληθυσμιακό για μεγάλο χρονικό διάστημα, εμφανίζουν αυξημένο εξελικτικό ρυθμό.

Οι έλεγχοι του σχετικού εξελικτικού ρυθμού έδειξαν ότι υπάρχει κάποια ετερογένεια στο ρυθμό με τον οποίο εξελίχθηκαν οι διάφορες γενεαλογικές γραμμές του *M. kotschyi*. Κάποιοι κλάδοι φάνηκαν να εξελίσσονται κάπως βραδύτερα από το μέσο όρο και κάποιοι άλλοι ταχύτερα. Όμως, μόνο ο κλάδος των Κυκλάδων έδειξε συστηματικά, με τη χρήση των διαφόρων ελέγχων, να εξελίσσεται ταχύτερα. Κάποια άλλη στατιστικά σημαντική πληροφορία, όπως συσχέτιση μεταξύ μεγέθους νησιού και ταχύτητας εξελικτικού ρυθμού δεν βρέθηκε από τις αναλύσεις που έγιναν.

Το ότι δεν ανιχνεύθηκαν πιο σαφή πρότυπα διαφοροποίησης του εξελικτικού ρυθμού δεν σημαίνει ότι στην πραγματικότητα δεν υπάρχουν. Όμως, πιθανώς, τα μοριακά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ανεπαρκή για να ανιχνεύσουν με σαφήνεια τέτοιες διαφορές. Σύμφωνα με τους Bromham et al. (2000) η δύναμη των ελέγχων σχετικού εξελικτικού ρυθμού εξαρτάται από α) τον αριθμό των μεταβλητών θέσεων που εξετάζονται β) το ρυθμό υποκατάστασης γ) την απόσταση των συγκρινόμενων αλληλουχιών από την εξωομάδα και δ) το πόσο διαφέρει ο εξελικτικός ρυθμός μεταξύ των αλληλουχιών που ελέγχονται.

Για τα μήκη των αλληλουχιών που χρησιμοποιούνται συνήθως σε τέτοιου είδους αναλύσεις, οι έλεγχοι σχετικού ρυθμού είναι μάλλον απίθανο να ανιχνεύσουν μεσαία επίπεδα διαφοροποίησης στον εξελικτικό ρυθμό (όταν μία εξελικτική γραμμή εξελίσσεται 1,5-4,0 φορές ταχύτερα από μια άλλη). Ειδικά για το τεστ του Tajima (και προφανώς και για άλλα τεστ), η αποτελεσματικότητά του μειώνεται όταν εφαρμόζεται σε κορεσμένα δεδομένα. Επιπλέον, οι Robinson et al. (1998) επισημαίνουν ότι η πιο ακριβής εκτίμηση επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση της πλησιέστερης εξωομάδας.

Για τα δεδομένα που εξετάσαμε ο αριθμός των μεταβλητών θέσεων ήταν μικρός (περίπου 200), υπήρχε υψηλός βαθμός ομοπλασίας και η χρήση του *Cyrtopodion scaber*, ως εξωομάδα, σε αρκετές από τις συγκρίσεις δεν ήταν η πλέον κατάλληλη. Το *Cyrtopodion scaber* δεν είναι το εγγύτερο φυλογενετικά είδος ως προς το *M. kotschyi*, και ενώ μέχρι πρόσφατα τα δύο αυτά είδη ήταν στο ίδιο γένος, τελευταία τοποθετήθηκαν σε διαφορετικά γένη (Macey et al., 2000). Για όλους αυτούς τους λόγους ήταν μάλλον απίθανο να ανιχνευθούν μεσαίου επιπέδου διαφορές στον εξελικτικό ρυθμό. Παρόλα αυτά, τουλάχιστον για την περίπτωση του κλάδου των Κυκλάδων φαίνεται να υπάρχει ένας αυξημένος εξελικτικός ρυθμός.

Από τα φυλογενετικά δεδομένα είναι φανερό ότι οι πληθυσμοί των νησιών των Κυκλάδων έχουν απομονωθεί από τους γειτονικούς πληθυσμούς για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα. Από την παλαιογεωγραφία γνωρίζουμε ότι τα νησιά των κεντρικών και νότιων Κυκλάδων απομονώθηκαν από τις γειτονικές περιοχές μέσα στο Πλειόκαινο και ότι στη συνέχεια υπήρξαν επανειλημμένες μεταβολές της έκτασής τους και των μεταξύ τους συνδέσεων, ιδιαίτερα κατά το Πλειστόκαινο, που προφανώς προκάλεσαν μείωση του δραστικού μεγέθους των πληθυσμών τους.

Κάτι αντίστοιχο πιθανώς συνέβηκε και στην περιοχή της Κάσου – Καρπάθου και σε άλλες περιοχές, αλλά οι πληθυσμοί τους δεν φάνηκε να εξελίσσονται γρηγορότερα (οι όποιες διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές). Φυσικά, ούτε η γνώση της παλαιογεωγραφίας μιας περιοχής αλλά ούτε και τα σημερινά επίπεδα γενετικού πολυμορφισμού ενός πληθυσμού προσφέρουν πάντα αξιόπιστες εκτιμήσεις για το αν πράγματι ο πληθυσμός αυτός διήλθε από διαδοχικές στενωπούς.

Ένα τελευταίο ζήτημα που πρέπει να θίξουμε είναι το εξής. Αφού το σύνολο σχεδόν των νουκλεοτιδικών αλλαγών στις αλληλουχίες του *M. kotschyi* είναι σιωπηλές, πως μπορεί, με βάση τις θεωρίες της Ohta, κάποιες από αυτές να μην είναι ουδέτερες αλλά ελάχιστα επιβλαβείς; Στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα υπάρχουν μόνο 22 tRNAs που αποκωδικοποιούν το σύνολο των κωδικονίων των mRNAs. Κάθε tRNA αποκωδικοποιεί όλα τα συνώνυμα κωδικόνια (στα οποία διαφέρει η τρίτη θέση) αλλά έχει καλύτερη προσαρμογή μόνο με ένα από αυτά. Υπάρχουν λοιπόν κωδικόνια που είναι «προτιμητέα» (αυτά που ταιριάζουν καλύτερα με το αντικωδικόνιο του αντίστοιχου tRNA και «μη προτιμητέα». Συνεπώς μια σιωπηλή μεταλλαγή τρίτης θέσης από ένα «προτιμητέο» προς ένα «μη προτιμητέο» κωδικόνιο πιθανώς δεν είναι επιλεκτικά ουδέτερη αλλά ελάχιστα επιβλαβής. Σχετικά πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι όντως υπάρχει ασθενής επιλογή εναντίων μη προτιμητέων μεταλλαγών τρίτης θέσης (π.χ. Akashi 1995, Rand & Kann, 1998 για τη *Drosophila*). Αυτή η διαφορετική προτίμηση μεταξύ των συνώνυμων κωδικονίων αναφέρεται με το όρο μεροληψία στη χρήση των κωδικονίων (codon usage bias).

4.7. ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΡΟΛΟΓΙΟΥ

4.7.1. Βαθμονόμηση του Μοριακού Ρολογιού για το *Mediodactylus kotschy*

Η τοπολογία του δένδρου των μιτοχονδριακών απλοτύπων που προέκυψε, φαίνεται να συμφωνεί πολύ καλά με τη διαδοχή των παλαιογεωγραφικών γεγονότων. Η ταύτιση των κύριων κλάδων του δένδρου με τις βιογεωγραφικές περιοχές πολλών φυτικών και ζωικών ομάδων, ενισχύει περισσότερο την άποψη ότι οι κύριοι παλαιογεωγραφικοί χωρισμοί που συνέβησαν στην περιοχή του Αιγαίου καθόρισαν τα φυλογεωγραφικά πρότυπα που παρατηρούμε σήμερα στο *M. kotschy*.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις και το γεγονός ότι ορισμένα από τα γεωλογικά συμβάντα της περιοχής είναι χρονολογημένα με σχετικά καλή ακρίβεια μας ωθεί να επιχειρήσουμε τη βαθμονόμηση ενός μοριακού ρολογιού για το είδος. Μ' αυτό τον τρόπο μπορούν να χρονολογηθούν οι χωρισμοί βασικών κλάδων του δένδρου και να διαπιστωθεί κατά πόσο συμφωνούν με τη χρονολόγηση συγκεκριμένων παλαιογεωγραφικών συμβάντων.

Η βαθμονόμηση ενός μοριακού ρολογιού δεν είναι εύκολη υπόθεση ή μάλλον είναι αρκετά πιο δύσκολη απ' ότι μπορεί κανείς αρχικά να υποθέσει. Σύμφωνα με τους Hillis et al. (1996) ακόμα και αν ίσχυαν όλες οι προϋποθέσεις για τη τέλεια βαθμονόμηση ενός μοριακού ρολογιού, οι εκτιμήσεις θα ήταν ιδιαίτερα ανακριβείς, με πολύ μεγάλα όρια εμπιστοσύνης, εξαιτίας της στοχαστικότητας με την οποία συσσωρεύονται οι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις. Ακόμα και όταν η μοριακή αλλαγή είναι γραμμική συνάρτηση του χρόνου, οι μεταλλάξεις δεν συσσωρεύονται με ρυθμό μετρονόμου αλλά ακολουθούν μια κατανομή Poisson (Wilson et al., 1987). Η αναξιοπιστία των εκτιμήσεων αυξάνει όταν κάποιες από τις προϋποθέσεις για τη βαθμονόμηση του μοριακού ρολογιού παραβιάζονται. Κάποιες από τις πιο συνηθισμένες αιτίες που εισάγουν σφάλματα στην βαθμονόμηση του μοριακού ρολογιού είναι οι ακόλουθες:

α) ο ρυθμός νουκλεοτιδικής υποκατάστασης δεν είναι πάντα σταθερός μεταξύ όλων των εξελικτικών γραμμών. Πρέπει λοιπόν να ελέγχονται τα δεδομένα, αν εξελίσσονται με σχετικά ομοιόμορφο ρυθμό και να αποκλείονται από τη βαθμονόμηση κλάδοι που εξελίσσονται με σημαντικά διαφορετικό ρυθμό.

β) Οι χρονολογήσεις που χρησιμοποιούνται ως σημεία βαθμονόμησης δεν αντιστοιχούν πάντα με το χωρισμό των αντίστοιχων κλάδων του δένδρου. Ειδικά όταν οι χρονολογήσεις προέρχονται από βιογεωγραφικά δεδομένα, πρέπει να υποθεθεί ότι ο χωρισμός των αντίστοιχων πληθυσμών ή ειδών προκλήθηκε απευθείας από το γεγονός αυτό. Αλλά ακόμα και αν το συγκεκριμένο βιογεωγραφικό συμβάν προκάλεσε άμεσα τον χωρισμό των πληθυσμών, είναι αμφίβολο αν ο χωρισμός των γενεαλογικών γραμμών (τον οποίο αποδίδει το γονιδιακό δένδρο) συμπίπτει με το χωρισμό των πληθυσμών. Συνήθως η διαφοροποίηση των γονιδιακών αλληλουχιών προηγείται του χωρισμού των πληθυσμών και ως εκ τούτου η μέτρηση της αλληλουχιακής διαφοροποίησης μπορεί μόνο να υπερεκτιμήσει τον αντίστοιχο χρόνο χωρισμού (Takahata & Nei, 1985). Επιπλέον, όσο πιο πολυμορφικός είναι ο προγονικός πληθυσμός, τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα να προηγείται ο χωρισμός των γενεαλογικών γραμμών του χωρισμού των πληθυσμών. Αυτό το γεγονός εντείνεται όταν ο προγονικός πληθυσμός παρουσιάζει γεωγραφική δομή. Οι Scott & Edwards (2000) υπολόγισαν, από φυλογεωγραφικές μελέτες διαφόρων σπονδυλοζώων, ότι η γενετική διαφοροποίηση των αλληλουχιών που συνέβη εντός του προγονικού πληθυσμού αποτελεί από λιγότερο του 10% μέχρι και πάνω από 50% της συνολικής διαφοροποίησης μεταξύ αδελφών taxa. Άρα ο προγονικός πολυμορφισμός μπορεί να εισάγει σημαντικό σφάλμα στην εκτίμηση του χρόνου διαχωρισμού των πληθυσμών. Οι Avise & Walker (1998), πρότειναν να λαμβάνεται υπόψη ο ενδοειδικός πολυμορφισμός των αντίστοιχων πληθυσμών έτσι ώστε να γίνεται διόρθωση της εκτίμησης του χρόνου διαχωρισμού τους.

Έχοντας τα παραπάνω υπόψη έγινε προσπάθεια να βαθμονομηθεί όσο καλύτερα γινόταν ένα μοριακό ρολόι για το *M. kotschyi*. Κρίναμε ότι η χρησιμοποίηση των συνολικών γενετικών αποστάσεων εισάγει μεγάλο σφάλμα στις εκτιμήσεις εξαιτίας του ότι τα δεδομένα παρουσιάζουν κορεσμό και επιπλέον υπάρχει μεγάλος ενδοειδικός πολυμορφισμός, ο οποίος θα έπρεπε να ληφθεί υπόψη. Έτσι επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε μόνο τις μεταστροφές για τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων. Οι μεταστροφές συμβαίνουν με βραδύτερο ρυθμό και υφίστανται πολύ χαμηλή ομοπλασία, ακόμα και για πολύ διαφοροποιημένες αλληλουχίες. Επιπλέον, με βάση της μεταστροφές, ο ενδοπληθυσμιακός πολυμορφισμός είναι σχεδόν μηδενικός.

Η γραμμική συσχέτιση της συσσώρευσης των μεταστροφών σε σχέση με το χρόνο διαχωρισμού έχει δείχθει για διάφορες ομάδες οργανισμών, όπως για την υποοικογένεια των Bovinae (Janacek et al. 1996). Για να είμαστε πιο σίγουροι ότι η χρήση των μεταστροφών δίνει αξιόπιστες εκτιμήσεις των γενετικών αποστάσεων και

κατά συνέπεια των χρόνων χωρισμού, βαθμονομήσαμε ένα μοριακό ρολόι για τα πρωτεύοντα, χρησιμοποιώντας το ίδιο κομμάτι της COI, από αλληλουχίες που πάρθηκαν από την GenBank. Ως σημείο βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκε ο χωρισμός των Catarrhini από τους Placentalia στα 38 εκ. χρόνια πριν, όπως έγινε και για το η ψευδογονίδιο της σφαιρίνης από τους Hasegawa et al. (1987). Οι εκτιμήσεις των χρόνων χωρισμού για τα πρωτεύοντα που εκτιμήσαμε με βάση τις μεταστροφές για το τμήμα της COI (πίνακας 4.1), ήταν μέσα στα όρια των εκτιμήσεων που δίνουν οι πιο πολλές αντίστοιχες μελέτες (Hasegawa et al. 1987, Kumar & Hedges 1998, Yoder & Yang 2000). Η μόνη απόκλιση υπήρξε για το χωρισμό ανθρώπου – χιμπατζή και αυτό γιατί το ζεύγος αυτών των ειδών παρουσιάζει ασυνήθιστα υψηλό λόγο μεταπτώσεων προς μεταστροφές.

Για να βαθμονομηθεί το μοριακό ρολόι του *M. kotschy* χρησιμοποιήθηκε ένα παλαιογεωγραφικό γεγονός που είναι σχετικά καλά χρονολογημένο: ο χωρισμός της Κρήτης από τις γειτονικές στεριές. Αυτό το γεγονός όμως συνέβη δύο φορές: πριν από 10 περίπου εκ. χρόνια όταν αποχωρίστηκε η περιοχή της Κρήτης από την ενιαία στεριά της Αιγαΐδας και πριν από 5,3 εκ. χρόνια όταν επαναπλημμύρισε η Μεσόγειος μετά το τέλος της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου. Για την πρώτη περίπτωση γνωρίζουμε από την παλαιοντολογία ότι η Κρήτη είχε πανίδα θηλαστικών ίδια με αυτή των γειτονικών περιοχών μέχρι και πριν 10 εκ. χρόνια. Για τη δεύτερη περίπτωση δεν υπάρχουν παλαιοντολογικά ευρήματα που να δείχνουν ότι η Κρήτη δέχτηκε κατά την περίοδο της κρίσης αλατότητας, πανίδα από τις γειτονικές ηπειρωτικές στεριές. Εκείνη την περίοδο η Κρήτη χωρίζονταν από τις γειτονικές περιοχές με πολύ βαθιά φαράγγια στο βάθος των οποίων υπήρχαν αφιλόξενες για τη ζωή συνθήκες και τα οποία πιθανά αποτελούσαν αξεπέραστα γεωγραφικά φράγματα για πολλούς οργανισμούς. Επιπλέον η αλληλουχία των κύριων παλαιογεωγραφικών διαχωρισμών που ακολούθησαν την απομόνωση της Κρήτης ήταν σε γενικές γραμμές παρόμοια και στις δύο περιπτώσεις (απομόνωση Κρήτης, χωρισμός Μ. Ασίας από Κυκλάδες και Ηπειρωτική Ελλάδα, απομόνωση Κάσου-Καρπάθου). Συνεπώς έπρεπε να ελέγξουμε και τα δύο αυτά εναλλακτικά σενάρια και να δούμε ποιο δίνει πιο συμβατούς χρόνους διαχωρισμού των απλοτύπων σε σχέση με τους παλαιογεωγραφικούς διαχωρισμούς.

Υπολογίστηκε η μέση γενετική απόσταση μεταξύ των ομάδων των αντίστοιχων απλοτύπων, χρησιμοποιώντας το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura μόνο για τις μεταστροφές, καθώς και το τυπικό σφάλμα (με 1000 επαναλήψεις bootstrap), με το

πρόγραμμα MEGA 2.0. Δεν συμπεριλήφθηκαν κάποιοι απλότυποι οι οποίοι εξελίσσονται ταχύτερα από το μέσο όρο με βάση τους ελέγχους σχετικού ρυθμού.

Πίνακας 4.1: Εκτιμώμενοι χρόνοι διαχωρισμού μεταξύ των πρωτεύοντων για το τμήμα της COI ομόλογο μ' αυτό που χρησιμοποιήθηκε για το *M. kotschy*. Χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι μεταστροφές. Σημείο βαθμονόμησης ο χρόνος διαχωρισμού μεταξύ Catarrhini και Platyrrhini στα 38 εκ. χρόνια πριν (Hasegawa et al. 1987). Δίνονται επίσης ο λόγος μεταπτώσεων προς μεταστροφές (R) και οι εκτιμώμενοι χρόνοι διαχωρισμού από άλλες εργασίες (¹από Hasegawa et al. 1987, ²από Kumar & Hedges 1998, ³από Yoder & Yang 2000). *Homo*: άνθρωπος, *Pan*: χιμπατζής, *Gorilla*: γορίλας, *Pongo*: ουραγοτάγκος, *Hylobates*: Siamang, *Macaca*: μακάκος, *Nycticebus*: μέλος των Platyrrhini.

Ζεύγος ειδών	R (s/v)	Εκτιμώμενος χρόνος διαχωρισμού από COI (σε εκ. χρ.)	Εκτιμώμενοι χρόνοι διαχωρισμού από άλλες εργασίες (σε εκ. χρ.)			
<i>Homo-Pan</i>	16,33	2,0	3,1-7,0 ¹			
			5,3-5,7 ²			
			4,0-6,0 ³			
<i>Homo-Gorilla</i>	4,89	5,7	4,1-7,8 ¹			
<i>Pan-Gorilla</i>	6,50	5,4	5,4-8,0 ²			
<i>Homo-Pongo</i>	2,83	11,8	9-14,8 ¹			
				<i>Pan-Pongo</i>	2,82	11,1
				<i>Gorilla-Pongo</i>	3,37	12,4
<i>Homo-Hylobates</i>	2,70	15,1	11,8-17,4 ²			
<i>Pan-Hylobates</i>	2,50	15,8				
<i>Gorilla-Hylobates</i>	2,04	18,2				
<i>Pongo-Hylobates</i>	2,28	16,5				
<i>Homo-Macaca</i>	2,06	21,5	20,5-29,5			
<i>Pan-Macaca</i>	2,00	22,2				
<i>Gorilla-Macaca</i>	2,06	22,2				
<i>Pongo-Macaca</i>	2,45	18,8				
<i>Hylobates-Macaca</i>	1,81	23,5				
<i>Homo-Nycticebus</i>	1,17	38,7	βαθμον. 38 ¹			
<i>Pan-Nycticebus</i>	0,97	38,0				
<i>Gorilla-Nycticebus</i>	1,00	39,3				
<i>Pongo-Nycticebus</i>	1,26	36,0				
<i>Hylobates-Nycticebus</i>	1,03	38,0	30 – 40 ³			
<i>Macaca-Nycticebus</i>	1,50	32,6				

Η μέση γενετική μεταξύ των απλοτύπων της Κρήτης και των υπόλοιπων περιοχών διαιρέθηκε με τον αντίστοιχο χρόνο βαθμονόμησης (10 και 5,3 χρόνια) ώστε να προκύψει ένας αντίστοιχος μέσος εξελικτικός ρυθμός. Οι μέσες γενετικές αποστάσεις και το τυπικό σφάλμα μεταξύ των άλλων ομάδων απλοτύπων διαιρέθηκαν με αυτό το ρυθμό ώστε να μετατραπούν σε μέσο χρόνο διαχωρισμού των απλοτύπων και αντίστοιχο σφάλμα. Η ελάχιστη και η μέγιστη εκτίμηση του χρόνου διαχωρισμού για τις διάφορες ομάδες απλοτύπων προέκυψε αφαιρώντας και προσθέτοντας αντίστοιχα το εκτιμώμενο σφάλμα στον εκτιμώμενο μέσο χρόνο διαχωρισμού (πίνακας 4.2). Στη συνέχεια ελέγχθηκε αν οι χρόνοι διαχωρισμού που προέκυψαν, συμφωνούν με τη χρονολόγηση των παλαιογεωγραφικών γεγονότων που αναμένεται ότι προκάλεσαν τους διαχωρισμούς αυτούς.

Στην εικόνα 4.4 δίνονται γραφικά οι εκτιμήσεις των χρόνων χωρισμού των απλοτύπων σε σχέση με κάποια σχετικά καλά χρονολογημένα παλαιογεωγραφικά γεγονότα, για τα δύο σενάρια χωρισμού της Κρήτης.

Πίνακας 4.2: Εκτίμηση χρόνου διαχωρισμού των απλοτύπων (σε εκ. χρόνια πριν από σήμερα), με βάση το χωρισμό της Κρήτης στα 10 και 5,3 εκ. χρόνια αντίστοιχα. Οι τιμές είναι ενδεικτικές.

	Εκτίμηση με βάση χωρισμό Κρήτης στα 10 εκ. χρόνια		Εκτίμηση με βάση χωρισμό Κρήτης στα 5,3 εκ. χρόνια	
	min	max	min	max
Κρήτη-[υπόλοιπα]	8,7	11,3	4,6	6,0
[Κάσος-Κάρπαθος-Πρασονήσι]-[Μ. Ασία]	7,4	9,7	3,9	5,2
κλάδος "Ηπειρωτικής Ελλάδας"-Μ.Ασία	6,8	8,9	3,6	4,7
κλάδος "Κυκλάδων"-κλάδος "Ηπειρωτικής Ελλάδας"	4,1	5,9	2,2	3,1
Κύπρος-[Ισραήλ, Άδανα, Σελεύκεια]	5,0	6,8	2,7	3,6
[Β.Ελλάδα-Β. Σποράδες]-Πελοπόννησος	2,8	4,6	1,5	2,4
Πελοπόννησος-[Κύθηρα-Αντικύθηρα]	3,2	5,0	1,7	2,7
[Κάσος- Κάρπαθος]-Πρασονήσι	1,6	2,6	0,8	1,4
Γαύδος-[Καστελόριζο-Akschehir]	2,6	4,2	1,4	2,2
Κύθηρα-Αντικύθηρα	0,4	1,2	0,2	0,6
Β. Ελλάδα-Β. Σποράδες	0,1	0,9	0,1	0,5

Το σενάριο που φαίνεται να ταιριάζει καλύτερα στα παλαιογεωγραφικά δεδομένα είναι αυτό που θεωρεί ότι ο χωρισμός των πληθυσμών του *M. kotschy* της Κρήτης συνέβηκε πριν από 10 εκ. χρόνια. Με βάση αυτή τη βαθμονόμηση έχουμε τις ακόλουθες εκτιμήσεις:

α) ο χωρισμός της Μ. Ασίας από την Ηπειρωτική Ελλάδα τοποθετείται στο ανώτερο Μειόκαινο γύρω στα 8 εκ. χρόνια. Ο Δερμιτζάκης (1989) αναφέρει ότι κατά το Μέσο Τορτόνιο και Μεσσήνιο πρέπει να υπήρχαν περιοδικές διασυνδέσεις μεταξύ Μεσογείου και Β. Αιγαίου, χωρίς να δημιουργούν φράγμα στη μετανάστευση θηλαστικών από τη Μ. Ασία προς της Ελλάδα.

β) ο χωρισμός Κάσου-Καρπάθου από τη Μικρά Ασία κατά το ανώτερο Μειόκαινο. Ο Δερμιτζάκης (1981) σε ένα παλαιογεωγραφικό χάρτη από το Τορτόνιο (περίπου 8 εκ. χρόνια πριν) εμφανίζει το συγκρότημα Κάσου-Καρπάθου ως χωριστό νησί.

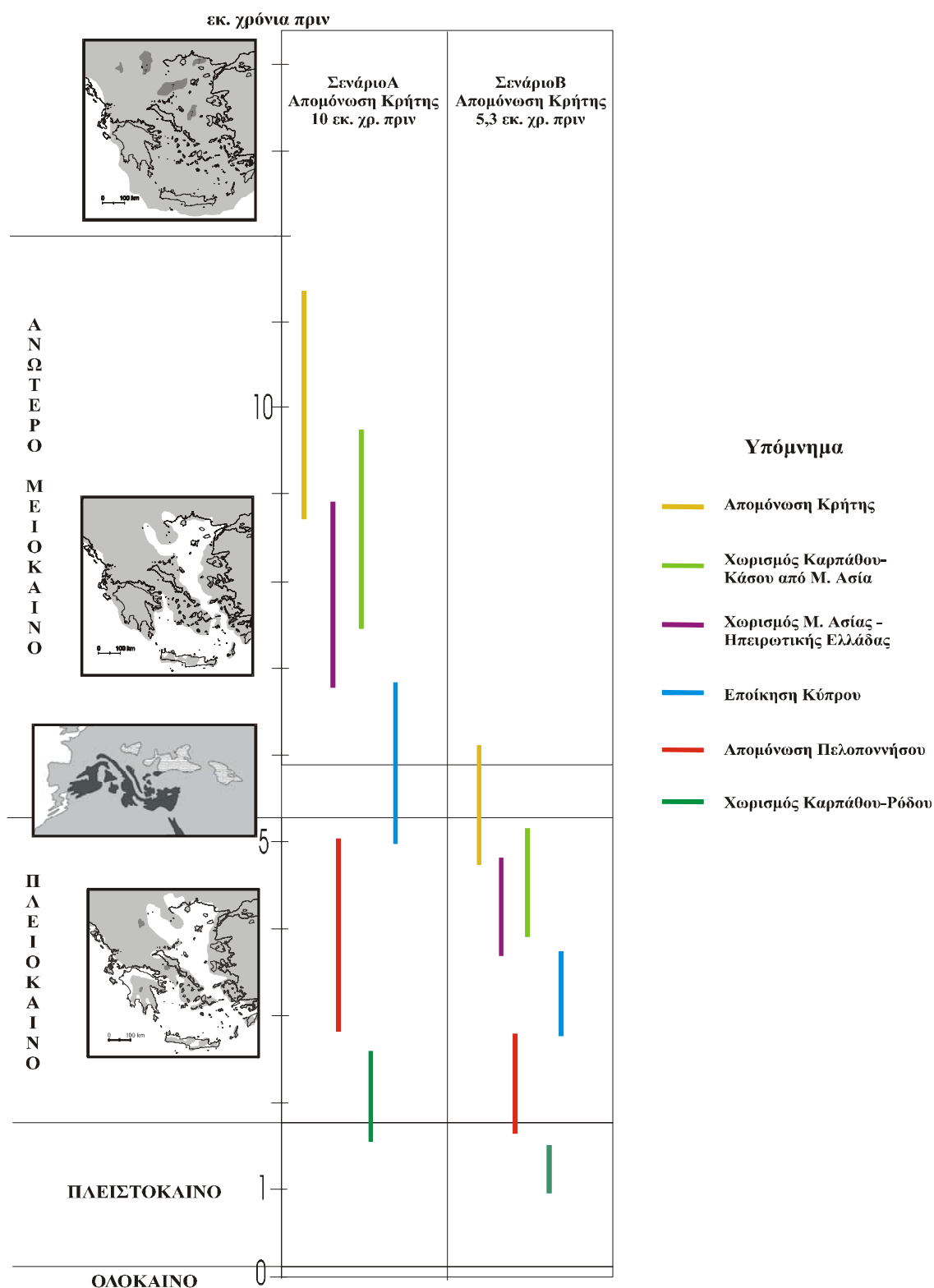
γ) η εποίκηση της Κύπρου τοποθετείται γύρω στην κρίση αλατότητας του Μεσσηνίου. Οι Hadjisterkotis et al. (2000) αναφέρουν ότι κατά τη διάρκεια της κρίσης αλατότητας η Κύπρος ήταν πιθανώς ενωμένη με την ηπειρωτική περιοχή

δ) Ο χωρισμός των κεντρικών και νότιων Κυκλάδων από τις βόρειες και την ηπειρωτική Ελλάδα στο κατώτερο Πλειόκαινο που συμφωνεί με την άποψη των Anastasakis & Dermitzakis (1990) ότι μέσα στο Πλειόκαινο οι περιοχές αυτές χωρίζονται από θαλάσσιο διάυλο

ε) ο χωρισμός της Πελοποννήσου από τη Β. Ελλάδα και το σύμπλεγμα Κυθήρων – Αντικυθήρων στο κατώτερο με μέσο Πλειόκαινο που συμπίπτει με την περίοδο που η Πελοπόννησος εμφανίζεται ως νησί (βλ εικόνα 1.12).

στ) ο χωρισμός της Καρπάθου από τη Ρόδο (Πρασονήσι) στο ανώτερο Πλειόκαινο-κατώτερο Πλειστόκαινο. Σύμφωνα με τον Kuss (1975) η σύνδεση Καρπάθου – Ρόδου έσπασε κατά το μέσο ή ανώτερο Πλειόκαινο.

Το εναλλακτικό σενάριο (χωρισμός της Κρήτης στα 5,3 εκ χρόνια) εκτιμάει το χωρισμό Μ. Ασίας – Ηπειρωτικής Ελλάδας και Κάσου-Καρπάθου με Μικρά Ασία στο ανώτερο Πλειόκαινο, το οποίο επίσης συμφωνεί με τα παλαιογεωγραφικά δεδομένα αλλά τοποθετεί το χωρισμό της Πελοποννήσου από Β. Ελλάδα και Κύθηρα-Αντικύθηρα στο κατώτερο Πλειόκαινο και αυτόν μεταξύ Καρπάθου – Ρόδου (Πρασονήσι) μέσα στο Πλειστόκαινο. Καμία από τις δύο τελευταίες εκτιμήσεις δεν μπορεί να σχετιστεί με γνωστά παλαιογεωγραφικά γεγονότα. Επιπλέον, αν δεχτούμε το σενάριο αυτό πρέπει να αποδεχτούμε έναν εξελικτικό ρυθμό για το σύνολο των μιτοχονδριακών αλληλουχιών των πληθυσμών του *M. kotschyi*, διπλάσιο από το συμβατικό 2% νουκλεοτιδική διαφοροποίηση ανά εκ. χρόνια.



Εικόνα 4.4: Γραφική αναπαράσταση των εκτιμήσεων των χρόνων διαχωρισμού των κύριων ομάδων αplotύπων του *M. kotschyi* με βάση τα δύο διαφορετικά σενάρια χωρισμού των αplotύπων της Κρήτης. Δεδομένα από πίνακα 4.2. Αριστερά παρατίθενται κάποιοι ενδεικτικοί παλαιογεωγραφικοί χάρτες που αντιστοιχούν στη χρονική κλίμακα.

4.7.2. Άλλες φυλογεωγραφικές μελέτες και βαθμονομήσεις μοριακών ρολογιών για την περιοχή του Αιγαίου

Παρόμοιου τύπου μελέτες που έχουν γίνει στην περιοχή του Αιγαίου αφορούν

α) είδη βατράχων του γένους *Rana* (Beerli et al. 1996)

β) είδη χερσαίων μαλακίων του γένους *Albinaria* (Douris et al. 1995, 1997; Δουρής 1997) και

γ) είδη της σαύρας του γένους *Podarcis* (Μίτζη 1999, Χαλκιά 2000)

4.7.2.1. Τα είδη βατράχων του γένους *Rana* (Beerli et al. 1996)

Οι Beerli et al. (1996) χρησιμοποίησαν αλλοενζυμικά δεδομένα για να βαθμονομήσουν ένα πρωτεϊνικό μοριακό ρολόι για τους πληθυσμούς των ειδών του γένους *Rana* στην περιοχή του Αιγαίου. Συσχέτισαν τις γενετικές αποστάσεις των πληθυσμών με καλά χρονολογημένους χωρισμούς νησιών:

η Κρήτη από τις υπόλοιπες περιοχές στα 5,2 εκ. χρόνια,

η Κάρπαθος από Ρόδο, Ανατολικά νησιά και Μ. Ασία στα 3 εκ. χρόνια,

η Ρόδος από Ανατολικά νησιά και Μ. Ασία στα 1,8 εκ. χρόνια,

τα Κύθηρα από την Πελοπόννησο, η Άνδρος από την Εύβοια και η Ικαρία από τη Σάμο στα 0,2 εκ. χρόνια

η Εύβοια από τη Στερεά Ελλάδα, η Σάμος από τη Μικρά Ασία και το Ezine από το Μοναστηράκι (εκατέρωθεν των Δαρδανελίων) στα 0,012 εκ. χρόνια.

Η συσχέτιση έγινε με γραμμική παλινδρόμηση των γενετικών αποστάσεων μεταξύ ζευγών πληθυσμών με τους προαναφερθέντες αντίστοιχους χρόνους χωρισμού των νησιών. Το μοριακό ρολόι που προέκυψε ($0,10 D_{Nei}^*$ ανά εκ. χρόνια) έδινε μεγάλα όρια εμπιστοσύνης για την εκτίμηση των χρόνων χωρισμού των πληθυσμών με βάση τις γενετικές αποστάσεις, αλλά όπως ισχυρίζονται οι συγγραφείς αρκετά στενά για τέτοιου είδους μελέτες.

Τα σημεία βαθμονόμησης που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία των Beerli et al. διαφέρουν σε κάποια περιπτώσεις από τους χρόνους διαχωρισμού που αποδεχθήκαμε για το *M. kotschyi*. Η κύρια διαφορά αφορά στο χωρισμό της Κρήτης από τις υπόλοιπες περιοχές που για το *Rana* εκτιμήθηκε στα 5,2 εκ. χρόνια, μετά το τέλος της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου. Η εκτίμηση αυτή επιβεβαιώνεται με μια ανεξάρτητη σύγκριση για το χωρισμό των ειδών *Rana saharica* της Αφρικής από τη *Rana perezi* της Ιβηρικής χερσονήσου που συνέβη την ίδια περίοδο, με το άνοιγμα των στενών του Γιβραλτάρ. Τα είδη αυτά απέχουν μεταξύ τους γενετική απόσταση παρόμοια μ' αυτή της Κρήτης από τις γειτονικές περιοχές.

Χωρίς να υπάρχει πρόθεση αμφισβήτησης των παραπάνω αποτελεσμάτων (τουλάχιστον όσον αφορά το χωρισμό της Κρήτης στα 5,2 εκ. χρόνια) θα πρέπει να επισημανθούν τα εξής: Ακόμα και αν χρησιμοποιηθεί ως σημείο βαθμονόμησης ο χωρισμός της Κρήτης στα 10 εκ. χρόνια και όχι στα 5,2 (με όλα τα υπόλοιπα σημεία ως έχουν), η ευθεία παλινδρόμησης που προκύπτει έχει σχεδόν τον ίδιο συντελεστή παλινδρόμησης R^2 . Επιπλέον, το εύρος των γενετικών αποστάσεων που αντιστοιχούν στα 3 εκ. χρόνια (χωρισμός Καρπάθου από Ρόδο και Μ. Ασία) και στα 1. 8 εκ. χρόνια (χωρισμός Ρόδου από Μ. Ασία) επικαλύπτονται εξ ολοκλήρου, και η γενετική απόσταση μεταξύ Κάρπαθου - Ρόδου είναι μικρότερη από τις γενετικές αποστάσεις που αντιστοιχούν στα 1,8 εκ. χρόνια. Οι ίδιοι οι συγγραφείς επισημαίνουν ότι ο χρόνος απομόνωσης της Καρπάθου είναι λιγότερο καλά προσδιορισμένος και με βάση την καμπύλη παλινδρόμησης που κατασκεύασαν η απομόνωση της Καρπάθου μπορεί να συνέβηκε μεταξύ 1,8 και 2,85 εκ. χρόνια πριν. Από τα παραπάνω είναι σαφές ότι μια τέτοια βαθμονόμηση, με γραμμική παλινδρόμηση μεταξύ γενετικών αποστάσεων και χρόνων χωρισμού, μπορεί να δίνει καλές συσχετίσεις για διαφορετικές ομάδες σημείων (π.χ. χρόνων διαχωρισμού)

Πάντως, η γεωγραφική κατανομή των ειδών *Rana* στην περιοχή του Αιγαίου συμπίπτει με το γενικό βιογεωγραφικό πρότυπο που ακολουθεί και το *M. kotschyi*: η Κρήτη έχει δικό της ενδημικό είδος (*Rana cretensis*) ενώ στην Κάρπαθο και (πιθανά στη Ρόδο) υπάρχει άλλο ενδημικό είδος (*Rana cerigensis*).

4.7.2.2. Τα είδη χερσαίων μαλακίων του γένους *Albinaria* (Douris et al. 1995, 1997; Δουρής 1997)

Ο Δουρής (1997) μελέτησε διάφορα είδη χερσαίων μαλακίων του γένους *Albinaria* στην περιοχή του Αιγαίου, με τη χρήση τεχνικών ανάλυσης μιτοχονδριακού DNA (RFLP's για το σύνολο του mtDNA, προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας για τμήματα των γονιδίων COII και 16s rRNA).

Τα γενικά συμπεράσματα που κατέληξε είναι τα ακόλουθα: Δεν φαίνεται να υπάρχει ένα ξεκάθαρο φυλογεωγραφικό πρότυπο για τα είδη της *Albinaria* στην περιοχή του Αιγαίου. Οι κύριες ομάδες ειδών, (που εμφανίζονται ως επί το πλείστον μονοφυλετικές) δημιουργούν μια ανεπίλυτη πολυτομία στη βάση του δένδρου, που κατά το συγγραφέα, φαίνεται να φανερώνει ότι η διαδοχή των γεγονότων απόκλισης (ειδογένεσης) ήταν ιδιαίτερα γρήγορη στα πρώτα στάδια της εξελικτικής ιστορίας του γένους. Πάντως, οι πληθυσμοί εντός κάθε ομάδας φαίνεται να εμφανίζουν ένα πρότυπο βικαριανιστικής διαφοροποίησης (πλησιόχωρης διαφοροποίησης), χωρίς να μπορούν να αποκλειστούν φαινόμενα διασποράς παθητικής ή ανθρωπογενούς. Στη Κρήτη τα περισσότερα από τα εξεταζόμενα taxa ομαδοποιούνται σε τρεις διακριτές μονοφυλετικές ομάδες, οι οποίες γενικά δεν σχετίζονται με αντίστοιχες ομάδες του Αιγαίου και της Ηπειρωτικής Ελλάδας.

Με βάση τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ συγκεκριμένων ομάδων ειδών, ο Δουρής προσπάθησε να χρονολογήσει κάποιους διαχωρισμούς και να τους συσχετίσει με γνωστά παλαιογεωγραφικά γεγονότα. Έτσι, η εμφάνιση και αρχική διαφοροποίηση του γένους στον Ελλαδικό χώρο (η βασική πολυτομία του φυλογενετικού δένδρου) τοποθετείται τουλάχιστον πριν από 12-14 εκ. χρόνια. Αναλογικά, ο διαχωρισμός των υποομάδων *coerulea* (των κεντρικών και ανατολικών Κυκλάδων) και *brevicollis* (Δωδεκάνησα) τοποθετείται πριν από 7-8 εκ. χρόνια, περίοδος που συμπίπτει σχετικά καλά με το διαχωρισμό της κεντρικής Αιγαιακής μάζας από τα Δωδεκάνησα και τη Μ. Ασία. Ο διαχωρισμός των ειδών *A. turrata* (δυτικές Κυκλάδες) και *A. grisea* (Αττική) πρέπει να έχει συμβεί στην αρχή της διαφοροποίησης του γένους (12-14 εκ. χρόνια πριν), πολύ νωρίτερα από τα 4-5 εκ. χρόνια που χρονολογείται ο διαχωρισμός της Αττικής – Δυτικών Κυκλάδων. Όσον αφορά τις μεγάλες μονοφυλετικές ομάδες της Κρήτης, ο διαχωρισμός τους προηγήθηκε του διαχωρισμού της Κρήτης σε διάφορα νησιά κατά το Πλειόκαινο, ενώ η ακόλουθη διαφοροποίηση μέσα στις ομάδες ήταν πιο εντοπισμένη.

Το γενικό συμπέρασμα είναι ότι συνέβηκε μια έντονη διαφοροποίηση του γένους στον Ελλαδικό χώρο 12-14 εκ. χρόνια πριν, όταν υπήρχε η ενιαία Αιγαίδα, και η μετέπειτα διαφοροποίηση των ειδών ήταν ιδιαίτερα περίπλοκη.

4.7.2.3. Είδη της σαύρας του γένους *Podarcis* (Μίζη 1999, Χαλκιά 2000).

Για την *Podarcis erhardii* και τα άλλα είδη *Podarcis* του Ελλαδικού χώρου δεν έχει γίνει καμιά ολοκληρωμένη φυλογεωγραφική μελέτη. Η Μίζη (1999) μελέτησε στη διπλωματική της εργασία τις φυλογενετικές σχέσεις των πέντε ειδών *Podarcis* που εξαπλώνονται στον Ελλαδικό χώρο, προσδιορίζοντας τη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός τμήματος του 16s rRNA. Ίσως το πιο βασικό συμπέρασμα από αυτή τη μελέτη είναι ότι η *P. erhardii* εμφανίζεται ως παραφυλετικό είδος, με την *P. peloponnesiaca* της Πελοποννήσου να σχηματίζει μονοφυλετική ομάδα εντός της *P. erhardii*. Η Χαλκιά (2000) στη μεταπτυχιακή της διατριβή μελέτησε κάποιους πληθυσμούς *P. erhardii* από τη Δυτική Κρήτη και κάποιες γειτονικές βραχονησίδες, προσδιορίζοντας τη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός τμήματος του κυτόχρωμα b. Επιπλέον, οι Harris et al. (1998, 1999), έχουν δημοσιεύσει κάποιες ομολογες με των προαναφερθεισών εργασιών αλληλουχίες για το 16s rRNA και το κυτόχρωμα b για κάποια ελληνικά είδη *Podarcis*.

Όπως είναι αντιληπτό, η πληροφορία είναι αρκετά αποσπασματική αλλά προσπαθήσαμε να τη συνοψίσουμε και να εξάγουμε κάποια φυλογεωγραφικά συμπεράσματα. Για τα είδη *P. taurica*, *P. milensis* και *P. peloponnesiaca* υπήρχαν διαθέσιμες αλληλουχίες για το 16s rRNA και το κυτόχρωμα b. Τα δύο αυτά γονίδια εξελίσσονται με διαφορετικό ρυθμό, το 16s rRNA πιο αργά από το κυτόχρωμα b. Διαιρώντας τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ των αλληλουχιών για τα παραπάνω είδη διαπιστώσαμε ότι κατά μέσο όρο το κυτόχρωμα β εξελίσσεται τρεις φορές ταχύτερα από το 16s rRNA (όλες οι γενετικές είχαν υπολογιστεί με το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura). Πολλαπλασιάζοντας με αυτό το συντελεστή (x 3) τις γενετικές αποστάσεις από την εργασία της Μίζη, τις «αναγάγαμε» στις αντίστοιχες γενετικές αποστάσεις για το κυτόχρωμα b. Στον πίνακα 4.3 δίνονται οι γενετικές αποστάσεις για διάφορα ζεύγη αλληλουχιών. Μετατρέψαμε τις γενετικές αποστάσεις σε χρόνο διαχωρισμού των αλληλουχιών με τρεις τρόπους:

1. διαιρώντας τις με τον κλασικό εξελικτικό ρυθμό του 2% νουκλεοτιδική διαφοροποίηση ανά εκ. χρόνια

2. υπολογίζοντας τον εξελικτικό ρυθμό, θεωρώντας ότι ο χωρισμός των απλοτύπων της *P. erhardi* (Κρήτη) και *P. peloponnesiaca* συνέβη στα 5,3 εκ. χρόνια (τέλος της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου),

3. υπολογίζοντας τον εξελικτικό ρυθμό, θεωρώντας ότι ο χωρισμός μεταξύ των απλοτύπων της *P. hispanica* από Μαρόκο και Ισπανία αντίστοιχα (δεδομένα από Castilla et al. 1998), συνέβη επίσης στα 5,3 εκ. χρόνια με το άνοιγμα των στενών του Γιβραλτάρ.

Παρότι οι εκτιμήσεις των χρόνων διαχωρισμού είναι αρκετά πρόχειρες, συγκλίνουν μεταξύ τους και φανερώνουν κάποια σαφή πρότυπα που φαίνεται να ταιριάζουν καλά με τα παλαιογεωγραφικά δεδομένα. Πιο συγκεκριμένα,

α) Ο χωρισμός των ειδών *P. taurica*, *P. milensis*, *P. peloponnesiaca* (και προφανώς *P. erhardii* που σχηματίζει μονοφυλετικό κλάδο μαζί με την *P. peloponnesiaca*) φαίνεται να έγινε μέσα στο Τορτόνιο (6-8 εκ. χρόνια πριν).

β) Ο διαχωρισμός των κρητικών πληθυσμών της *P. erhardii* από την *P. peloponnesiaca* (Πελοπόννησο) φαίνεται να έγινε στο τέλος του Μεσσηνίου με ανώτερο Πλειόκαινο. Την ίδια περίοδο φαίνεται να απομονώθηκε η *P. peloponnesiaca* (Πελοπόννησος) και από τους υπόλοιπους πληθυσμούς της *P. erhardii* (από κεντρική Ελλάδα, Άνδρο).

γ) Οι πληθυσμοί *P. erhardii* της Δ. Κρήτης («ορεινοί» από μεγάλα υψόμετρα των Λευκών ορέων και «πεδινοί» από χαμηλά υψόμετρα και νησάκια) φαίνεται να απομονώθηκαν κατά το μέσο Πλειόκαινο.

δ) Οι πληθυσμοί *P. erhardii* της Κεντρικής Ελλάδας και των Β. Σποράδων φαίνεται να απομονώθηκαν στα τέλη Πλειοκαίνου - αρχές Πλειστοκαίνου.

γ) Οι πληθυσμοί *P. erhardii* της Δ. Κρήτης («ορεινοί» από μεγάλα υψόμετρα των Λευκών ορέων και «πεδινοί» από χαμηλά υψόμετρα και νησάκια) φαίνεται να απομονώθηκαν κατά το μέσο Πλειόκαινο.

δ) Οι πληθυσμοί *P. erhardii* της Κεντρικής Ελλάδας και των Β. Σποράδων φαίνεται να απομονώθηκαν στα τέλη Πλειοκαίνου - αρχές Πλειστοκαίνου.

Πίνακας 4.3: Μέσες γενετικές αποστάσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών και πληθυσμών του γένους *Podarcis* και μετατροπή του σε χρόνους διαχωρισμού με βάση τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις α) θεωρώντας ότι ισχύει ο γενικός εξελικτικός ρυθμός για το mtDNA του 2% ανά εκ. χρόνια β) υπολογίζοντας τον μέσο εξελικτικό ρυθμό με βάση τον χωρισμό των πληθυσμών *P. peloponnesiaca* (της Πελοποννήσου) και *P. erhardii* της Κρήτης και γ) υπολογίζοντας τον μέσο εξελικτικό ρυθμό με βάση τον χωρισμό των πληθυσμών της *P. hispanica* του Μαρόκου και της Ισπανίας.

Ζεύγη απλοτύπων	Γενετική απόσταση	Εκτιμώμενοι χρόνοι διαχωρισμού (εκ. χρόνια πριν)		
		2% ανά εκ. χρόνια	χωρισμός Κρήτης-Πελονήσου στα 5,3 εκ. χρόνια	χωρισμός Μαρόκου-Ισπανίας στα 5,3 εκ. χρόνια
<i>P. taurica</i> - <i>P. milensis</i>	0,144	7,2	8,0	6,1
<i>P. taurica</i> - <i>P. peloponnesiaca</i>	0,159	8,0	8,8	6,7
<i>P. milensis</i> - <i>P. peloponnesiaca</i>	0,159	8,0	8,8	6,7
<i>P. pelop.</i> - <i>P. erhardii</i> (Καρδίτσα)	0,104*	5,2	5,8	4,4
<i>P. pelop.</i> - <i>P. erhardii</i> (Σκόπελος)	0,089*	4,4	4,9	3,8
<i>P. pelop.</i> - <i>P. erhardii</i> (Άνδρος)	0,102*	5,1	5,7	4,3
<i>P. pelop.</i> - <i>P. erhardii</i> (Χρυσή)	0,096*	4,8	5,3	4,1
<i>P. pelop.</i> - <i>P. erhardii</i> (Δ. Κρήτη)	0,095	4,7	5,3	4,0
<i>P. erhardii</i> (Καρδίτσα) - <i>P. erhardii</i> (Σκόπελος)	0,042*	2,1	2,3	1,8
<i>P.e.</i> (Χρυσή) - <i>P.e.</i> (Άνδρος)	0,129*	6,5	7,2	5,5
<i>P.e.</i> (Κρήτη-"ορεινή") - <i>P.e.</i> (Κρήτη-"πεδινή")	0,066	3,3	3,7	2,8
<i>P.e.</i> (Δία) - <i>P.e.</i> (Αμοργός)	0,118	5,6	6,6	5,0
<i>P. hispanica</i> (Μαρόκο)-(Ισπανία)	0,125**	6,3	7,0	5,3

* οι γενετικές αποστάσεις από Μίτζη (1999) για το 16s rRNA «ανηγμένες» σε γενετικές αποστάσεις που αντιστοιχούν στο κυτόχρωμα b.

** από Castilla et al. 1998.

Οι υπόλοιπες αλληλουχίες για το κυτόχρωμα b από Harris et al. (1999) εκτός αυτών της Δυτικής Κρήτης (από Χαλκιά 2000) και από Δία, Αμοργό (από παρούσα μελέτη)

Ανακεφαλαιώνοντας όλα τα προηγούμενα μπορούμε να πούμε τα εξής. Το *M. kotschy* και το γένος σαλιγκαριών της *Albinaria* έχουν σε γενικές γραμμές παρόμοια γεωγραφική κατανομή με κέντρο εξάπλωσης και διαφοροποίησης την περιοχή του Αιγαίου. Τα μοριακά δεδομένα φανερώνουν ότι και τα δύο αυτά taxa είχαν ευρεία εξάπλωση στην περιοχή της Αιγαίδας και ο κατακερματισμός της κατά τη διάρκεια του ανώτερου Μειόκαινου προκάλεσε τους βασικούς φυλογενετικούς χωρισμούς που παρατηρούμε σήμερα και που εμφανίζονται ως βασική πολυτομία στα αντίστοιχα φυλογενετικά δένδρα.

Αναφορικά με την *Podarcis*, η προέλευσή της είναι από τη Δυτική Μεσόγειο και φαίνεται ότι μάλλον δεν εξαπλώνονταν στην ενιαία στεριά της Αιγαίδας. Είναι

χαρακτηριστικό ότι στο Αιγαίο, η μεσοελληνική αύλακα που δημιουργήθηκε πριν από 8 περίπου εκ. χρόνια (Δερμιτζάκης 1990), αποτελεί ένα ισχυρό βιογεωγραφικό φράγμα για την εξάπλωση του είδους προς τα Ανατολικά (την περιοχή της Μ. Ασίας). Τα μοριακά δεδομένα δείχνουν ότι ο χωρισμός των ειδών *Podarcis* στον Ελλαδικό χώρο μάλλον ξεκίνησε μέσα στο Τορτόνιο (6-8 εκ χρόνια πριν). Για τον κλάδο της *P. erhardii* – *P. peloponnesiaca*, οι βασικοί χωρισμοί των πληθυσμών συνέβησαν στο τέλος του Μεσσηνίου αρχές Πλειοκαίνου. Την ίδια περίοδο απομονώνεται και η *P. peloponnesiaca* από τους υπόλοιπους πληθυσμούς της *P. erhardii* και προφανώς παρέμεινε απομονωμένη για μεγάλο διάστημα μέσα στο Πλειόκαινο ώστε να σχηματίσει χωριστό είδος.

Όσον αφορά το γένος *Rana* στην περιοχή του Αιγαίου, σύμφωνα με τον Beerli, η απομόνωση των πληθυσμών της Κρήτης συνέβηκε με τη λήξη της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου. Και στην περίπτωση του *Rana* όπως και της *P. erhardii*, η διαπίστωση αυτή φαίνεται να επιβεβαιώνεται από τον σύγχρονο χωρισμό συγγενικών ειδών από τα στενά του Γιβραλτάρ.

Η μελέτη περισσότερων ειδών και η χρήση περισσότερων μοριακών σημαντών θα αποκαλύψει με μεγαλύτερη σαφήνεια τα πρότυπα της διαφοροποίησης των οργανισμών στην περιοχή του Αιγαίου και θα επιτρέψει να αξιολογηθεί καλύτερα η επίδραση διαφόρων παλαιογεωγραφικών συμβάντων στο διαχωρισμό των ειδών και των πληθυσμών τους. Είναι βέβαιο ότι τα αποτελέσματα τέτοιων συγκριτικών φυλογεωγραφικών μελετών θα είναι ιδιαίτερα ενδιαφέροντα.

4.8. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ *TARENTOLA* ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ *M. KOTSCHYI*

Στην Ελλάδα, η *Tarentola mauritanica* εξαπλώνεται σε κάποια νησιά των Επτανήσων (Κεφαλονιά, Λευκάδα, Ζάκυνθος), στη ΒΔ Πελοπόννησο και την Κρήτη, η οποία είναι και το ανατολικότερο σημείο εξάπλωσης του είδους στη Β. Μεσόγειο. Μέχρι στιγμής δεν έχει διευκρινιστεί αν οι ελληνικοί πληθυσμοί είναι φυσικοί ή έχουν εισαχθεί από τον άνθρωπο. Μόνο για τον πληθυσμό της Ζακύνθου, αναφέρεται με βεβαιότητα ότι έχει εισαχθεί και ότι ανήκει σε ένα από τα αφρικανικά υποείδη, την *T.m. fascicularis* (Joger, 1984).

Στην Κρήτη, η *Tarentola* εμφανίζει πυκνούς πληθυσμούς σε ορισμένες περιοχές, κυρίως αστικές, αλλά δεν υπάρχει κάποια ολοκληρωμένη μελέτη για την εξάπλωση του είδους στο νησί. Σε σχέση με την εξάπλωση του *M. kotschyi*, δείχνει να εμφανίζεται μια εικόνα ανταγωνιστικού αποκλεισμού, με την *T. mauritanica* να περιορίζει το τελευταίο κυρίως σε ορεινές περιοχές του νησιού (Ψηλορείτης, Λευκά Όρη) και στις περιφερειακές νησίδες. Είναι χαρακτηριστικό ότι στη νήσο Δία, όπου υπάρχει *Tarentola*, το *M. kotschyi* απουσιάζει ενώ εμφανίζεται σε πυκνούς πληθυσμούς στα δύο περιφερειακά νησιά Γλαρονήσι και Παξιμάδι. Το ίδιο συμβαίνει και στις νησίδες του κόλπου του Μιραμπέλο: σε όσες υπάρχει η *Tarentola* απουσιάζει το *M. kotschyi* (Λυμπεράκης Π., προσωπική επικοινωνία).

Ο Μυλωνάς (προσωπική επικοινωνία), όμως, αναφέρει ότι παρατήρησε τα δύο είδη σε συμπατρία (μαζί και με το *Hemidactylus turcicus*) στο όρος Στρούμπουλας Δ. του Ηρακλείου. Είναι, πάντως, σχεδόν βέβαιο ότι η *Tarentola* είναι ανταγωνιστικά ανώτερη από το *M. kotschyi* αφού είναι πολύ πιο μεγαλόσωμη και ευκίνητη. Επίσης, είναι σχεδόν σίγουρο ότι μπορεί να το θηρεύσει, αφού το ίδιο έχει παρατηρηθεί για άλλα είδη ερπετών παρόμοιου μεγέθους (τρώει μικρά σε μέγεθος άτομα *Hemidactylus turcicus* καθώς και νεαρά άτομα *Podarcis lilfordi* και *P. sicula*, βλ. Rieppel, 1981).

Τα μοριακά δεδομένα για το *M. kotschyi* φανέρωσαν ότι οι απλότυποι των πληθυσμών από τον Ψηλορείτη και τις γύρω από την Κρήτη βραχονησίδες, δεν εμφανίζουν κάποια γεωγραφική δομή, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανά προήλθαν από μια κοινή πολυμορφική γενετική δεξαμενή που υπήρχε στην Κρήτη. Θέλαμε να ελέγξουμε αν η παρουσία της *Tarentola* στην Κρήτη οφείλεται σε πρόσφατη εισαγωγή της, γιατί κάτι τέτοιο θα αποτελούσε ισχυρή ένδειξη ότι η σημερινή κατανομή του *M.*

kotschy διαμορφώθηκε πρόσφατα εξαιτίας του ανταγωνισμού που υφίσταται από αυτή. Όντως, η μοριακή ανάλυση έδειξε ότι τα άτομα που εξετάστηκαν από την Κρήτη είναι σχεδόν όμοια με άτομα από την Τυνησία (γενετική απόσταση 0,004), ενώ απέχουν από άτομα της Κεφαλονιάς γενετική απόσταση 0.24.

Τα άτομα της Κεφαλονιάς, είχαμε θεωρήσει ότι ανήκουν στο υποείδος που υπάρχει και στη Δ. Μεσόγειο. Όμως, ο Δρ. Joger που εξέτασε τα δείγματα, διαπίστωσε ότι ανήκουν σε κάποιο αφρικανικό υποείδος.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι οι πληθυσμοί της Κρήτης και της Κεφαλονιάς (όπως και της Ζακύνθου) έχουν εισαχθεί από διαφορετικές περιοχές της Αφρικής, όπου υπάρχουν διαφορετικά υποείδη (των οποίων η ταξινομική θέση δεν έχει ακόμα ξεκαθαριστεί). Είναι πολύ πιθανό ότι όλοι οι πληθυσμοί της *Tarentola* στην Ελλάδα δεν είναι φυσικοί αλλά έχουν εισαχθεί από διάφορες περιοχές. Χρειάζεται μια εκτεταμένη φυλογεωγραφική μελέτη των πληθυσμών της *Tarentola* από Ευρώπη και Αφρική, ώστε να έχουμε μια πιο ξεκάθαρη και ολοκληρωμένη εικόνα.

Η πρόσφατη εισαγωγή της *Tarentola* στην Κρήτη, πιθανώς επέδρασε στη διαμόρφωση της σημερινής εξάπλωση του *M. kotschy*. Δεν μπορούμε όμως να πούμε με σιγουριά ότι είναι ο μόνος παράγοντας που οδήγησε το *M. kotschy* να εμφανίζει μια εικόνα υπολειμματικής κατανομής (στα ορεινά του νησιού και στις γύρω βραχονησίδες). Παρόμοια εικόνα, εμφανίζεται και σε άλλες περιοχές (π.χ. Δωδεκάνησα), όπου η *Tarentola* απουσιάζει. Μόνο μια λεπτομερής οικολογική και πανιδική μελέτη μπορεί να δώσει πιο σίγουρες απαντήσεις.

4.9. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΥΠΟΕΙΔΗ

Όπως αναφέρθηκε, σχετικά διεξοδικά στην εισαγωγή, εντός του *M. kotschy* έχουν αναγνωρισθεί περίπου 25 διαφορετικά μορφολογικά υποείδη. Ο αριθμός αυτός δεν πρέπει να θεωρείται τελεσίδικος, καθώς κατά καιρούς κάποια υποείδη καταργούνται και νέα αναγνωρίζονται. Επιπλέον, υπάρχουν ακόμα πληθυσμοί δεν έχουν εξεταστεί από ταξινομική άποψη.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν άτομα που αντιπροσωπεύουν 17 από τα υποείδη. Για τα άτομα αυτά δεν έγινε μορφολογική ανάλυση αλλά θεωρήθηκε ότι ανήκουν στο υποείδος που αναφέρεται για την περιοχή εξάπλωσής τους ή από γειτονικές περιοχές που ανήκουν στην ίδια βιογεωγραφική περιοχή. Για παράδειγμα, οι πληθυσμοί των Β. Δωδεκανήσων, οι οποίοι δεν έχουν εξεταστεί από ταξινομική άποψη, θεωρήθηκε (με τη σχετική πάντα επιφύλαξη) ότι ανήκουν στο υποείδος *M. k. beutleri*, το οποίο εξαπλώνεται στις απέναντι μικρασιατικές ακτές αλλά και στις τουρκικές νησίδες βόρεια της Σάμου (Baran & Gruber 1981, 1982).

Τρεις από τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν θεωρούνται ότι είναι ταξινομικά ενδιάμεσοι μεταξύ κάποιων από τα περιγραφέντα υποείδη. Επιπλέον, άλλοι δύο δεν έχουν ακόμα περιγραφεί από ταξινομική άποψη (Πρασονήσι, Αστακίδα).

Στην εικόνα 4.5 δίνεται η αντιστοιχία των φυλογενετικών κλάδων του δένδρου με τα περιγραφέντα υποείδη. Είναι εύκολα αντιληπτό ότι γενικά υπάρχει μια σχετικά καλή συμφωνία μεταξύ μοριακών και μορφολογικών δεδομένων αλλά σε κάποιες περιπτώσεις κάποια υποείδη εμφανίζουν πολυφυλετική ή παραφυλετική προέλευση.

Πιο συγκεκριμένα, η κατάταξη των ευρωπαϊκών υποειδών από τον Beutler (1981) σε τρεις ομάδες υποειδών, φαίνεται να έχει γερή φυλογενετική βάση. Τα υποείδη της ομάδας *kotschy* (από Ηπειρωτική Ελλάδα, Πελοπόννησο, Κύθηρα, Αντικύθηρα, Β. Σποράδες, νησιά Αργωσαρωνικού, Κυκλάδες) σχηματίζουν μια μονοφυλετική ομάδα που υποστηρίζεται από υψηλές τιμές bootstrap. Το ίδιο συμβαίνει και με τα υποείδη της ομάδας *bartoni* (από Κρήτη και περιφερειακές νησίδες) και της ομάδας *oertzeni* (Κάσου, Καρπάθου και νησίδων ΒΔ του συμπλέγματος αυτού). Υπάρχει μόνο μια ασυμφωνία για την ομάδα *oertzeni*, σχετικά με το υποείδος της Γαύδου, το οποίο ο Beutler θεωρεί ότι ταξινομικά ανήκει σ' αυτή την ομάδα, αλλά στο φυλογενετικό δένδρο ομαδοποιείται σε άλλο κλάδο. Τα υπόλοιπα ανατολικά υποείδη (από τη Μ. Ασία και Κύπρο) δεν

σχηματίζουν ένα ενιαίο μονοφυλετικό κλάδο αλλά σχηματίζουν διάφορες ομαδοποιήσεις χωριστά από τις προηγούμενες ομάδες.

Όσον αφορά τις φυλογενετικές αντιστοιχίες εντός κάθε ομάδας, τα πράγματα είναι λιγότερο σύμφωνα μεταξύ μοριακών και μορφολογικών δεδομένων. Εντός της ομάδας *kotschyi* τα υποείδη *M.k. saronicus* και *M.k. bibroni* εμφανίζονται ως πολυφυλετικά, το *M.k. solerii* παραφυλετικό ως προς το *M.k. saronicus*, και το *M.k. fuchsi* και *M.k. tinensis* παραφυλετικά ως προς το *M.k. bibroni*.

Στην ομάδα *bartoni* της Κρήτης, το υποείδος *M.k. bartonii* από τον Ψηλορείτη δεν ξεχωρίζει σε μοριακό επίπεδο από το υποείδος *M.k. wettsteini* των γειτονικών νησίδων.

Για την ομάδα *oertzeni*, οι πληθυσμοί από Κάσο και Κάρπαθο που ανήκουν στο ομώνυμο υποείδος ομαδοποιούνται μαζί, ενώ διαφορετικό κλάδο σχηματίζουν οι πληθυσμοί από το Σοφράνο και τα Τρία Νησιά που ανήκουν αντίστοιχα στα υποείδη *M.k. stepaneki* και *M.k. adelphiensis* αντίστοιχα. Το αξιοπρόσεκτο είναι ότι οι δύο αυτοί πληθυσμοί διαχωρίζονται από πολύ μικρές γενετικές αποστάσεις. Αν αυτό δεν οφείλεται σε κάποιο λάθος, η πιο λογικοφανής εξήγηση είναι ότι ο ένας πληθυσμός προήλθε από τον άλλο μέσω διασποράς και ότι η μορφολογική διαφοροποίηση είναι πιθανώς αποτέλεσμα της έντονης γενετικής παρέκκλισης που προκλήθηκε. Στον φυλογενετικό κλάδο της ομάδας *oertzeni* ανήκουν και οι πληθυσμοί από Αστακίδα και Πρασονήσι των οποίων οι ταξινομική θέση δεν έχει μελετηθεί.

Όσον αφορά τα ανατολικά υποείδη, κάθε ένα αντιπροσωπεύει διακριτό κλάδο στο φυλογενετικό δένδρο. Το ίδιο ισχύει και για τους πληθυσμούς που εμφανίζονται ως ταξινομικά ενδιάμεσοι. Όμως, τα πιο πολλά από τα υποείδη αυτά αντιπροσωπεύτηκαν με ένα μόνο άτομο στη φυλογενετική ανάλυση. Συνεπώς, δεν είμαστε σε θέση να ελέγξουμε κατά πόσο το σύνολο των πληθυσμών καθενός από αυτά εμφανίζει μονοφυλετική προέλευση ή τέτοια γενετική διαφοροποίηση (και αντίστοιχη φυλογεωγραφική δομή) που θα μας επέτρεπε να τα κατατάξουμε σε διαφορετικά υποείδη. Για τον ίδιο λόγο, δεν μπορούμε να ελέγξουμε αν οι ενδιάμεσοι ταξινομικά πληθυσμοί αντιπροσωπεύουν «υβριδικές ζώνες» μεταξύ υποειδών ή αποτελούν διακριτά υποείδη.

Από τα παραπάνω είναι σαφές ότι πολλά από τα υποείδη του *M. kotschyi* στερούνται φυλογενετικής υποστήριξης. Σχεδόν όλοι οι μορφολογικοί χαρακτήρες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό τους είναι ποσοτικοί και μάλιστα οι περισσότεροι από αυτούς διακριτοί (π.χ αριθμός κοκκίων κτλ), συχνά δε παρουσιάζουν

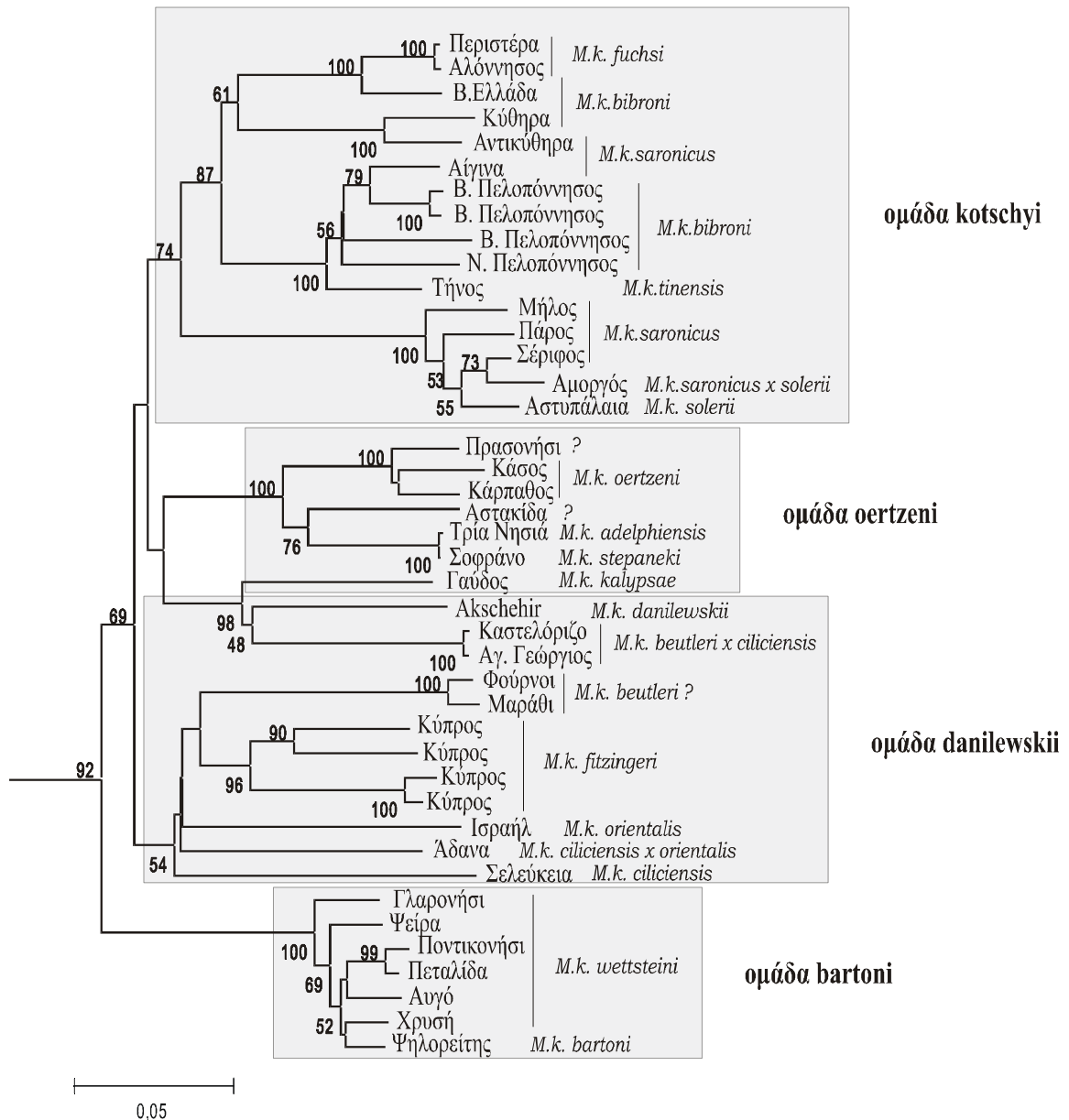
μεγάλη επικάλυψη μεταξύ των διαφορετικών υποειδών. Είναι γνωστό ότι οι ποσοτικοί χαρακτήρες ελέγχονται από πολυγονιδιακά συστήματα, άρα φαινόμενα γενετικής παρέκκλισης θα οδηγούν με τυχαίο τρόπο διαφορετικούς πληθυσμούς να διατηρούν μέρος της συνολικής ποικιλομορφίας. Έτσι π.χ. κάποιοι πληθυσμοί μπορούν να εμφανίζουν μεγάλο μορφολογικό πολυμορφισμό, ενώ κάποιοι άλλοι μέσω γενετικής παρέκκλισης να διατηρούν ένα τμήμα του πολυμορφισμού αυτού χωρίς αυτή η διαφοροποίηση να εμπεριέχει φυλογενετική πληροφορία. Επίσης, άλλοι παράγοντες όπως η επιλογή (π.χ οικολογική σύγκλιση) μπορεί να συμβάλλουν στο να εμφανίζονται μορφολογικά όμοιοι κάποιοι πληθυσμοί (π.χ. «νησιωτικοί» έναντι «ηπειρωτικών»).

Είναι σαφές ότι κάποια από τα υποείδη του *M. kotschyi* χρειάζονται αναθεώρηση. Μόνο τα μοριακά δεδομένα (και ειδικά μόνο το μιτοχονδριακό DNA) δεν αρκούν για να προταθεί μια αδιαμφισβήτητη ταξινόμηση. Χρειάζεται μια επανεξέταση των μορφολογικών χαρακτήρων των πληθυσμών και αξιολόγησή τους ως προς τη φυλογενετική πληροφορία που περιέχουν. Είναι ανάγκη να αναζητηθούν και νέοι ταξινομικοί χαρακτήρες (π.χ. μορφολογία φολίδων) που να περιέχουν φυλογενετική πληροφορία. Επίσης, για πολλούς πληθυσμούς χρειάζεται μελέτη μεγαλύτερου αριθμού ατόμων και ανάλυση των αποτελεσμάτων με σύγχρονες στατιστικές μεθόδους (π.χ. πολυμεταβλητή ανάλυση).

Πάντως, με βάση την παραχθείσα φυλογένεση προτείνονται τα ακόλουθα για την ταξινομική κατάταξη των υποειδών:

- Όλοι πληθυσμοί των κεντρικών και νότιων Κυκλάδων (που συγκροτούν μονοφυλετικό κλάδο) να ενταχθούν στο υποείδος *M.k. saronicus*. Να καταργηθεί το υποείδος *M.k. solerii*, του οποίου οι μορφολογικές διαφορές από το *M.k. saronicus* είναι ελάχιστες (Tiedemann & Häupl 1982).
- Οι πληθυσμοί της Πελοποννήσου, νησιών Αργολοσαρωνικού, Κυθήρων, Αντικυθήρων, Ηπειρωτικής Ελλάδας, Β.Κυκλάδων και Β. Σποράδων να ενταχθούν στο υποείδος *M.k. bibroni*.
- Τα δύο υποείδη της Κρήτης να γίνουν ένα.
- Τα υποείδη της Κύπρου, Γαύδου, Κάσου-Καρπάθου να παραμείνουν ως έχουν. Για την περίπτωση της Κάσου-Καρπάθου χρειάζεται μορφολογική ανάλυση και των πληθυσμών του Πρασονησίου.
- Για τα υποείδη της Μ. Ασίας χρειάζεται πιο εκτεταμένη φυλογενετική ανάλυση. Μια πρώτη εικόνα δίνει καλή συμφωνία μοριακών και μορφολογικών

δεδομένων, η οποία όμως μπορεί να είναι πλασματική λόγω του πολύ μικρού αριθμού δειγμάτων.



Εικόνα 4.5 : Αντιστοιχία των κλάδων του δένδρου με τα μορφολογικά υποείδη και τις ομάδες υποειδών κατά Beutler (1981) του *M. kotschyi*. Με ? σημειώνονται οι απλότυποι για τους οποίους δεν υπάρχουν στοιχεία σε ποιο υποείδος ανήκουν. Οι αριθμοί είναι τιμές bootstrap.

4.10. ΤΕΛΙΚΑ ΕΝΑ ΕΙΔΟΣ Η ΕΝΑ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΕΙΔΩΝ;

Οι πολύ μεγάλες γενετικές αποστάσεις που χωρίζουν τους πληθυσμούς του *M. kotschy* γεννούν το ερώτημα μήπως κάποιος από αυτούς είναι όχι απλά υποείδη αλλά διαφορετικά είδη.

Με αυτό το ερώτημα θίγουμε ένα από τα πλέον αμφιλεγόμενα θέματα στην εξελικτική βιολογία, αυτό της έννοιας του είδους. Υπάρχει ιδιαίτερα έντονη συζήτηση γύρω από αυτό το ζήτημα (βλ. π.χ. *Speciation and its consequences*, eds. Otte D. & J.A. Endler 1989) και μέχρι στιγμής το μόνο σημείο στο οποίο συγκλίνουν οι διάφορες απόψεις είναι ότι ο ορισμός του είδους είναι μια δύσκολη υπόθεση.

Το *M. kotschy* εμφανίζει από ταξινομική άποψη την εικόνα ενός πολυτυπικού είδους. Το πολυτυπικό είδος είναι μια ταξινομική (και όχι εξελικτική) έννοια που περιλαμβάνει συγγενικά taxa που διακρίνονται μορφολογικά και αντικαθιστούν το ένα το άλλο στο χώρο. Ιστορικά, η εισαγωγή αυτού του όρου ήταν η απάντηση στην τάση των ταξινομητών των αρχών του αιώνα να ονομάζουν κάθε απομονωμένο και μορφολογικά διαφοροποιημένο πληθυσμό ως νέο είδος, και στόχευε στο να απλοποιήσει την ταξινόμηση και να μειώσει τον αριθμό των περιγραφέντων ειδών (Cracraft, 1989).

Κάτω από αυτή τη θεώρηση, τα είδη εμφανίζονται υποδιαιρεμένα σε πολυάριθμες γεωγραφικές ράτσες ή υποείδη, που εμφανίζουν ένα μεγάλο εύρος μορφολογικής διαφοροποίησης: απ' το να διακρίνονται ελάχιστα από τους γειτονικούς τους πληθυσμούς έως του να είναι διακριτοί διαγνωστικά πληθυσμοί. Το συνεκτικό στοιχείο που ενώνει όλες αυτές τις μονάδες σε ένα μοναδικό πολυτυπικό είδος είναι η υπόθεση ότι δυνητικά μπορούν να διασταυρωθούν μεταξύ τους. Θεωρείται, δηλαδή, ότι δεν είναι αναπαραγωγικά απομονωμένοι, ανεξάρτητα από το βαθμό διαφοροποίησης. Αν ένας πληθυσμός είναι τόσο διαφορετικός που ένας ταξινομητής θα έκρινε ότι δεν θα μπορούσε να διασταυρωθεί αν βρισκόταν σε συμπατρία με άλλα συγγενικά taxa, τότε θεωρείται ως χωριστό βιολογικό είδος. Με βάση αυτή την αντίληψη, η ειδογένεση είναι η διαδικασία όπου τέτοιοι πληθυσμοί σταδιακά διαφοροποιούνται όλο και περισσότερο ώστε κάποια στιγμή να ξεπεράσουν τη γραμμή της αναπαραγωγικής συμβατότητας με άλλους πληθυσμούς του ίδιου πολυτυπικού είδους. Αλλά τότε ποια είναι η μονάδα της εξέλιξης; Ποια μονάδα υφίσταται ειδογένεση; Σίγουρα όχι το πολυτυπικό είδος. Οι πιο πολλοί ερευνητές θεωρούν ότι είναι το υποείδος. Όμως τα υποείδη είναι συχνά

αυθαίρετες ταξινομικές διακρίσεις, που όπως φάνηκε και στην περίπτωση του *M. kotschy* δεν έχουν πάντα φυλογενετική υπόσταση.

Η έννοια του φυλογενετικού είδους ξεπερνάει πολλές από τις αδυναμίες του βιολογικού πολυτυπικού είδους. Ένα φυλογενετικό είδος είναι μια βασική ομάδα οργανισμών, διαγνωστικά διακριτή από άλλες τέτοιες ομάδες, εντός της οποίας υπάρχει μια κοινή γενεαλογία (Cracraft 1983, 1987). Με τη χρήση μοριακών σημαντών μπορούμε εύκολα να αναπαραστήσουμε τη γενεαλογία κάποιων οργανισμών και να διακρίνουμε τέτοιες μονοφυλετικές ομάδες. Πάντως και στην περίπτωση του φυλογενετικού είδους αναγνωρίζεται η σημασία της αναπαραγωγικής συνοχής. Αυτό είναι απαραίτητο εάν θέλουμε να αποφύγουμε να προσδιορίσουμε ως διαφορετικά είδη κάθε μονοφυλετική ομάδα ατόμων ή σε ακραία περίπτωση μεμονωμένου οργανισμού ή ακόμα και διαφορετικά φύλα.

Τελικά ο έλεγχος αν απομονωμένοι αλλοπάτριοι πληθυσμοί συνιστούν πραγματικά βιολογικά είδη μπορεί να γίνει μόνο με πειραματικές διασταυρώσεις. Αυτό όμως πρακτικά είναι αρκετά δύσκολο έως αδύνατο, ειδικά για είδη με σχετικά μεγάλο χρόνο γενιάς ή είδη που δύσκολα διατηρούνται σε συνθήκες εκτροφής. Ο Rykema (1996), με πειραματικές διασταυρώσεις, που διήρκεσαν εννέα χρόνια, έδειξε ότι η σαύρα *Lacerta viridis* χωρίζεται σε δύο διαφορετικά είδη τη *L. bilineata* στη Δ. Ευρώπη και τη *L. viridis* στην Ανατολική, που εμφανίζουν αναπαραγωγική απομόνωση.

Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη της φυλογεωγραφίας με τη χρήση μοριακών εργαλείων, οδήγησε στην αποκάλυψη βαθιών εξελικτικών γραμμών εντός κάποιων ειδών. Σε κάποιες περιπτώσεις, είδη, εντός των οποίων αποκαλύφθηκαν βαθιές εξελικτικές γραμμές θεωρήθηκαν από αρκετούς ερευνητές ως σύμπλεγμα κρυπτικών ειδών (cryptic species complex) (π.χ. Wilcox et al., 1997 για το νεοτροπικό είδος ψευδοσκορπιού *Cordylochernes scorpioides*; Lee, C.E. 2000 για το κωπήποδο *Eurytemora affinis*). Στην περιοχή του Αιγαίου, οι Beerli et al. (1994), με μελέτη αλλοενζύμων, κατέταξαν τους πληθυσμούς βατράχων του είδους *Rana ridibunda* της Κρήτης και της Καρπάθου σε δύο νέα είδη, τα *Rana cretensis* και *Rana cerigensis* αντίστοιχα, με βάση το γεγονός ότι οι πληθυσμοί αυτοί περιείχαν μοναδικά αλληλόμορφα σε σχέση με τους γειτονικούς.

Φυσικά, κανένα αυθαίρετο επίπεδο γενετικής διαφοροποίησης δεν μπορεί από μόνο του να καθορίσει τα σύνορα μεταξύ βιολογικών ειδών (Avice 2000). Οι μηχανισμοί ειδογένεσης δεν σχετίζονται άμεσα με τη συσσώρευση νουκλεοτιδικών π.χ. διαφορών κατά μήκος δύο εξελικτικών γραμμών. Επιπλέον, η χρήση διαφορετικών μοριακών

δεικτών μπορεί να δώσει διαφορετική εικόνα της φυλογενετικής ιστορίας των πληθυσμών. Χρειάζονται, λοιπόν δεδομένα από διαφορετικούς μοριακούς δείκτες, μαζί με μορφολογικά, ηθολογικά, οικολογικά δεδομένα για να μπορούμε να προχωρήσουμε με ασφάλεια στην περιγραφή διακριτών εξελικτικών γραμμών ως νέων ειδών.

Όσον αφορά το *M. kotschyi*, οι κύριες εξελικτικές γραμμές χωρίζονται από γενετικές αποστάσεις που συνήθως υπερβαίνουν το 0,20. Κάποιες από τις κύριες γραμμές είναι απόλυτα διακριτές και σε μορφολογικό επίπεδο από άλλες, όπως φάνηκε από την ταύτιση των ομάδων υποειδών κατά Beutler με τα φυλογενετικά δεδομένα. Επιπλέον, οι γραμμές αυτές έχουν απομονωθεί αναπαραγωγικά για περισσότερο από 6 εκ. χρόνια (στο ανώτερο Μειόκαινο). Αυτές οι ομάδες είναι οι πληθυσμοί της Ηπειρωτικής Ελλάδας, Πελοποννήσου, Κυκλάδων, κτλ (ομάδα *kotschyi*), της Κρήτης (ομάδα *bartoni*), της Κάσου-Καρπάθου (ομάδα *oertzeni*) και της Μ. Ασίας, των γειτονικών της νησιών και της Κύπρου (ομάδα *danilewskii*). Σίγουρα χρειάζεται πιο επισταμένη μελέτη, αλλά θεωρώ αυτές τις ομάδες υποψήφιες να θεωρηθούν διαφορετικά είδη. Σχετικά με την ομάδα *danilewskii*, όπως έχει ήδη αναφερθεί, πρέπει να γίνει πιο εκτεταμένη δειγματοληψία και ανάλυση με περισσότερους μοριακούς δείκτες, ώστε να ξεκαθαριστεί η σύνδεση των κλάδων, γιατί με τα μέχρι στιγμής δεδομένα εμφανίζεται ως πολυφυλετική.

4.11. ΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΤΟΥ *M. KOTSCHYI* ΩΣ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ

Πέρα από το ερώτημα αν οι κύριοι εξελικτικοί κλάδοι του *M. kotschyi* αποτελούν διαφορετικά είδη είναι βέβαιο ότι αποτελούν διακριτές εξελικτικά σημαντικές μονάδες - ΕΣΜ (evolutionary significant unit-ESU) (Ryder 1986).

Ως ΕΣΜ ορίζεται ένας πληθυσμός ή σύνολο πληθυσμών που είναι ουσιαστικά αναπαραγωγικά απομονωμένο από άλλες συγγενικές ομάδες και αντιπροσωπεύει μια σημαντική συνιστώσα στην εξελικτική ιστορία ενός είδους (Waples 1991). Έτσι οι ΕΣΜ είναι οι κύριες πηγές ιστορικής γενετικής ποικιλότητας μέσα σε ένα είδος (Moritz, 1995).

Ο όρος αυτός χρησιμοποιείται στην Βιολογία της Διατήρησης (Conservation Biology), που αντικείμενο έχει τη διατήρηση της βιοποικιλότητας, σημαντική συνιστώσα της οποίας είναι η γενετική ποικιλότητα (Ehrlich & Wilson, 1991). Με βάση ποια κριτήρια μπορούν κάποιοι πληθυσμοί ενός είδους να χαρακτηριστούν ως ΕΣΜ; Ένα γενικό κριτήριο είναι ότι οι ΕΣΜ πρέπει να συνεισφέρουν σημαντικά στην ολική γενετική ποικιλότητα ενός είδους (Waples 1991). Μια πιο σαφής υπόδειξη είναι ότι ως ΕΣΜ πρέπει να αναγνωρίζονται ομάδες πληθυσμών που είναι αμοιβαία μονοφυλετικές για μιτοχονδριακά αλληλόμορφα και επιπλέον να διαφέρουν σημαντικά στη συχνότητα των αλληλομόρφων σε πυρηνικά γονίδια (Moritz, 1994). Πάντως και αυτές οι υποδείξεις είναι αυθαίρετες σε ένα βαθμό, αφού δεν υπάρχει σαφής γραμμή του πόσο μεγάλη γενετική διαφοροποίηση δικαιολογεί τον χαρακτηρισμό ως ΕΣΜ.

Σχετικά με το *M. kotschyi*, οι κύριοι κλάδοι του δένδρου σαφώς αποτελούν διαφορετικές ΕΣΜ. Για τους υπόλοιπους μονοφυλετικούς κλάδους ισχύει το ερώτημα, τι ποσοστό γενετικής διαφοροποίησης δικαιολογεί τον χαρακτηρισμό τους ως ΕΣΜ. Μπορούμε να θεωρήσουμε τους πληθυσμούς των Β. Σποράδων διαφορετική ΕΣΜ σε σχέση με τους πληθυσμούς της Β. Ελλάδας (μάλλον όχι), ή τους πληθυσμούς αυτούς ως διαφορετική ΕΣΜ σε σχέση με τους πληθυσμούς της Πελοποννήσου;

Επιπλέον, πρέπει να εξεταστεί η σημερινή κατάσταση των πληθυσμών ώστε να διαπιστωθεί αν κάποιοι κύριοι κλάδοι απειλούνται με εξαφάνιση όποτε χρήζουν προσοχής. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, το *M. kotschyi* παρουσιάζει πυκνούς πληθυσμούς σε μικρού και μεσαίου μεγέθους νησιά ενώ στα μεγάλα νησιά και τις ηπειρωτικές περιοχές αραιούς και απομονωμένους. Αυτό προφανώς οφείλεται στην

παρουσία πολλών ανταγωνιστικών ειδών και θηρευτών που υπάρχουν στις μεγαλύτερης έκτασης περιοχές. Το *M. kotschy* εμφανίζει χαμηλή ανταγωνιστική ικανότητα αλλά υψηλή προσαρμοστικότητα σε ακραία περιβάλλοντα (όπως αυτά των μικρών νησίδων) όπου τα ανταγωνιστικά είδη δεν μπορούν να ιδρύσουν βιώσιμους πληθυσμούς.

Είναι δύσκολο να εκτιμήσουμε με ακρίβεια ποιοι οικολογικοί παράγοντες καθορίζουν την κατανομή και την πυκνότητα των πληθυσμών του *M. kotschy* σήμερα και στο παρελθόν και πως επηρέασαν τη δημογραφία των πληθυσμών. Πάντως είναι βέβαιο πως η κατανομή και η δημογραφία των πληθυσμών έχει αλλάξει αρκετά από το τέλος της τελευταίας παγετώδους περιόδου. Για παράδειγμα, στην περιοχή των Δωδεκανήσων και της Κρήτης, παρατηρούμε το είδος να αφθονεί στις νησίδες περιμετρικά των μεγάλων νησιών, ενώ στα τελευταία εμφανίζει πολύ αραιούς πληθυσμούς ή και απουσιάζει. Όμως πριν από 10.000 χρόνια οι περιφερειακές νησίδες ήταν ενωμένες με τα μεγάλα νησιά. Ποια ήταν η πυκνότητα των πληθυσμών εκείνη την περίοδο; Ήταν αντίστοιχη με αυτή που παρατηρούμε σήμερα στα μεγάλα νησιά ή στα πιο μικρά; Δηλαδή, υπήρχαν αραιοί πληθυσμοί που τμήματά τους απονώθηκαν στα μικρά νησιά που σταδιακά αποκόπτονταν λόγω της ανόδου της στάθμης της θάλασσας και αυξήθηκαν σε μέγεθος, ή το αντίθετο;

Πάντως είναι σαφές ότι επήλθαν μεταβολές στην κατανομή και τη δημογραφία του *M. kotschy* μέσα στις τελευταίες 10.000 χρόνια. Στην περίπτωση της Κρήτης είναι μάλλον βέβαιο ότι η πρόσφατη εισαγωγή της *Tarentola* επέδρασε αρνητικά στους πληθυσμούς του *M. kotschy*. Επιπλέον, η *Tarentola*, φαίνεται ότι οδηγεί το *M. kotschy* σε εξαφάνιση από τις νησίδες τις οποίες αποικεί. Αποτελεί συνεπώς ένα πιθανά άμεσο κίνδυνο για την ύπαρξη των υποειδών της Κρήτης, και μελλοντική εξάπλωσή της σε άλλες περιοχές του Αιγαίου, ίσως απειλήσει και άλλους πληθυσμούς.

Σε αυτό το θέμα χρειάζονται άμεσα περισσότερες οικολογικές μελέτες ώστε να αξιολογηθεί η πιθανή απειλή που αντιπροσωπεύει η *Tarentola* για τους πληθυσμούς του *M. kotschy*.

4.12. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κύρια συμπεράσματα της παρούσας διατριβής είναι τα ακόλουθα:

Το *M. kotschy* εμφανίζει έντονη γενετική διαφοροποίηση στα νησιά του Αιγαίου και τις γειτονικές περιοχές. Οι πληθυσμοί του χωρίζονται από πολύ μεγάλες γενετικές αποστάσεις και εμφανίζουν σαφή φυλογεωγραφική δομή. Οι ομαδοποιήσεις των πληθυσμών, όπως αποτυπώνονται στους κύριους κλάδους του γονιδιακού δένδρου, αντιστοιχούν σε γνωστές βιογεωγραφικές περιοχές πολλών διαφορετικών ομάδων οργανισμών. Οι περιοχές αυτές είναι γνωστό από την παλαιογεωγραφία ότι διαχωρίστηκαν από θαλάσσια φράγματα σε διάφορες φάσεις από τη διάσπαση της ενιαίας ξηράς της Αιγαίδας και η αλληλουχία αυτών των διαχωρισμών φαίνεται να ταιριάζει με τους αντίστοιχους διαχωρισμούς των κλάδων του γονιδιακού δένδρου του *M. kotschy*. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η διαφοροποίηση των πληθυσμών του είδους είναι αποτέλεσμα βικαριανισμού. Εντούτοις ανιχνεύθηκαν και κάποια πρότυπα (με εξέχον τη σύνδεση της Γαύδου με τη Μ. Ασία) που μπορούν να αποδοθούν σε φαινόμενα διασποράς.

Σχετικά με τη γενετική διαφοροποίηση σε ενδοπληθυσμιακό επίπεδο, υπάρχει θετική συσχέτιση με το μέγεθος του αντίστοιχου νησιού. Τα μικρά νησιά εμφανίζουν μηδενικό πολυμορφισμό, ενώ στα μεγάλα νησιά (Πελοπόννησος, Κύπρος) η μέγιστη γενετική διαφοροποίηση φθάνει στο 10%. Συνδυάζοντας τα μοριακά δεδομένα με μια γενική γνώση της σημερινής δημογραφικής δομής των πληθυσμών μπορούμε να υποθέσουμε ότι στα μεγάλα νησιά και στις ηπειρωτικές περιοχές οι πληθυσμοί του *M. kotschy* εμφανίζουν ένα πρότυπο απομονωμένων δήμων με μικρή γενετική ροή, γεγονός που επιτρέπει τη διατήρηση παλιά διαχωρισμένων μιτοχονδριακών απλότυπων. Όσον αφορά τα μικρά νησιά, τα περισσότερα απομονώθηκαν σχετικά πρόσφατα (εντός του κατώτερου Πλειστόκαινου) από μεγαλύτερες χερσαίες περιοχές, οπότε οι αντίστοιχοι πληθυσμοί απώλεσαν το μεγαλύτερο μέρος της ποικιλότητας που περιείχαν κατά τη στιγμή του διαχωρισμού, λόγω φαινομένων γενετικής παρέκκλισης.

Παρότι η βαθμονόμηση ενός μοριακού ρολογιού είναι μια δύσκολη και αμφιλεγόμενη υπόθεση, στη συγκεκριμένη περίπτωση, έδειξε καλή συμφωνία μεταξύ παλαιογεωγραφικών και μοριακών δεδομένων, αλλά και επέτρεψε να ελεγχθούν δύο διαφορετικά σενάρια σχετικά με τα γεγονότα που προκάλεσαν τους διαχωρισμούς των

πληθυσμών του *M. kotschy*. Το ένα σενάριο θεωρεί ότι η διαφοροποίηση των πληθυσμών του είδους ξεκίνησε με το χωρισμό της Κρήτης πριν περίπου 10 εκ. χρόνια στην πρώτη φάση του κατακερματισμού της Αιγαίδας, ενώ το άλλο στα 5,3 εκ. χρόνια με το τέλος της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου. Τελικά, θεωρήσαμε ότι τα μοριακά δεδομένα ταιριάζουν καλύτερα με την διαδοχή των παλαιογεωγραφικών γεγονότων που ακολούθησαν το χωρισμό της Κρήτης από την ενιαία στεριά της Αιγαίδας πριν 10 εκ. χρόνια. Με βάση αυτή την παραδοχή, και με μια συνολική θεώρηση των δεδομένων, οι διαχωρισμοί του γονιδιακού δένδρου του *M. kotschy* αντιστοιχούν στα ακόλουθα γεγονότα:

Χωρισμός της Κρήτης πριν από 10 περίπου εκ. χρόνια

Χωρισμός Μ. Ασίας-Δωδεκανήσων από Κυκλάδες-Ηπειρωτική Ελλάδα και απομόνωση του συγκροτήματος Κάσου-Καρπάθου πριν από 10-7 εκ χρόνια (Κατώτερο Μειόκαινο - Τορτόνιο). Μεταξύ 10 και 6 εκ. χρόνων τοποθετούνται και όλοι ο βασικοί διαχωρισμοί των κύριων κλάδων του δένδρου, οι οποίοι σχηματίζουν πολυτομία στο δενδρόγραμμα πλειοψηφικής συναποδοχής.

Εποίκηση Κύπρου 7-5 εκ χρόνια πριν (κατά τη διάρκεια του Μεσσηνίου)

Χωρισμός κεντρικών – νότιων Κυκλάδων από Ηπειρωτική Ελλάδα και στη συνέχεια απομόνωση της Πελοποννήσου από Β. Ελλάδα και Κύθηρα-Αντικύθηρα στα 5-3 εκ χρόνια πριν (κατά το κατώτερο με μέσο Πλειόκαινο).

Χωρισμός Καρπάθου από Ρόδο κατά τα τέλη Πλειοκαίνου – αρχές Πλειστοκαίνου.

Χωρισμός Κυθήρων από Αντικύθηρα, Β. Σποράδων από Β. Ελλάδα, Κάσου από Κάρπαθο από τέλη Πλειοκαίνου μέχρι εντός του Πλειστοκαίνου.

Χωρισμός Φούρνων από Μαράθι (Β. Δωδεκάνησα), Πεταλίδα από Ποντικονήσι, Αλόνησος από Περιστέρα και Αγ. Γεώργιος από Καστελόριζο κατά το κατώτερο Πλειστόκαινο.

Κάτι αξιοσημείωτο στη φυλογεωγραφία του *M. kotschy* είναι ότι στο γονιδιακό του δένδρο έχουν διατηρηθεί διαχωρισμοί που συνέβησαν στο παρελθόν, παρότι στη συνέχεια οι αντίστοιχες περιοχές ενώθηκαν ξανά. Τέτοιες περιπτώσεις είναι μεταξύ άλλων ο διαχωρισμός της Πελοποννήσου από τη Β. Ελλάδα, που συνέβη στο Πλειόκαινο αλλά κατόπιν επανασυνδέθηκαν στο Πλειστόκαινο και ομοίως ο χωρισμός των κεντρικών και νότιων Κυκλάδων από τις Βόρειες. Πιθανή ερμηνεία γι' αυτό το

φαινόμενο είναι η ύπαρξη άλλων γεωγραφικών φραγμών που δεν επέτρεψαν στους διαχωρισμένους πληθυσμούς να έρθουν ξανά σε επαφή ή ότι και αν υπήρξε επαφή οι αντίστοιχοι απλότυποι δεν επιβίωσαν ή δεν ανιχνεύθηκαν.

Σε συγκρίσεις με μοριακά δεδομένα από άλλους οργανισμούς της περιοχής του Αιγαίου, που εμφανίζουν παρόμοια πρότυπα βικαριανιστικής διαφοροποίησης, φάνηκε ότι αντίστοιχοι φυλογεωγραφικοί διαχωρισμοί δεν έχουν προκληθεί πάντα από τα ίδια παλαιογεωγραφικά γεγονότα. Το γένος χερσαίων μαλακίων *Albinaria* παρουσιάζει παρόμοια ιστορία διαφοροποίησης στο χώρο του Αιγαίου με αυτή του *M. kotschy*, αν και στην πρώτη περίπτωση τα φυλογεωγραφικά πρότυπα είναι αρκετά συγκεχυμένα και ασαφή. Πάντως και στις δύο περιπτώσεις ο κατακερματισμός της Αιγαίδας που συνέβη κατά το ανώτερο Μειόκαινο προκάλεσε τους κύριους φυλογεωγραφικούς διαχωρισμούς. Στην περίπτωση των βατράχων του γένους *Rana* και της σαύρας *Podarcis erhardii* και του παραφυλετικού προς αυτή είδους *P. peloponnesiaca* φαίνεται ότι η διαφοροποίησή τους στο χώρο του Αιγαίου ξεκίνησε με το τέλος της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου. Μεταξύ *M. kotschy* και *Podarcis* υπάρχουν κάποιοι κοινοί φυλογεωγραφικοί διαχωρισμοί, όπως ο χωρισμός της Πελοποννήσου από τη Β. Ελλάδα στο κατώτερο Πλειόκαινο και ο χωρισμός των Β. Σποράδων από την κεντρική Ελλάδα στα τέλη Πλειστοκαίνου με αρχές Πλειοκαίνου.

Η σύγκριση του γονιδιακού δένδρου του *M. kotschy* με τα μορφολογικά υποείδη του, έδειξε ότι γενικά υπάρχει μια καλή συμφωνία, αν και σε αρκετές περιπτώσεις οι διαχωρισμοί κάποιων υποειδών στερούνται φυλογενετικής στήριξης. Η κατάταξη των υποειδών σε ομάδες υποειδών από τον Beutler (1981) φαίνεται να έχει πιο στέρεη φυλογενετική βάση. Πάντως είναι αναγκαία μια συνολική ταξινομική αναθεώρηση των σημερινών υποειδών με βάση τα μοριακά ευρήματα της παρούσας μελέτης. Συναφές, είναι και το ερώτημα του κατά πόσο κάποιοι πληθυσμοί του *M. kotschy* μπορούν να χαρακτηριστούν ως χωριστά είδη εξαιτίας των πολύ μεγάλων γενετικών αποστάσεων που τους χωρίζουν. Οι γενετικές αποστάσεις με βάση το μιτοχονδριακό DNA δεν θεωρούνται ασφαλές κριτήριο για τον προσδιορισμό διαφορετικών ειδών. Χρειάζονται συνεπώς και άλλοι γενετικοί δείκτες, μορφολογικές μελέτες αλλά πιθανώς και πειραματικές διασταυρώσεις πριν καταλήξει κανείς να προσδιορίσει συγκεκριμένες φυλογενετικές ομάδες ως διαφορετικά είδη. Από την άποψη της γενετικής της διατήρησης, οι διάφοροι κλάδοι του *M. kotschy* ασφαλώς και συνιστούν εξελικτικά σημαντικές μονάδες, κάποιες από τις οποίες πιθανώς χρειάζονται προστασία, λόγω των μικρών και γεωγραφικά εντοπισμένων πληθυσμών τους. Στα

πλαίσια αυτά πρέπει να ελεγχθεί κατά πόσο η πιθανή εξάπλωση του σαμιαμιδιού *Tarentola mauritanica* στον Ελλαδικό χώρο ενδέχεται να επιδράσει αρνητικά ή και να οδηγήσει σε εξαφάνιση κάποιους από τους πληθυσμούς του *M. kotschyi*. Η παρουσία της *Tarentola* στην Ελλάδα είναι αποτέλεσμα πρόσφατης ανθρωπόχωρης διασποράς, κάτι που δείξαμε στην παρούσα μελέτη για την παρουσία του είδους στην Κρήτη. Δεδομένα πεδίου από την Κρήτη και τις περιφερειακές νησίδες της δείχνουν ότι η *Tarentola* πιθανά ανταγωνίζεται το *M. kotschyi* και το οδηγεί σε εξαφάνιση από νησίδες που εποικεί.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αρχιπέλαγος του Αιγαίου, είναι ένας χώρος με πολύπλοκη γεωλογική ιστορία, μεγάλη βιοποικιλότητα, όπου συντελούνται έντονες εξελικτικές διεργασίες, αλλά όμως είχε ελάχιστα προσελκύσει το ενδιαφέρον των εξελικτικών βιολόγων. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αποκάλυψη των φυλογεωγραφικών προτύπων της σαύρας *Mediodactylus kotschy* και η συσχέτισή τους με την παλαιογεωγραφική ιστορία της περιοχής του Αιγαίου. Το *M. kotschy* θεωρήθηκε ιδανικός οργανισμός για τέτοιου είδους μελέτη επειδή παρουσιάζει ευρεία εξάπλωση στα νησιά του Αιγαίου και τις γειτονικές ηπειρωτικές στεριές και επιπλέον εμφανίζει μεγάλη μορφολογική διαφοροποίηση με τουλάχιστον 25 περιγραφέντα υποείδη.

Για να διερευνηθεί η φυλογεωγραφία του είδους προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός τμήματος της πρώτης υπομονάδας του μιτοχονδριακού γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης, από 105 άτομα που αντιπροσωπεύουν 43 διαφορετικούς πληθυσμούς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το *M. kotschy* εμφανίζει έντονη γενετική διαφοροποίηση στα νησιά του Αιγαίου και τις γειτονικές περιοχές. Οι πληθυσμοί του χωρίζονται από πολύ μεγάλες γενετικές αποστάσεις, που σε κάποιες περιπτώσεις ξεπερνούν το 30%. Οι διάφορες μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης συγκλίνουν σε μια κοινή τοπολογία που περιλαμβάνει 10 κύριους μονοφυλετικούς κλάδους που στηρίζονται με τιμές bootstrap μεγαλύτερες από 90% και εμφανίζουν σαφή γεωγραφική δομή. Οι κλάδοι αυτοί είναι οι ακόλουθοι:

1. «Κλάδος Κρήτης»: Κρήτη και δορυφορικές νησίδες, **2.** «Κλάδος Κάσου-Καρπάθου»: Περιλαμβάνει τους απλότυπους από Κάσο, Κάρπαθο και Πρασονήσι (μονοφυλετικός κλάδος) μαζί με τους απλότυπους από τα νησάκια ΒΔ της Καρπάθου, Σοφράνο, Τρία νησιά και Αστακίδα (μονοφυλετικός κλάδος), **3.** «Κλάδος Κυκλάδων»: Κεντρικές και νότιες Κυκλάδες (Πάρος, Σέριφος, Μήλος, Αμοργός, Αστυπάλαια), **4.** «Κλάδος Ηπειρωτικής Ελλάδας»: Περιλαμβάνει τους απλότυπους από Πελοπόννησο, Αίγινα και Τήνο («κλάδος Πελοποννήσου»), Βόρεια Ελλάδα και Σποράδες («κλάδος Β. Ελλάδας»), Κύθηρα, Αντικύθηρα («κλάδος Κυθήρων-Αντικυθήρων»), **5.** «Κλάδος Β. Δωδεκανήσων», **6.** «Κλάδος Γαύδου – Καστελόριζου – Akschehir», **7.** «Κλάδος Κύπρου», **8.** «Κλάδος Αδάνων», **9.** «Κλάδος Ισραήλ», **10.** «Κλάδος Σελεύκειας».

Οι ομαδοποιήσεις των πληθυσμών, όπως αποτυπώνονται στους κύριους κλάδους του γονιδιακού δένδρου, αντιστοιχούν σε γνωστές βιογεωγραφικές περιοχές πολλών διαφορετικών ομάδων οργανισμών. Οι περιοχές αυτές είναι γνωστό από την παλαιογεωγραφία ότι διαχωρίστηκαν από θαλάσσια φράγματα σε διάφορες φάσεις από τη διάσπαση της ενιαίας ξηράς της Αιγαίδας και η αλληλουχία αυτών των διαχωρισμών φαίνεται να ταιριάζει με τους αντίστοιχους διαχωρισμούς των κλάδων του γονιδιακού δένδρου του *M. kotschyi*. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η διαφοροποίηση των πληθυσμών του είδους είναι αποτέλεσμα βικαριανισμού. Εντούτοις ανιχνεύθηκαν και κάποια πρότυπα (με εξέχον τη σύνδεση του κλάδου της Γαύδου με της *M. Ασία*) που μπορούν να αποδοθούν σε φαινόμενα διασποράς.

Σχετικά με τη γενετική διαφοροποίηση σε ενδοπληθυσμιακό επίπεδο, υπάρχει θετική συσχέτιση με το μέγεθος του αντίστοιχου νησιού. Τα μικρά νησιά εμφανίζουν μηδενικό πολυμορφισμό, ενώ στα μεγάλα νησιά (Πελοπόννησος, Κύπρος) η μέγιστη γενετική διαφοροποίηση φθάνει στο 10%. Συνδυάζοντας τα μοριακά δεδομένα με μια γενική γνώση της σημερινής δημογραφικής δομής των πληθυσμών μπορούμε να υποθέσουμε ότι στα μεγάλα νησιά και στις ηπειρωτικές περιοχές οι πληθυσμοί του *M. kotschyi* εμφανίζουν ένα πρότυπο απομονωμένων δήμων με μικρή γενετική ροή, γεγονός που επιτρέπει τη διατήρηση παλαιά διαχωρισμένων μιτοχονδριακών απλοτύπων. Αντιθέτως, στα μικρά νησιά, ο μηδενικός πολυμορφισμός οφείλεται σε φαινόμενα γενετικής παρέκκλισης.

Παρότι η βαθμονόμηση ενός μοριακού ρολογιού είναι μια δύσκολη και αμφιλεγόμενη υπόθεση, στη συγκεκριμένη περίπτωση, έδειξε καλή συμφωνία μεταξύ παλαιογεωγραφικών και μοριακών δεδομένων, αλλά και επέτρεψε να ελεγχθούν δύο διαφορετικά σενάρια σχετικά με τα γεγονότα που προκάλεσαν τους διαχωρισμούς των πληθυσμών του *M. kotschyi*. Το ένα σενάριο θεωρεί ότι η διαφοροποίηση των πληθυσμών του είδους ξεκίνησε με το χωρισμό της Κρήτης πριν περίπου 10 εκ. χρόνια στην πρώτη φάση του κατακερματισμού της Αιγαίδας, ενώ το άλλο στα 5,3 εκ. χρόνια με το τέλος της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου. Τελικά, θεωρήσαμε ότι τα μοριακά δεδομένα ταιριάζουν καλύτερα με την διαδοχή των παλαιογεωγραφικών γεγονότων που ακολούθησαν το χωρισμό της Κρήτης από την ενιαία στεριά της Αιγαίδας πριν 10 εκ. χρόνια. Με βάση αυτή την παραδοχή, όλοι ο βασικοί διαχωρισμοί των κύριων κλάδων του δένδρου (οι οποίοι σχηματίζουν πολυτομία στο δενδρόγραμμα πλειοψηφικής συναποδοχής) τοποθετούνται μεταξύ 10 και 6 εκ. χρόνων, ενώ ο χωρισμός των κεντρικών – νότιων Κυκλάδων από την Ηπειρωτική Ελλάδα και στη συνέχεια

απομόνωση της Πελοποννήσου από Β. Ελλάδα και Κύθηρα-Αντικύθηρα, τοποθετείται στα 5-3 εκ χρόνια πριν (κατά το κατώτερο με μέσο Πλειόκαινο), ενώ ο χωρισμός της Καρπάθου από τη Ρόδο φαίνεται να συνέβη κατά τα τέλη Πλειοκαίνου – αρχές Πλειστοκαίνου.

Σε συγκρίσεις με μοριακά δεδομένα από άλλους οργανισμούς της περιοχής του Αιγαίου (*Albinaria*, *Podarcis*, *Rana*) που εμφανίζουν παρόμοια πρότυπα βικαριανιστικής διαφοροποίησης, φάνηκε ότι αντίστοιχοι φυλογεωγραφικοί διαχωρισμοί δεν έχουν προκληθεί πάντα από τα ίδια παλαιογεωγραφικά γεγονότα. Το γένος χερσαίων μαλακίων *Albinaria* παρουσιάζει παρόμοια ιστορία διαφοροποίησης στο χώρο του Αιγαίου με αυτή του *M. kotschy*, με τον κατακερματισμό της Αιγαίδας κατά το ανώτερο Μειόκαινο να προκαλεί τους κύριους φυλογεωγραφικούς διαχωρισμούς. Στην περίπτωση των βατράχων του γένους *Rana* και της σαύρας *Podarcis erhardii* και του παραφυλετικού προς αυτή είδους *P. peloponnesiaca* η διαφοροποίησή τους στο χώρο του Αιγαίου φαίνεται να ξεκίνησε με το τέλος της κρίσης αλατότητας του Μεσσηνίου.

Η αντιστοιχία των κλάδων του γονιδιακού δένδρου με τα μορφολογικά υποείδη του *M. kotschy*, έδειξε ότι γενικά υπάρχει μια καλή συμφωνία, αν και σε αρκετές περιπτώσεις κάποια υποείδη δεν είναι μονοφυλετικά. Η κατάταξη των υποειδών σε ομάδες υποειδών από τον Beutler (1981) φαίνεται να έχει πιο στέρεη φυλογενετική βάση. Πάντως είναι αναγκαία μια συνολική ταξινομική αναθεώρηση των σημερινών υποειδών με βάση τα μοριακά ευρήματα της παρούσας μελέτης. Συναφές, είναι και το ερώτημα του κατά πόσο κάποιοι πληθυσμοί του *M. kotschy* μπορούν να χαρακτηριστούν ως χωριστά είδη εξαιτίας των πολύ μεγάλων γενετικών αποστάσεων που τους χωρίζουν και των αντίστοιχα μεγάλων χρόνων απομόνωσης. Οι γενετικές αποστάσεις με βάση το μιτοχονδριακό DNA δεν θεωρούνται ασφαλές κριτήριο για τον προσδιορισμό διαφορετικών ειδών. Χρειάζονται συνεπώς και άλλοι γενετικοί δείκτες, μορφολογικές μελέτες αλλά πιθανώς και πειραματικές διασταυρώσεις πριν καταλήξει κανείς να προσδιορίσει συγκεκριμένες φυλογενετικές ομάδες ως διαφορετικά είδη. Από την άποψη της γενετικής της διατήρησης (conservation genetics), οι κύριοι φυλογενετικοί κλάδοι του *M. kotschy* ασφαλώς και συνιστούν εξελικτικά σημαντικές μονάδες (evolutionary significant units), κάποιες από τις οποίες πιθανώς χρειάζονται προστασία για τη διατήρησή τους, λόγω των μικρών και γεωγραφικά εντοπισμένων πληθυσμών τους (π.χ πληθυσμοί Κρήτης και δορυφορικών νησίδων). Στα πλαίσια αυτά πρέπει να ελεγχθεί κατά πόσο μια μελλοντική περαιτέρω εξάπλωση του σαμιαμιδιού *Tarentola mauritanica* στον Ελλαδικό χώρο (του οποίου η παρουσία στην Ελλάδα είναι αποτέλεσμα

ανθρωπόχωρης μεταφοράς) ενδέχεται να επιδράσει αρνητικά ή και να οδηγήσει σε εξαφάνιση κάποιους από τους πληθυσμούς του *M. kotschyi*, μέσω ανταγωνισμού ή θήρευσης.

ABSTRACT

Study of the phylogeography of *Mediodactylus kotschy* (Sauria: Gekkonidae) in the Aegean archipelago and the adjacent mainland

The Aegean archipelago is an area with complicated and turbulent geological history, great biodiversity, where intense evolutionary processes have taken place, but which had little attracted the scientific interest of the evolutionary biologists.

The aim of the present study was to elucidate the phylogeographical patterns of the gecko *Mediodactylus kotschy* and to interrelate them with the paleogeographic history of the area. *M. kotschy* was considered as an ideal model organism for such a study because of its wide distribution on the Aegean islands and the adjacent mainland and its great morphological differentiation with at least 25 different described subspecies.

In order to study the phylogeography of the species, I sequenced a part of the first subunit of the cytochrome oxidase mitochondrial gene, from 105 individuals, representing 43 different populations. The results showed that populations of *M. kotschy* exhibit a great genetic differentiation and are separated with very big genetic distances, which in some cases exceed 30%. Different methods of phylogenetic analysis point to one topology, which consists of 10 main monophyletic clades supported by high bootstrap values (>90%), and are clearly structured in a geographical scale. These clades are the following:

1) “Crete and satellite islets”, 2) “Kasos-Karpathos complex”: includes the haplotypes from Kasos, Karpathos, Prasonisi (which form a monophyletic group) and the islets of Sofrano, Tria Nisia and Astakida (monophyletic group), 3) “Central and south Cyclades complex”, 4) “Continental Greece complex”: includes the haplotypes from Peloponnese, Aigina and Tinos (“Peloponnese clade”), North Greece and Sporades (“N. Greece clade”), Kythira and Antikythira clade, 5) “N. Dodecanese clade”, 6) “Gavdos-Kastelorizo-Akschehir clade”, 7) “Cyprus clade”, 8) “Adana clade”, 9) “Israel clade”, 10) “Silifke clade”.

The geographic distribution of the main clades of the gene tree, correspond to previously recognized biogeographical regions of a wide spectrum of organisms. These regions, with the present knowledge of the paleogeographical history, have been separated by sea barriers following the breaking of the unite land of “Aegeais”, which

once occupied the area of the present Aegean archipelago. The sequence of these separations fits well with the separations of the populations according to the gene tree of *M. kotschyi*. This fact clearly indicates that the differentiation of the species' populations is due to vicarianism. However, some phylogeographic patterns (such as the connection of Gavdos haplotypes with those of Asia Minor) can be attributed to dispersal events.

If we focus on the intrapopulation divergence, there is a positive correlation with the island size. Smaller islands have zero polymorphism, while for the larger ones (like Cyprus and Peloponnese) genetic divergence reaches up to 10%. By combining molecular data with a general knowledge of the present demographic structure of the populations, we can hypothesize that in the bigger islands and the continental areas, *M. kotschyi* has a demographic pattern of isolated demes with low genetic flow, that permits different old separated genalogical mitochondrial lineages to persist in the present day populations. On the contrary, in the small islands, zero polymorphism is due to genetic drift.

Although the calibration of a molecular clock is a difficult and controversial subject, in this case, not only showed good agreement between molecular and paleogeographical data, but also permitted to check two different scenarios for the paleogeographical events that caused the separation of the *M. kotschyi* populations.

The first scenario assumes that the divergence of the populations of the species started about 10 Mya, when "Aegeais" started to break apart, while the second assumes that this happened at 5,3 Mya when the Messinian salinity crisis ended. Finally, I concluded that molecular data fit better with the sequence of paleogeographical events that followed the separation of Crete from "Aegeais" 10 Mya. Based on this assumption, the separations of the main clades of the tree (which form a basal polytomy in the consensus tree) are placed between 10 to 6 Mya, while the separation of the mass of Central-South Cyclades from mainland Greece and the isolation of Peloponnese from N. Greece and Kythira-Antikythira are placed 5 to 3 mya (during the lower-middle Pleiocene. The separation of Karpathos from Rhodes must have happened at the end of Pleiocene – beginning of Pleistocene.

The comparison with the molecular data from other organisms distributed in the same region (the genus of land snails *Albinaria*, the *Podarcis erhardii* complex and the *Rana ridibunda* complex) and have similar patterns of vicarian differentiation, showed that correspondent phylogeographic separations are not always due to the same paleogeographic event. The genus *Albinaria* has as similar history of differentiation in

the Aegean with that of *M. kotschyi*, where the breaking of “Aegeais” during the upper Miocene caused the major phylogeographic separations. For the frogs of the genus *Rana* and the *Podarcis erhardii* complex, their differentiation in the Aegean seems to have been initiated after the end of the Messinian salinity crisis.

The correspondence of the gene tree clades with the morphological subspecies of *M. kotschyi* is generally good, although in some cases there are subspecies which do not have monophyletic origin. The inclusion of the subspecies into groups of subspecies by Beutler (1981) seems to be phylogenetically more robust. In any case, a revision of the taxonomic status of the present subspecies based on the molecular findings of this study is absolutely necessary. Relevant to the taxonomic problems is the question whether some populations of *M. kotschyi* can be assigned a full species status, because of the extremely large genetic distances and the consequent long times that separate them. Genetic distances based on mitochondrial DNA are not a safe criterion for determine different species. So, other genetic markers, morphological studies or even experimental crosses are needed before someone decides to determine different phylogenetic groups as species. From the point of view of conservation genetics, the main phylogenetic clades can be obviously treated as Evolutionary Significant Units (ESUs). Some of these ESUs could be threatened and in need for conservation because of their small population size and their geographically restricted populations (e.g populations of Crete and satellite islets). Under a conservational frame, it has to be checked whether a further expansion of the gecko *Tarentola mauritanica* in the Aegean (which seems that has been imported to Greece by humans) may affect in the near future the survival of the populations of *M. kotschyi* through competition or predation.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akashi H. 1995.** Inferring weak selection from patterns of polymorphism and divergence at "silent" sites in *Drosophila* DNA. *Genetics* **139**: 1067-1076.
- Anastasakis GC, and Dermitzakis M. 1990.** Post-Middle-Miocene paleogeographic evolution of the Central Aegean Sea and detailed Quaternary reconstruction of the region. Its possible influence on the distribution of the Quaternary mammals of the Cyclades Islands. *N. Jb. Geol. Palaeont. Mh.* **1990, H. 1**: 1-16.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, and Young IG. 1981.** Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-465.
- Avery RA. 1982.** Field studies of body temperatures and thermoregulation. In: Gans C and Pough FH, eds. *Biology of Reptilia*. Academic Press ed. London, New York. 93-166.
- Avise JC. 1996.** Toward a regional conservation genetics perspective: Phylogeography of faunas in the southeastern United States. In: J.C. A and Hamrick JL, eds. *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. New York: Chapman & Hall. 431-470.
- Avise JC. 2000.** *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, London, England.
- Avise JC, Arnold RM, Ball RM, Bermingham JE, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, and Saunders NC. 1987.** Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 489-522.
- Avise JC, and Ball RM. 1990.** Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surv. Evol. Biol.* **7**: 45-67.
- Avise JC, Giblin-Davidson C, Laerm J, Patton JC, and Lansman RA. 1979.** Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 6694-6698.
- Avise JC, and Walker D. 1998.** Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and speciation process. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci* **265**: 457-463.
- Bahl A, and Pfenninger M. 1996.** A rapid method of DNA isolation using laundry detergent. *Nucleic Acids Res* **24**: 1587-8.
- Baran I, and Gruber U. 1981.** Taxonomische Untersuchungen an türkischen Inselformen von *Cyrtodactylus kotschy* (Steindachner 1870). Teil I: Die Populationen der nordlichen Agais, des Marmarameeres und der Schwarzen Meeres. *Spixiana* **4**: 255-270.
- Baran I, and Gruber U. 1982.** Taxonomische Untersuchungen an türkischen Gekkoniden. *Spixiana* **5**: 109-138.
- Βαρδινογιάννη Κ. 1994.** Βιογεωγραφία των χερσαίων μαλακίων στο νότιο νησιωτικό αιγαιακό τόξο. *Διδακτορική διατριβή*. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών.

- Beard JH, Sangree JB, and Smith LA. 1982.** Quaternary Chronology, Paleoclimate, Depositional Sequences and Eustatic Cycles. *Am. Ass. Petrol. Geol.* **66**: 158-169.
- Beerli P, Hotz H, Tunner HG, Heppich S, and Uzzell T. 1994.** Two new water frog species from the Aegean islands Crete and Karpathos (Amphibia, Salientia, Ranidae). *Notulae Naturae* **470**: 1-9.
- Beerli P, Hotz H, and Uzzell T. 1996.** Geologically dated sea barriers calibrate a protein clock for Aegean water frogs. *Evolution* **50**: 1676-1687.
- Beutler A. 1981.** *Cyrtodactylus kotschy* (Steindachner 1870) - Agaischer Bogenfingergecko. In: Boehme W, ed. *Handbook der Reptilien und Amphibien Europas*. Wiesbaden: Akademische Verlagsgesellschaft. 53-74.
- Beutler A, and Gruber U. 1977.** Intraspezifische Untersuchungen an *Cyrtodactylus kotschy* (Steindachner, 1870); Reptilia: Gekkonidae. *Spixiana* **1**: 165-202.
- Boettger O. 1888.** Verzeichnis der von Herrn E. von Oertzen aus Griechenland und aus Klein-asien mitgebrachten Batrachier und Reptilien. *Sber. Akad. Wiss. Berlin* **5**: 139-186.
- Boger H, and Dermitzakis MD. 1985.** Neogene Paleogeography in the Central Aegean region. VIIIth International Neogene Congress. Budapest.
- Briggs JC. 1974.** *Marine Zoogeography*. McGraw-Hill, New York.
- Britten RJ. 1986.** Rates of DNA Sequence Evolution Differ Between Taxonomic Groups. *Science* **231**: 1393-1398.
- Bromham L, Penny D, Rambaut A, and Hendy MD. 2000.** The Power of Relative Rates Tests Depends on the Data. *J. Mol. Evol.* **50**: 296-301.
- Brown RP, and Pestano J. 1998.** Phylogeography of skinks (*Chalcides*) in the Canary Islands inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* **7**: 1183-1191.
- Brown WM. 1985.** The mitochondrial genome of animals. In: MacIntyre RJ, ed. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Plenum Press. 95-130.
- Butzer KW. 1971.** *Environment and Archaeology*, Chicago.
- Carranza S, Arnold EN, Mateo JA, and Lopez-Jurado LF. 2000.** Long-distance colonization and radiation in gekkonid lizards, *Tarentola* (Reptilia:Gekkonidae), revealed by mitochondrial DNA sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B* **267**: 637-649.
- Castilla AM, Fernandez-Pedrosa V, Harris DJ, Gonzalez A, Latorre A, and Moya A. 1998.** Mitochondrial DNA Divergence Suggests that *Podarcis hispanica atrata* (Squamata: Lacertidae) from the Columbretes Islands Merits Specific Distinction. *Copeia* **4**: 1037-1040.
- Clary DO, and Wolstenholme DR. 1985.** The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J. Mol. Evol.* **22**: 252-271.
- Clayton DA. 1982.** Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* **28**: 693-705.
- Clayton DA. 1984.** Replication and transcription of the vertebrate mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 573-594.
- Cracraft J. 1983.** Species concepts and speciation analysis. *Curr. Ornithol.* **1**: 159-187.
- Cracraft J. 1987.** Species concepts and the ontology of evolution. *Biol. Philos.* **2**: 63-80.

- Cracraft J. 1989.** Speciation and its ontology: The empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. In: Otte D and Endler J, eds. *Speciation and its consequences*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Czelusniak J, Goodman M, Hewett-emmett D, Weiss ML, Venta PJ, and Tashian RE. 1982.** Phylogenetic origins and adaptive evolution of avian and mammalian haemoglobin genes. *Nature* **298**: 297-300.
- Daams R, and Van de Weerd A. 1980.** Early Pliocene Small Mammals from the Aegean Island of Karpathos (Greece) and their Paleogeographical Significance. *Geologie en Minjbouw* **59**: 327-331.
- Dayhoff MO. 1972.** *Atlas of protein sequence and structure*. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, MD.
- Δερμιτζάκης ΜΔ. 1989.** Ο αποικισμός των νησιών του Αιγαίου σε σχέση με την παλαιογεωγραφική του εξέλιξη. *Biologia Gallo-hellenica* **14**: 99-121.
- Δερμιτζάκης ΜΔ. 1990.** Ο αποικισμός των νησιών του Αιγαίου σε σχέση με την παλαιογεωγραφική του εξέλιξη. *Biologia Gallo-Hellenica* **17**: 99-130.
- Δερμιτζάκης ΜΔ, και Παπανικολάου ΔΙ. 1981.** Παλαιογεωγραφία και γεωδυναμική της περιοχής του Αιγαίου κατά το Νεογενές. *Annales Geologiques Des Pays Helleniques* **IV**: 245-289.
- Dermitzakis MD. 1987.** General introduction to the geology of Crete *Institute of Paleontology*: University of Vienna.
- DeSalle R, Freedman T, Prager EM, and A.C. W. 1987.** Tempo and Mode of Sequence Evolution in Mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* **26**: 157-164.
- DeSalle RR, and Templeton AR. 1988.** Founder effects and the rate of mitochondrial DNA evolution in Hawaiian *Drosophila*. *Evolution* **42**: 1076-1084.
- Δουρής Β. 1997.** Μοριακή ανάλυση του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) του γένους *Albinaria* (Mollusca). Συμβολή στη μελέτη της μοριακής εξέλιξης και της φυλογεωγραφίας του γένους στον Ελληνικό χώρο. *Διδακτορική διατριβή*. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Douris V, Cameron RAD, Rodakis GC, and Lecanidou R. 1998.** Mitochondrial phylogeography of the land snail *Albinaria* in Crete: long-term geological and short-term vicariance effects. *Evolution* **52**: 116-125.
- Douris V, Rodakis GC, Giokas S, Mylonas M, and Lecanidou R. 1995.** Mitochondrial DNA and morphological differentiation of *Albinaria* populations (Gastropoda: Clausiliidae). *J. Moll. Stud.* **61**: 65-78.
- Ehrlich PR, and Wilson EO. 1991.** Biodiversity studies: Science and policy. *Science* **253**: 758-761.
- Emerson BC, Oromi P, and G.M. H. 1999.** MtDNA Phylogeography and Recent Intra-island Diversification among Canary Island *Calathus* Beetles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **13**: 149-158.
- Fairbanks RG. 1989.** A 17,000-year glacio-eustatic sea level record: influence of glacial melting rates on the Younger Dryas event and deep-ocean circulation. *Nature* **342**: 637-642.

- Felsenstein J. 1978.** Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.* **27**: 401-410.
- Felsenstein J. 1981.** Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**: 368-376.
- Felsenstein J. 1984.** PHYLIP: Phylogeny inference package. 2.51 ed. Seattle, WA: University of Washington.
- Felsenstein J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Felsenstein J. 1988.** Phylogenies from molecular sequences: Inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 521-565.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, and Vrijenhoek R. 1994.** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**: 294-299.
- Frankenberg E. 1978.** Calls of male and female tree geckos, *Cyrtodactylus kotschyi*. *Israel Journal of Zoology* **27**: 53-56.
- Gleason JM, Caccone A, Moriyama EN, White KP, and Powell JR. 1997.** Mitochondrial DNA phylogenies for the *Drosophila obscura* group. *Evolution* **51**: 433-440.
- Goodman M. 1981.** Globin evolution was apparently very rapid in early vertebrates: A reasonable case against the rate constancy hypothesis. *J. Mol. Evol.* **17**: 114-120.
- Graur D, and Li W-H. 2000.** *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Gruber U, and Fuchs D. 1977.** Die Herpetofauna des Paros-Archipels (Zentral-Agais). *Salamandra* **13**: 60-77.
- Gu X, and Li WH. 1992.** Higher rates of amino acid substitution in rodents than in humans. *Mol. Phyl. Evol.* **1**: 211-214.
- Gu X, and Zhang J. 1997.** A simple method for estimating the parameter of substitution rate variation among sites. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 1106-1113.
- Gubitz T, Thorpe RS, and Malhotra A. 2000.** Phylogeography and natural selection in the Tenerife gecko *Tarentola delalandii*: testing historical and adaptive hypotheses. *Molecular Ecology* **9**: 1213-1221.
- Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A, and Wilson AC. 1991.** Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* **352**: 255-257.
- Hadjisterkotis E, Masala B, and Reese DS. 2000.** The origin and extinction of the large endemic Pleistocene mammals of Cyprus. *Biogeographia* **XXI**: 593-606.
- Haq BU, Hardenbol J, and Vail PR. 1987.** Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. *Science* **235**: 1156-1167
- Harris DJ, Arnold EN, and Thomas RH. 1998.** Relationships of lacertid lizards (Reptilia: Lacertidae) estimated from mitochondrial DNA sequences and morphology. *Proc. R. Soc. Lond. B* **265**: 1939-1948.
- Harris DJ, Arnold EN, and Thomas RH. 1999.** A phylogeny of the European lizard genus *Algyroides* (Reptilia:Lacertidae) based on DNA sequences, with comments

- on the evolution of the group. *J. Zool. (London)* **249**: 49-60.
- Harrison RG. 1989.** Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *TREE* **4**: 6-11.
- Hasegawa M, Kishino H, and Saitou N. 1991.** On the maximum likelihood method in molecular phylogenetics. *J. Mol. Evol.* **32**: 443-445.
- Hasegawa M, Kishino H, and Yano T. 1987.** Man's place in Hominoidea as inferred from molecular clocks of DNA. *J. Mol. Evol.* **26**: 132-147.
- Hasegawa M, Kishino H, and Yano T-A. 1985.** Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **22**: 160-174.
- Hendy MD, and Penny D. 1982.** Branch and bound algorithms to determine minimum evolutionary trees. *Math. Biosci.* **59**: 277-290.
- Hendy MD, and Penny D. 1989.** A framework for the quantitative study of evolutionary trees. *Math. Biosci.* **59**: 277-290.
- Hillis DM, Moritz C, and Mable BKe. 1996.** *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts USA.
- Hsu KJ. 1972.** When the Mediterranean dried up. *Scientific American* **1972**: 27-36.
- Hsu KJ, Montadert L, Bernoulli D, Cita MB, Erickson A, Garrison RE, Kidd RB, Melieres F, Muller C, and Wright R. 1977.** History of the Mediterranean salinity crisis. *Nature* **267**: 399-403.
- Hudson RR. 1990.** Gene genealogies and the coalescent process. In: Futuyma D.J., ed. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*: Oxford University Press.
- Janecek LL, Honeycutt RL, Adkins RM, and Davis SK. 1996.** Mitochondrial gene sequences and the molecular systematics of the artiodactyl subfamily Bovinae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **6**: 107-119.
- Joger U. 1984.** Die Radiation der Gattung Tarentola in Macaronesien. *Cour. Forsch. Inst. Senckenberg* **1**: 91-111.
- Juan C, Oromi P, and Hewitt GM. 1995.** Mitochondrial DNA phylogeny and sequential colonization of Canary Islands by darkling beetles of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae). *Proc. R. Soc. Lond. B* **261**: 173-180.
- Juan C, Oromi P, and Hewitt GM. 1996.** Phylogeny of the genus *Hegeter* (Tenebrionidae, Coleoptera) and its colonization of the Canary Islands deduced from Cytochrome Oxidase I mitochondrial DNA sequences. *Heredity* **76**: 392-403.
- Jukes TH, and Cantor CR. 1969.** Evolution of protein molecules. In: Munro HN, ed. *Mammalian protein metabolism*. New York: Academic. 21-132.
- Karaman MS. 1965.** Eine neue Unterart der Eidechse *Gymnodactylus kotschyi* aus Mazedonien, *Gymnodactylus kotschyi skopjensis* n.ssp. *Zool. Anz.* **174**: 348-351.
- Κασαπίδης Π. 1996.** Μελέτη της φυλογεωγραφίας του *Cyrtopodion kotschyi* (Sauria:Gekkonidae) στο χώρο του Νότιου Αιγαίου, με ανάλυση μιτοχονδριακού DNA. *Μεταπτυχιακή διατριβή*. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Kimura M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.

- Kocher TD, and Wilson AC. 1991.** Sequence evolution of mitochondrial DNA in human and chimpanzees: Control region and a protein-coding region. In: Osawa S and Honjo T, eds. *Evolution of life*. New York: Springer-Verlag. 391-413.
- Kohne DE. 1970.** Evolution of higher organism DNA. *Q. Rev. Biophys.* **33**: 327-375.
- Krijgsman W, Hilgen FJ, Raffi I, Sierro FJ, and Wilson DS. 1999.** Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature* **400**: 652-655.
- Kroon AM, W.M. DV, and Bakker H. 1978.** The heterogeneity of rat-liver mitochondrial DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **519**: 269-73.
- Kumar S, and Hedges SB. 1998.** A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature* **392**: 917-920.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, and Nei M. 2001.** MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* (submitted).
- Kumazawa Y, and Nishida M. 1999.** Complete mitochondrial DNA sequences of the green turtle and blue-tailed mole skink: statistical evidence for Archosaurian affinity of turtles. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 784-792.
- Kurten B. 1972.** *The Ice Age*. G. P. Putnam's Sons, New York.
- Kuss SE. 1975.** Die pleistozanen Hirsche der ostmediterranen Inseln Kreta, Kasos, Karpathos, und Rhodos (Griechenland). *Ber. Naturf. Ges. Freiburg i.Br.* **65**: 25-79.
- La Roche J, Snyder M, Cook DI, Fuller K, and Zouros E. 1990.** Molecular characterization of a repeat element causing large-scale size variation in the mitochondrial DNA of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Mol. Biol. Evol.* **7**: 45-64.
- Ladoukakis ED, and Zouros E. 2001.** Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* **18**: in press.
- Laird CD, McConaughy BL, and McCarthy BJ. 1969.** Rate of fixation of nucleotide substitution in evolution. *Nature* **224**: 149-154.
- Lee CE. 2000.** Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate "populations". *Evolution* **54**: 2014-2027.
- Li P, and Bousquet J. 1992.** Relative rate test for nucleotide substitutions between two lineages. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 1185-1189.
- Li WH. 1993.** So, what about the molecular clock hypothesis? *Curr Opin Genet Dev* **3**: 896-901.
- Macey JR, Ananjeva NB, Wang Y, and Papenfuss TJ. 2000.** Phylogenetic Relationships Among Asian Gekkonid Lizards Formerly of the Genus *Cyrtodactylus* Based on Cladistic Analyses of Allozymic Data: Monophyly of *Cyrtopodion* and *Mediodactylus*. *Journal of Herpetology* **34**: 258-265.
- Maddison W. 1989.** Reconstructing character evolution on polytomous cladograms. *Cladistics* **5**: 365-377.
- Margulis L. 1970.** *Origin of eucaryotic cells*. Yale University Press, New Haven, CT.
- Martin AP, and Palumbi SR. 1993.** Body size, metabolic rate, generation time, and the

- molecular clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4087-91.
- Meyer A. 1993.** Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Hochachka PW and Mommsen TP, eds. *The Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*: Elsevier Press. 2-54
- Mindell DP, and Thacker CE. 1996.** Rates of Molecular Evolution: Phylogenetic Issues and Applications. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **27**: 279-303.
- Μίζη Α. 1999.** Εξελικτική ανάλυση του γένους *Podarcis* (Sauria: Lacertidae) βασισμένη σε αλληλουχίες μιτοχονδριακού DNA. *Διπλωματική εργασία*. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Montoya J, Christianson T, Levens D, Rabinowitz M, and Attardi G. 1982.** Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 7195-9.
- Montoya J, Gaines GL, and Attardi G. 1983.** The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* **34**: 151-9.
- Moritz C, Dowling T.E., and Brown WM. 1987.** Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 269-292.
- Moritz CC. 1994.** Defining "evolutionary significant units" for conservation. *TREE* **9**: 373-375.
- Moritz CC. 1995.** Uses of molecular phylogenies for conservation. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lon. B* **349**: 113-118.
- Muller L. 1939.** Über die von den Herren Dr. v. Jordans und Dr. Wolf im Jahre 1938 in Bulgarien gesammelten Amphibien und Reptilien. *Mitt. Konigl. Nat. Inst. Sofia* **13**: 1-17.
- Muse SV, and Weir BS. 1992.** Testing for equality of evolutionary rates. *Genetics* **132**: 269-276.
- Myers AA, and Giller PS. 1988.** *Analytical Biogeography*. Chapman & Hall, London.
- Μυλωνάς ΜΑ. 1982.** Μελέτη πάνω στη ζωογεωγραφία και οικολογία των χερσαίων μαλακίων των Κυκλάδων. *Διδακτορική διατριβή*. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Nei M. 1996.** Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 371-403.
- Nei M, and Kumar S. 2000.** *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nei M, Kumar S, and Takahashi K. 1998.** The optimization principle in phylogenetic analysis tends to give incorrect topologies when the number of nucleotides or amino acids used is small. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12390-12397.
- Nei M, and Takahata N. 1993.** Effective population size, genetic diversity, and coalescence time in subdivided populations. *J. Mol. Evol.* **37**: 240-244.
- Neigel JE, and Avise JC. 1986.** Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. In: Nevo E and Karlin S, eds. *Evolutionary Processes and Theory*. New York: Academic Press. 515-534.
- Nikolskij AM. 1902.** *Gymnodactylus danilewskii* STR. et *Gymnodactylus colchicus* n. sp. *Ej. Zool. Mus. Imp. Nauk.* **7**: 1-6.

- Nogales M, Lopez M, Jimenez-Asensio J, Larruga JM, Hernandez M, and Gonzalez P. 1998.** Evolution and biogeography of the genus *Tarentola* (Sauria: Gekkonidae) in the Canary Islands, inferred from mitochondrial DNA sequences. *J. Evol. Biol.* **11**: 481-494.
- Ochman H, and Wilson AC. 1987.** Evolution in bacteria: Evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J. Mol. Evol.* **26**: 74-86.
- Ohta T. 1973.** Slightly deleterious mutant substitutions in evolution. *Nature* **246**: 96-98.
- Ohta T. 1974.** Mutational pressure as the main cause of molecular evolution and polymorphisms. *Nature* **252**: 315-354.
- Ohta T. 1976.** Role of very slightly deleterious mutations in molecular evolution and polymorphism. *Theor. Pop. Biol.* **10**: 254-275.
- Ohta T. 1992.** The nearly neutral theory of molecular evolution. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **23**: 263-286.
- Osawa S, Muto A, Jukes TH, and Ohama T. 1990.** Evolutionary changes in the genetic code. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* **241**: 19-28.
- Otte D, and Endler JA eds. 1989.** *Speciation and its consequences*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Philippe H, Chenuil A, and Adoutte A. 1994.** Can the Cambrian explosion be inferred through molecular phylogeny? *Development Supplement*: 15-25.
- Pinto FM, Brehm A, Hernandez M, J.M. L, Gonzalez AM, and Cabrera VM. 1997.** Population genetic structure and colonization sequence of *Drosophila subobscura* in the Canaries and Madeira Atlantic Islands as inferred by autosomal, sex-linked and mtDNA traits. *Journal of Heredity* **88**: 108-114.
- Posada D, and Crandall KA. 1998.** Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817-818.
- Prichard AE, Seilhamer JJ, Mahalingam R, Sable CL, Venuti SE, and Cummings DJ. 1990.** Nucleotide sequence of the mitochondrial genome of *Paramecium*. *Nucl. Acids. Res.* **18**: 173-180.
- Radtkey RR. 1996.** Adaptive radiation of day-geckos (*Phelsuma*) in the Seychelles archipelago: a phylogenetic analysis. *Evolution* **50**: 604-623.
- Rand DM, and Kann LM. 1998.** Mutation and selection at silent and replacement sites in the evolution of animal mitochondrial DNA. *Genetica* **103**: 393-407.
- Rechinger KH. 1943.** Flora Aegaea. *Denkschr. Akad. Wiss. Wien, Math-Nat. Kl.* **105**.
- Rechinger KH. 1950.** Grundzuge der Pflanzenverbreitung in der Aegais I-III. *Vegetatio* **2**.
- Rees DJ, Emerson BC, Oromi P, and Hewitt GM. 2001.** Mitochondrial DNA, ecology and morphology: interpreting the phylogeography of the *Nesotes* (Coleoptera: Tenebrionidae) of Gran Canaria (Canary Islands). *Mol Ecol* **10**: 427-34.
- Riedel A. 1994.** A preliminary zoogeographic division of Asia Minor, based on the distribution of the Zonitid (s.l.) snails (Gastropoda, Terrestria). *Bios (Macedonia, Greece)* **2**: 171-176.
- Rieppel O. 1981.** *Tarentola mauritanica* (Linnaeus 1758) - Mauergecko. In: Boehme W, ed. *Handbook der Reptilien und Amphibien Europas*. Wiesbaden: Akademische

Verlagsgesellschaft. 119-133.

- Robinson M, Gouy M, Gautier C, and Mouchiroud D. 1998.** Sensitivity of the relative-rate test to taxonomic sampling. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 1091-1098.
- Rodriguez F, Oliver JL, Marin A, and J.R. M. 1990.** The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* **142**: 485-501.
- Ρόκας Α. 1997.** Μελέτη της ποικιλότητας στην αλληλουχία της πρώτης υπομονάδας της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) του mtDNA, σε πληθυσμούς *Cyrtopodion kotschy* (Steindachner, 1870)(Sauria: Gekkonidae) της Μήλου και των γειτονικών νησιών. *Διπλωματική εργασία*. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Rozas J, and Rozas R. 1999.** DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* **15**: 174-175.
- Russo CAM, Takezaki N, and Nei M. 1996.** Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 525-536.
- Ryder OA. 1986.** Species conservation and the dilemma of subspecies. *TREE* **1**: 9-10.
- Rykena S. 1996.** Experimental interspecific hybridization in the genus *Lacerta*. *Israel Journal of Zoology* **42**: 171-184.
- Rzhetsky A, and Nei M. 1992.** A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 945-967.
- Rzhetsky A, and Nei M. 1993.** Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 1073-1095.
- Saccone C, De Giorgi C, Gissi C, Pesole G, and Reyes A. 1999.** Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* **238**: 195-209.
- Saitou N, and Nei M. 1987.** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY.
- Sequeira AS, Lanteri AA, Scatagliani MA, Confalonieri VA, and Farrell BD. 2000.** Are flightless *Galapaganus* weevils older than the Galapagos Islands they inhabit? *Heredity* **85**: 20-9.
- Σφενδουράκης Σ. 1994.** Βιογεωγραφία, συστηματική και στοιχεία οικολογίας των χερσαίων ισοπόδων στα νησιά του κεντρικού Αιγαίου. *Διδακτορική διατριβή*. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Shitara H, Hayashi JI, Takahama S, Kaneda H, and Yonekawa H. 1998.** Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. *Genetics* **148**: 851-7.
- Skibinski DO, Gallagher C, and Beynon CM. 1994.** Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* **368**: 817-8.
- Snyder M, Fraser AR, LaRoche J, Gartner-Kepkay KE, and Zouros E. 1987.** Atypical mitochondrial DNA from the deep-sea scallop *Placopecten*

magellanicus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7595-7599.

- Steindachner F. 1870.** Herpetologische Notizen (II); Reptilien gesammelt während einer Reise in Senegambien. *Sber. Akad. Wiss. Wien* **62**: 329.
- Steiniger FF, and Rogl F. 1984.** Paleogeography and palinspastic reconstruction of the Neogene of the Mediterranean and Paratethys. In: Dixon JE and Robertson AHF, eds. *The Geological evolution of the Eastern Mediterranean*: Blackwell Scientific Publications. 659-668.
- Stepanek O. 1934.** Poznamky k herpetologii Kreyt. Sur l'hepretologie de l'Ile de Crete. *Sbornik zoolog. odd. Nar. Musea v Praze* **I**: 7-10.
- Stepanek O. 1937.** Eine neue Unterart der Eidechse *Gymnodactylus kotschy* aus Bulgarien. *Mitt. Konigl. Nat. Inst. Sofia* **10**: 281-285.
- Stepanek O. 1937.** *Gymnodactylus kotschy* Steindachner und sein Rassenkreis. *Arch. Nat. Leipzig N.F.* **6**: 258-280.
- Stepanek O. 1939.** *Gymnodactylus kotschy kalypsae* n.subsp. *Vestnik cs. Zoologicke Spolecnosti v Praze* **VI-VII**: 431-435.
- Stepanek O. 1944.** Zur Herpetologie Griechenlands. *Vest. Ces. Spol. Zool.* **9**: 123-147.
- Strauch A. 1887.** Bemerkungen über die Geckoniden-Sammlung im Zoologischen Museum der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften zu St. Petersburg. *Mem. Ac. St. Petersburg* **35**: 1-74.
- Strid A. 1970.** Studies in the Aegean flora. XVI. Biosystematics of the *Nigella arvensis* complex with special reference to the problem of the non-adaptive radiation, Lund.
- Taanman J-W. 1999.** The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta* **1410**: 103-123.
- Tajima F. 1993.** Simple Methods for Testing the Molecular Evolutionary Clock Hypothesis. *Genetics* **135**: 599-607.
- Tajima F, and Takezaki N. 1994.** Estimation of evolutionary distance for reconstructing molecular phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **11**: 278-286.
- Takahashi K, and Nei M. 2000.** Efficiencies of fast algorithms of phylogenetic inference under the criteria of maximum parsimony, minimum evolution, and maximum likelihood when a large number of sequences are used. *Mol Biol Evol* **17**: 1251-8.
- Takahata N, and Nei M. 1985.** Gene genealogy and variance of interpopulational nucleotide differences. *Genetics* **110**: 325-44.
- Takezaki N, Rzhetsky A, and Nei M. 1995.** Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 823-833.
- Tamura K, and Nei M. 1993.** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 512-526.
- Tavare S. 1984.** Line-of-descent and genealogical processes, and their applications in population genetic models. *Theor. Pop. Biol.* **26**: 119-164.
- Thomaz D, Guillar A, and Clarke B. 1996.** Extreme divergence of mitochondrial DNA within species of pulmonate land snails. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* **263**: 363-368.

- Thorpe RS, Malhotra A, Black H, Daltry JC, and Wuster W. 1995.** Relating geographic pattern to phylogenetic process. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B* **349**: 61-68.
- Thorpe RS, McGregor DP, Cumming AM, and Jordan WC. 1994.** DNA evolution and colonization sequence of island lizards in relation to geological history: mtDNA RFLP, cytochrome b, cytochrome oxidase, 12S rRNA sequence, and nuclear RAPD analysis. *Evolution* **48**: 230-240.
- Tiedemann F, and Haupl M. 1980.** Eine neue Unterart von *Cyrtodactylus kotschy* von den griechischen Inseln Nisos Makri und Nisos Strongili (NW Rhodos). *Ann. Naturhist. Mus. Wien* **83**: 539-542.
- Tiedemann F, and Haupl M. 1982.** *Cyrtodactylus kotschy* (STEINDACHNER, 1870) in the Santorin archipelago. *Amphibia-Reptilia* **4**: 377-381.
- Turland NJ, Chilton L. & Press JR 1993.** Flora of the Cretan area: Annotated checklist and Atlas. The Nat. Hist. Mus. London
- Τριχάς Α. 1996.** Οικολογία και Βιογεωγραφία των εδαφικών κολεοπτέρων στο νότιο Αιγαίο με έμφαση στη Σύνθεση, Εποχιακή & Βιοτοπική διαφοροποίηση και Ζωογεωγραφία των οικογενειών Carabidae και Tenebrionidae. *Διδακτορική διατριβή*. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Uyenoyama MK. 1995.** A generalized least-squares estimate for the origin of sporophytic self-incompatibility. *Genetics* **139**: 975-992.
- Valakos E, and Vlachopoulos A. 1989.** Note on the ecology of *Cyrtodactylus kotschy* (Reptilia - Gekkonidae) in an insular ecosystem of the Aegean. *Biologia Gallo-hellenica* **15**: 179-184.
- Valakos ED. 1989.** Thermal ecology of *Cyrtodactylus kotschy* (Steindachner, 1870) (Sauria: Gekkonidae) in the insular ecosystems of the Aegean. *Herpetological Journal* **1**: 396-399.
- Valakos ED, and Polymeni RM. 1990.** The food of *Cyrtodactylus kotschy* (Steindachner, 1870) (Sauria-Gekkonidae) during the wet season in the mediterranean insular ecosystems of the Aegean. *Herpetological Journal* **?**: 474-477.
- Wakeley J. 1993.** Substitution rate variation among sites in hypervariable region I of human mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **37**: 613-623.
- Wakeley J. 1994.** Substitution rate variation among sites and estimation of transition bias. *Mol. Bio. Evol.* **11**: 436-442.
- Waller TR. 1990.** The evolution of ligament systems in the Bivalvia. In: Morton B, ed. *The Bivalvia-Proceedings of a memorial symposium in honour of Sir Charles Maurice Yonge, Edinburgh*. Hong Kong Univ. Press ed. Hong Kong. 49-71.
- Walsh HE, Kidd MG, Moum T, and Friesen VL. 1999.** Polytomies and the power of phylogenetic inference. *Evolution* **53**: 932-937.
- Waples RS. 1991.** Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp. & the definition of 'species' under the Endangered Species Act. *Marine Fisheries Review* **53**: 11-22.
- Warrior R, and Gall G. 1985.** The mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* and *Hydra littoralis* consists of two linear molecules. *Arch. Sc. Geneve* **3**: 439-445.
- Werner F. 1937.** Beitrage zur Kenntnis der Tierwelt des Peloponnes, der Insel Kythira

und Euboa, sowie der kleinen Inseln im saronischen Golf. *Sber. Akad. Wiss. Wien, Math. Nat. Kl. Abt. I* **146**: 135-153.

- Werner Y. 1966.** *Cyrtodactylus kotschy orientalis* in Israel. *Lacerta* **24**: 94-96.
- Wettstein O. 1937.** Vierzehn neue Reptilien-Rassen von der agaischen Inseln. *Zool. Anz.* **118**: 79-90.
- Wettstein O. 1953.** *Herpetologia aegaea*. Springer-Verlag, Wien.
- Wilcox TP, Hugg L, Zeh JA, and Zeh DW. 1997.** Mitochondrial DNA Sequencing Reveals Extreme Genetic Differentiation in a Cryptic Species Complex of Neotropical Pseudoscorpions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **7**: 208-216.
- Wilson AC, Cann RL, Carr SM, George M, Gyllensten UB, Helm-Bychowski KM, Higuchi RG, Palumbi SR, Prager EM, Sage RD, and Stoneking M. 1985.** Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* **26**: 375-400.
- Wilson AC, Ochman H, and Prager EM. 1987.** Molecular time scale for evolution. *Trends Genet.* **3**: 241-247.
- Wu C-I, and Li W-H. 1985.** Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man. *Proc. Natl. Acad. Sci* **82**: 1741-1745.
- Χαλκιά Δ. 2000.** Μελέτη της Μορφολογικής και Γενετικής Ποικιλομορφίας του Είδους *Podarcis erhardii* (Sauria: Lacertidae) στη Δυτική Κρήτη. *Μεταπτυχιακή διατριβή*. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Yang D, Oyaizu Y, Oyaizu H, Olsen GJ, and Woese CR. 1985.** Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4443-4447.
- Yang Z, Goldman N, and Friday A. 1994.** Comparison of models for nucleotide substitution used in maximum likelihood phylogenetic estimation. *Mol. Biol. Evol.* **11**: 316-324.
- Yoder AD, Vilgalys R, and Ruvolo M. 1996.** Molecular evolutionary dynamics of cytochrome b in Strepsirrhine Primates: the phylogenetic significance of third-position transversions. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 1339-1350.
- Yoder AD, and Yang Z. 2000.** Estimation of primate speciation dates using local molecular clocks. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 1081-1090.
- Zohary M. 1973.** *Geobotanical Foundations of the Middle East*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Zouros E, Ball O, Saavedra C, and Freeman KR. 1994.** Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* **368**: 818.
- Zuckerlandl E, and Pauling L. 1965.** Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson V and Vogel HJ, eds. *Evolving Genes and Proteins*. New York: Academic Press.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. Εργαστηριακά Πρωτόκολλα

A. Πρωτόκολλα εξαγωγής DNA

A1. Εξαγωγή ολικού DNA (Sambrook et al., 1989)

Κόβεται 0,5 cm από την ουρά της σαύρας και ο ιστός λειοτριβείται με υγρό άζωτο. Αν ο ιστός είναι διατηρημένος σε αιθανόλη, τεμαχίζεται με τη βοήθεια λαβίδων και αφήνεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να εξατμιστεί η αιθανόλη. Σε ένα σωλήνα erppendorf των 2 ml προστίθενται μαζί με τον ιστό, 1ml ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής (extraction buffer) (0.1M EDTA, pH:8, 0.05M Tris, pH:8), 125μl SDS 10% και ακολουθεί επώαση στο υδατόλουτρο, στους 55⁰ για 30 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 10μl πρωτεϊνάσης k (10 mg/ml) και η επώαση συνεχίζεται στους 55⁰ για όλη τη νύχτα.

Ακολουθεί ο καθαρισμός του DNA με προσθήκη ίσου όγκου μίγματος φαινόλης- χλωροφορμίου- ισοαμυλικής αλκοόλης 50% - 48% - 2%. Γίνεται φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 10 λεπτά και λαμβάνεται η υδατική φάση που περιέχει το DNA. Επαναλαμβάνεται αυτό το στάδιο, αν χρειαστεί και κατόπιν απομακρύνονται τα ίχνη φαινόλης με προσθήκη ενός όγκου χλωροφόρμιο και φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως. Λαμβάνεται ξανά η υδατική φάση και στη συνέχεια γίνεται κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη 1/10 του συνολικού όγκου οξικού νατρίου (3M, pH:5.2) και ίσου όγκου ισοπροπανόλης. Το διάλυμα αφήνεται για μισή περίπου ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 10 λεπτά και απομάκρυνση της προπανόλης. Τέλος, γίνεται ξέπλυμα με αιθανόλη 70% για την απομάκρυνση των αλάτων και του SDS, ξήρανση στον αέρα και διάλυση σε 100-200 μl νερό ή TE. Καλύτερη επαναδιάλυση του DNA επιτυγχάνεται αν αφηθεί στους 37⁰ C για μερικές ώρες.

Ελέγχουμε την απόδοση της εξαγωγής του DNA χρησιμοποιώντας 2μl από το τελικό διάλυμα για ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγορόζης 0.8% σε διάλυμα TBE 1 X, που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο (0.5 μg/ml). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται για μία ώρα στα 120V.

Το διάλυμα του DNA, είναι κατόπιν κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

A2. Εξαγωγή ολικού DNA (από Bahl & Pfenninger, 1996 τροποποιημένο από A. Colombari)

Κόβεται 0,5 cm από την ουρά της σαύρας και ο ιστός λειοτριβείται με υγρό άζωτο. Αν ο ιστός είναι διατηρημένος σε αιθανόλη, τεμαχίζεται με τη βοήθεια λαβίδων και αφήνεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να εξατμιστεί η αιθανόλη. Σε ένα σωλήνα erpendorf των 1,5 ml προστίθενται μαζί με τον ιστό, 750 µl διάλυμα εξαγωγής (extraction buffer) (700 µl dH₂O και 50 µl Tide® υγρό για καθάρισμα ρούχων) και ακολουθεί επώαση στο υδατόλουτρο, στους 37° – 50° C για όλη τη νύχτα. Στη συνέχεια, προστίθενται 210 µl κορεσμένο διάλυμα NaCl, αναταράσσεται με μέτρια ταχύτητα σε συσκευή vortex για 10 λεπτά και φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 14.000 rpm για 30 λεπτά στους 4° C. Κατόπιν, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf των 2 ml, προστίθεται ένας όγκος χλωροφορμίου και φυγοκεντρείται ξανά για 15 λεπτά. Οι βρωμές που πιθανώς υπάρχουν στο διάλυμα σχηματίζουν μια λευκή μεσόφαση. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθεται ένας όγκος κρύας ισοπροπανόλης. Το διάλυμα αφήνεται στους –20° C για 1-3 ώρες για να κατακρημνιστεί το DNA, και μετά φυγοκεντρείται όπως προηγουμένως για 20 λεπτά. Απομακρύνεται η ισοπροπανόλη και προστίθεται 0,5 ml αιθανόλη 70% v/v. Φυγοκεντρείται για 10 λεπτά, απομακρύνεται η αιθανόλη και το κατακρημνισμένο DNA αφήνεται για ξήρανση στον αέρα και τέλος διαλύεται σε 100-200 µl νερό ή TE. Καλύτερη επαναδιάλυση του DNA επιτυγχάνεται αν αφηθεί στους 37° C για μερικές ώρες.

A3. Εξαγωγή ολικού DNA με Chelex

Παρασκευάζεται 10% w/v διάλυμα Chelex σε αποστειρωμένο dH₂O, και μοιράζεται σε σωλήνες erpendorf του 1,5 ml (100 µl ανά σωλήνα), οι οποίοι μπορούν να φυλαχτούν στους –20° C. Προστίθεται ένα μικρό κομμάτι ιστού (<1mm³) και 5 µl πρωτεΐνάση k (20 mg/µl). Οι σωλήνες τοποθετούνται στους 55° C, υπό συνεχή ανάδευση, για όλη τη νύχτα. Στη συνέχεια το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 14.000 rpm για 2 λεπτά και λαμβάνεται 1µl από το υπερκείμενο το οποίο χρησιμοποιείται για την

PCR. Σ' αυτή τη μορφή, το διάλυμα του DNA δεν μπορεί να διατηρηθεί για περισσότερο από ένα μήνα γι' αυτό πρέπει με μια φυγοκέντρηση, όπως προηγουμένως, να λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα του DNA χωρίς τα σφαιρίδια του Chelex και τα υπολείμματα του ιστού και να φυλάσσεται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Το διάλυμα αυτό μπορεί να καθαρισθεί επιπλέον με φαινόλη και χλωροφόρμιο.

Με νυστέρι, απομονώνεται από πήγμα αγαρόζης χαμηλής τήξεως το κομμάτι που περιέχει την επιθυμητό προϊόν DNA και μεταφέρεται σε σωλήνα eppendorf. Γίνεται προσπάθεια να παρθεί όσο το δυνατό μικρότερη ποσότητα αγαρόζης. Προστίθεται νερό μέχρι τα 500 μl και 1/10 του όγκου οξικό νάτριο 3M. Ο σωλήνας τοποθετείται στους 65°C για 10-15 λεπτά ώστε να λειώσει η αγαρόζη. Παράλληλα ζεσταίνεται στην ίδια θερμοκρασία φαινόλη. Προστίθεται ίσος όγκος ζεστής φαινόλης, αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται στις 14000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα και επαναλαμβάνεται η διαδικασία μία ή δύο φορές, αν χρειαστεί, με κρύα φαινόλη ώστε να απομακρυνθεί τελείως η αγαρόζη. Στη συνέχεια προστίθεται ένας όγκος χλωροφορμίου και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 5 λεπτά. Λαμβάνεται ξανά το υπερκείμενο και το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη 2-2,5 όγκων απόλυτης αιθανόλης (100%) και ψύξη στους -80°C για 30 λεπτά ή στους -20°C όλη τη νύχτα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 20 λεπτά. Σε αυτή τη φάση το DNA κατακάθεται με τη μορφή ιζήματος. Απομακρύνεται προσεκτικά η αιθανόλη και προστίθεται 1 ml αιθανόλης 70% και φυγοκεντρείται στις 14000 rpm για 10 λεπτά. Αφαιρείται η αιθανόλη, το DNA ξηραίνεται και επαναδιαλύεται στον επιθυμητό όγκο.

Γ. Πρωτόκολλο Sequencing με τη Thermo Sequenase της Amersham Pharmacia Biotech Inc.

Η DNA πολυμεράση Thermo Sequenase παρέχεται μαζί με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (20X) και ένα ρυθμιστικό διάλυμα για την αραιώση του ενζύμου. Τα ddNTPs ήταν της εταιρείας Roche (Cat.# O 775304) και τα dNTPs της εταιρείας Promega (Cat.# U1240). Τα μίγματα ddNTP/dNTPs έχουν συγκέντρωση ...

Για κάθε αντίδραση sequencing χρησιμοποιούνται οι παρακάτω ποσότητες αντιδραστηρίων (εκτός από τα τέσσερα μίγματα ddNTP/dNTPs)

	Αρχική συγκέντρωση	Για μία αντίδραση
Ρυθμιστικό διάλυμα 20X	20X	1,25 μl
Αραιωμένο ένζυμο	32 u / μl	1μl (3 u / μl)
dd H ₂ O	-	ως τον απαραίτητο όγκο
Σημασμένος Εκκινητής	2 pmol /μl	2 pmol
προϊόν PCR	~ 5-20 ng / μl	50-200 ng
συνολικός όγκος		17,5 μl

Αρχικά, σημαίνεται ο εκκινητής με [γ -³²]-ATP (end labeling). Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 2 pmol εκκινητή και η σήμανση γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο από το kit fmol DNA Cycle Sequencing System της Promega (Cat.# Q4100).

Παράλληλα, παρασκευάζεται ένα κοινό μίγμα για όλες τις αντιδράσεις (+10% επιπλέον ποσότητα για να επαρκέσει), το οποίο περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα, το αραιωμένο ένζυμο και dd H₂O. Το ένζυμο αραιώνεται στο ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα σε αναλογία 1:11 ώστε να έχει συγκέντρωση ~ 3 u / μl πριν την προσθήκη στο μίγμα. Για κάθε αντίδραση μαρκάρονται τέσσερα σωληνάκια PCR ως A, C, G και T, στα οποία προστίθεται 1 μl από το αντίστοιχο μίγμα ddNTP / dNTPs. Σε ένα χωριστό σωληνάκι, τοποθετείται για κάθε αντίδραση η απαραίτητη ποσότητα DNA και σημασμένου εκκινητή και στη συνέχεια η ανάλογη ποσότητα του αρχικού μίγματος ώστε ο τελικός όγκος να είναι 17,5 μl. Από το μίγμα αυτό προστίθενται 4 μl σε κάθε ένα από τα τέσσερα σωληνάκια της αντίδρασης. Στη συνέχεια γίνεται cycle sequencing σε συσκευή PCR. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται σε κάθε σωληνάκι 2 μl stop solution (10 mM NaOH, 95% formamide καθαρό, 0,05% bromophenol blue, 0,05% xylene cyanole).

Οι θερμοκρασίες σύνδεσης για την αντίδραση του cycle sequencing για κάθε εκκινητή και η διάρκεια των ηλεκτροφορήσεων του προϊόντος της αντίδρασης στο κατακόρυφο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Εκκινητές	Θερμοκρασία σύνδεσης (°C)	Διάρκεια ηλεκτροφόρησης (ώρες)
LCO1490	65	2,0 και 5,3
HCO2198	65	2,0 και 5,3
LCOI5973	50	1,7 και 5,0
HCOI6567	50	1,7 και 5,0
LCOI5982	60	1,7 και 5,0
HCOI6570	60	1,7 και 5,0

Οι αντιδράσεις του cycle sequencing πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 9600 και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακόλουθο:

Προεπώαση: 94⁰ C για 2 min

Τριάντα κύκλοι που περιλαμβάνουν τα ακόλουθα στάδια:

Αποδιάταξη (denaturation): 94⁰ C για 30 sec

Πρόσδεση (annealing): [βλ. προηγούμενο πίνακα] για 30 sec

Επιμήκυνση (extension): 72⁰ C για 30 sec

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ

	123	456	789	012	111	111	111	122	222	222	223	333	333	333	444	444	444	455	555	555	556	666	666	666	777	777	777	788	888	888	888	889	999	999	999			
	GCC	GAA	CTG	AGC	CAG	CCC	GGA	GCC	CTC	CTA	GGA	GAT	GAT	CAA	ATT	TAC	AAC	GTC	ATT	GTC	ACC	GCA	CAC	GCC	TTT	GTA	ATA	ATT	TTC	TTC	ATA	GTA	ATA	GTA	ATG			
Avgo_5																																						
Chrysi_5							T																															
Glaron_1												T																					T					
Petalid_2			A			A						C																										
Pontik_1					A		G	G				C																										
Psilor_4					A																																	
Psira_1					A																																	
NGreec1_7					A		A		A	A	C																											
NGreec2_1					A				A	A	C																											
Alon_1			G	A				G	A	A	C																											
Perist_1					A				G	A	A	C																										
Npelop1_1					G			G	G	A		G	C																									
Npelop2_2			T	G	T			T	G	G	A		G	C																								
Npelop3_1			T	G	A			T	G	G	A		G	C																								
Spelop_1			T						G	A			C																									
Aegina_1			T						G	A			C																									
Tinos1_4					G	A			G	A			C																									
Tinos2_1					G	A			G	A			C																									
Kythir1_1				A	T	A			A	A	C	G	C																									
Kythir2_1					A	T	A		A	A	C	G	C																									
AntiKr_5					A		A		G	A	A	C	G	C																								
Amorgos_1					T	G	G	A	T			C	C	G	C																							
Astyp1_1					T	G	A			G	A	T			C	C	G	C																				
Astyp2_2					T	G	A			G	A	T			C	C	G	C																				
Astyp3_1					T	G	A			G	A	T			C	C	G	C																				
Astyp4_1					T	G	A			G	A	T			C	C	G	C																				
Milos1_2					G	A				G	A	T			C	C	G	C																				
Milos2_1					G	A				G	A	T			G	C	C	G	C																			
Milos3_2					G	A				G	A	T			G	C	C	G	C																			
Milos4_1					G	A				G	A	T			G	C	C	G	C																			
Paros1_6					T	G	A			T	G	A	T			C	C	G	C																			
Serif1_2					T	G	A			T	G	A	T			C	C	G	C																			
Serif2_4					T	G	A			T	G	A	T			C	C	G	C																			
Astak1_1							C	T				C	G	G	G	G	G	C																				
Astak2_1							C	T				C	G	G	G	G	G	C																				
Sofrl_1							A			C	A	G			G	C	C	G	C																			
Sofr2_1							A			C	A	G			G	C	C	G	C																			
TR1_1							A			C	A	G			G	C	C	G	C																			
TR2_1							A			C	A	G			G	C	C	G	C																			
Karpat1_1							A			C	A	A			G	C	C	G	C																			
Karpat2_1						T	A			A	A				G	C	C	G	C																			
Karpat3_1						A				A	A				C	C	G	C																				
Kasos1_1						T	A				C	A	A			G	C	C	G	C																		
Kasos2_3						T	A				C	A	A			G	C	C	G	C																		
Kasos3_1						T	A				C	A	A			G	C	C	G	C																		
Prason1_1							A				C	A	A			G	C	C	G	C																		
Prason2_1							A				C	A	A			G	C	C	G	C																		
Fournoi_1							A	T			C	A	G	T	T																							
Marathi_1							A	T			C	A	G	T	T																							
Adana_1							A				C	A	A			G	C	C	G	C																		
Silifke_1							A				C	A	A			G	C	C	G	C																		
Israel_1							T				G	C	G			G	C	C	G	C																		
Cyprus1_1							G	C	T	A	G	C	G			C	G	C																				
Cyprus2_1							G	C	T	A	G	C	A			T	G	C	C																			
Cyprus3_1							G	C	T	A	G	C	A			T	G	C	C																			
Cyprus4_1							G	C	T	A	G	C	A			T	G	C	C																			
Gavdos1_1							A				A	C	A	A		C																						
Gavdos2_4							A				A	C	A	A		C																						
Gavdos3_1							A				A	C	A	A		C																						
A_giorg_1							G	T			T	A	A	T	G	C																						
Kastell_1							G	T			T	A	A	T	G	C																						
Akscheh_1							T				A	C	A	A	T																							
Cscab_5c							T	G	A	T																												
Hturc_ly1												C	T	T	T																							
TarTuN_2											G	T	T	G	T	T																						
TarCret_1											G	T	T	G	T	T																						
TarKef_2	A		G	A							G	T	T	C																								

	444	455	555	555	555	555	55
	999	900	000	000	001	111	11
	678	901	234	567	890	123	45
Avgo_5	GCT	GGC	ATC	ACT	ATA	CTT	TT
Chrysi_5	.C
Glaron_1	.C
Petalid_2	.C
Pontik_1	.C
Psilor_4	.C
Psira_1	.CG
NGreec1_7	.GTA	C.
NGreec2_1	.GTA	C.
Alon_1	.GTA	C.
Perist_1	.GTA	C.
Npelop1_1	.ATG	..A	C.
Npelop2_2	.A	..TG	..A	C.
Npelop3_1	.G	..TG	..A	C.
Spelop_1	.ATG	..G	C.
Aegina_1	.AG	..A	C.
Tinos1_4	.ATG	..G	C.
Tinos2_1	.ATG	..G	C.
Kythir1_1	.GTG	..A	C.
Kythir2_1	.GTG	..A	C.
AntiKr_5	.GTG	..A	..
Amorgos_1	.A	..T	..T	..AA	..
Astyp1_1	.A	..T	..TA	..
Astyp2_2	.A	..T	..TA	..
Astyp3_1	.A	..T	..TA	..
Astyp4_1	.A	..T	..TA	..
Milos1_2	.ATT	..A
Milos2_1	.ATT	..A
Milos3_2	.ATT	..A
Milos4_1	.A	..T	..TT	..A
Paros1_6	.A	..T	..TA	..
Serif1_2	.A	..T	..TA	C.
Serif2_4	.A	..T	..TA	C.
Astak1_1	.A	..T	..T	..CA	C.
Astak2_1	.A	..T	..T	..CA	C.
Sofri_1	.ACA	C.
Sofri2_1	.ACA	C.
TR1_1	.ACA	C.
TR2_1	.ACA	C.
Karpat1_1	.ACA	C.
Karpat2_1	.A	..ACA	C.
Karpat3_1	.ACA	C.
Kasos1_1	.ACA	C.
Kasos2_3	.ACA	C.
Kasos3_1	.ACA	C.
Prason1_1	.A	..ACA	C.
Prason2_1	.ACA	C.
Fournoi_1	.AT	..C	..G	..C	C.
Marathi_1	.AT	..C	..G	..C	C.
Adana_1	.GG	..A
Silifke_1	.AC	..G	..A	C.
Israel_1	.A	..T	..TA	C.
Cyprus1_1	.ACA	C.
Cyprus2_1	.ACA	C.
Cyprus3_1	.A	..T	..T	..C	..G	..A	C.
Cyprus4_1	.A	..T	..T	..C	..G	..A	C.
Gavdos1_1	.ATA	..
Gavdos2_4	.ATA	..
Gavdos3_1	.ATA	..
A_giorg_1	.A	..TA	C.
Kastell_1	.A	..TA	C.
Akscheh_1	.A	..T	..TG	..T	..G
Cscab_5c	.GT	..AA	C.
Hturc_ly1	.AA	..G	..C	..
TarTun_2	.A	..G	..T	..AA	C.
TarCreT_1	.A	..G	..T	..AA	C.
TarKef_2	.A	..AGA	..

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3. ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ ΘΕΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

	111111	1111	
	1113447	7889013333	3456
	1890595590	8026370157	9250
Avgo_5	AALLIIVVIS	AVSAAVCLSA	SNVA
Chrysi_5T
Glaron_1
Petalid_2
Pontik_1
Psilor_4
Psira_1
NGreec1_7A.
Ngreec2_1A.
Alon_1A.
Perist_1A.
Npelop1_1A.
Npelop2_2A.
Npelop3_1A.
Spelop_1A.
Aegina_1A.
Tinos1_4A.
Tinos2_1A.
Kythir1_1A.
Kythir2_1A.
AntiKr_5A.
Amorgos_1A.
Astyp1_1A.
Astyp2_2A.
Astyp3_1A.
Astyp4_1A.
Milos1_2A.
Milos2_1A.
Milos3_2A.
Milos4_1A.
Paros1_6A.
Serif1_2A.
Serif2_4A.
Astak1_1A.
Astak2_1A.
Sofr1_1I.....A.
Sofr2_1I.....A.
TR1_1I.....A.
TR2_1I.....A.
Karpat1_1A.
Karpat2_1A.
Karpat3_1A.
Kasos1_1A.
Kasos2_3A.
Kasos3_1A.
Prason1_1A.
Prason2_1A.
Fournoi_1V.....	.I.....A.
Marathi_1V.....	.I.....A.
Adana_1I.....A.
Silifke_1?.....A.
Israel_1I.....A.
Cyprus1_1I.....A.
Cyprus2_1I.....A.
Cyprus3_1I.....A.
Cyprus4_1I.....A.
Gavdos1_1A.
Gavdos2_4A.
Gavdos3_1A.
A_giorg_1A.
Kastell_1A.
Akscheh_1	?.....?.....A.
Cscab_5cV.....	S.A.....V.....
Hturc_ly1	.S...VI.L.	..A....I..
TarTun_2	.S.FTVA..A	..AGPIA... .SIS	
TarCret_1	.S.FTVA..A	..AGPIA... .SIS	
TarKef_2	T.F.TVAI.A	TIAGP.A... KG.S	

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4.3: Κάτω από τη διαγώνιο γενετικές αποστάσεις μόνο για τις μεταστροφές με βάση το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura. Πάνω από τη διαγώνιο το τυπικό σφάλμα (με πλάγια γραφή).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
1 Avgo_5		0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,003	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,015	0,014	0,015	0,014	0,015	0,015	0,014	0,014	0,014	0,015	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,015	0,015	0,014	0,014	0,014	0,014	
2 Chrysi_5	0,010		0,004	0,004	0,005	0,003	0,004	0,014	0,014	0,014	0,014	0,015	0,015	0,015	0,014	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,013	0,014	0,014	
3 Glaron_1	0,008	0,010		0,004	0,004	0,003	0,004	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,015	0,015	0,014	0,014	0,014	0,014	
4 Petalid_2	0,008	0,008	0,008		0,002	0,004	0,003	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,015	0,014	0,015	0,014	0,015	0,015	0,015	0,015	0,014	0,015	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,015	0,015	0,014	0,014	0,014	0,014	
5 Pontik_1	0,010	0,012	0,010	0,002		0,004	0,004	0,014	0,014	0,014	0,014	0,015	0,015	0,015	0,015	0,014	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,015	0,015	0,015	0,014	0,014	0,014	0,014	
6 Psilor_4	0,008	0,006	0,008	0,008	0,010		0,003	0,014	0,014	0,013	0,013	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	
7 Psira_1	0,006	0,008	0,006	0,006	0,008	0,006		0,014	0,014	0,013	0,013	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,013	0,014	0,014	0,014	
8 Ngreec1_7	0,087	0,089	0,082	0,087	0,089	0,082	0,080		0,000	0,003	0,003	0,008	0,008	0,007	0,008	0,007	0,008	0,008	0,007	0,008	0,007	0,007	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	
9 Ngreec2_1	0,087	0,089	0,082	0,087	0,089	0,082	0,080	0,000		0,003	0,003	0,008	0,008	0,007	0,008	0,007	0,008	0,008	0,007	0,008	0,007	0,007	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	
10 Alon_1	0,082	0,084	0,082	0,082	0,084	0,078	0,075	0,004	0,004		0,000	0,008	0,008	0,007	0,008	0,007	0,008	0,008	0,007	0,008	0,007	0,007	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	
11 Perist_1	0,082	0,085	0,082	0,082	0,085	0,078	0,075	0,004	0,004	0,000		0,008	0,008	0,007	0,008	0,007	0,008	0,008	0,007	0,008	0,007	0,007	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	
12 Npelop1_1	0,089	0,091	0,084	0,089	0,091	0,084	0,082	0,030	0,030	0,030	0,030		0,003	0,003	0,003	0,003	0,006	0,006	0,008	0,008	0,008	0,010	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	
13 Npelop2_2	0,091	0,094	0,087	0,091	0,094	0,087	0,084	0,028	0,028	0,028	0,028	0,006		0,002	0,003	0,003	0,005	0,005	0,008	0,008	0,008	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	
14 Npelop3_1	0,089	0,091	0,084	0,089	0,091	0,084	0,082	0,026	0,026	0,026	0,004	0,002		0,002	0,002	0,005	0,005	0,008	0,008	0,008	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	
15 Spelop_1	0,091	0,094	0,087	0,091	0,094	0,087	0,084	0,028	0,028	0,028	0,028	0,006	0,004	0,002		0,003	0,005	0,005	0,008	0,008	0,008	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	
16 Aegina_1	0,087	0,089	0,082	0,087	0,089	0,082	0,080	0,024	0,024	0,024	0,024	0,006	0,004	0,002	0,004		0,005	0,005	0,008	0,008	0,007	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	
17 Tinos1_4	0,094	0,096	0,089	0,094	0,096	0,089	0,087	0,034	0,034	0,034	0,034	0,016	0,014	0,012	0,014	0,014		0,000	0,009	0,009	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	
18 Tinos2_1	0,094	0,096	0,089	0,094	0,096	0,089	0,087	0,034	0,034	0,034	0,034	0,016	0,014	0,012	0,014	0,014	0,000		0,009	0,009	0,009	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	
19 Kythir1_1	0,087	0,094	0,087	0,091	0,094	0,087	0,084	0,024	0,024	0,024	0,034	0,032	0,030	0,032	0,028	0,043	0,043		0,000	0,003	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	
20 Kythir2_1	0,087	0,094	0,087	0,091	0,094	0,087	0,084	0,024	0,024	0,024	0,034	0,032	0,030	0,032	0,028	0,043	0,043	0,000		0,003	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	
21 AntiKr_5	0,089	0,096	0,089	0,089	0,091	0,089	0,087	0,022	0,022	0,022	0,032	0,030	0,028	0,030	0,026	0,040	0,040	0,006	0,006		0,009	0,008	0,008	0,008	0,008	0,009	0,008	0,008	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	
22 Amorgos_1	0,094	0,087	0,094	0,094	0,096	0,089	0,087	0,043	0,043	0,038	0,038	0,045	0,043	0,040	0,043	0,043	0,049	0,049	0,043	0,043	0,040		0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005	0,003	0,003	0,003	
23 Astyp1_1	0,082	0,080	0,087	0,087	0,089	0,082	0,080	0,040	0,040	0,036	0,036	0,043	0,040	0,038	0,040	0,040	0,051	0,051	0,036	0,036	0,034	0,010		0,000	0,000	0,000	0,003	0,004	0,004	0,003	0,004	0,003	0,003	
24 Astyp2_2	0,082	0,080	0,087	0,087	0,089	0,082	0,080	0,040	0,040	0,036	0,036	0,043	0,040	0,038	0,040	0,040	0,051	0,051	0,036	0,036	0,034	0,010	0,000		0,000	0,000	0,003	0,004	0,004	0,003	0,004	0,003	0,003	
25 Astyp3_1	0,082	0,080	0,087	0,087	0,089	0,082	0,080	0,040	0,040	0,036	0,036	0,043	0,040	0,038	0,040	0,040	0,051	0,051	0,036	0,036	0,034	0,010	0,000	0,000		0,000	0,003	0,004	0,004	0,003	0,004	0,003	0,003	
26 Astyp4_1	0,082	0,080	0,087	0,087	0,089	0,082	0,080	0,040	0,040	0,036	0,036	0,043	0,040	0,038	0,040	0,040	0,051	0,051	0,036	0,036	0,034	0,010	0,000	0,000	0,000		0,003	0,004	0,004	0,003	0,004	0,003	0,003	
27 Milos1_2	0,089	0,082	0,089	0,089	0,091	0,084	0,082	0,038	0,038	0,034	0,034	0,040	0,038	0,036	0,038	0,049	0,049	0,038	0,038	0,036	0,008	0,006	0,006	0,000		0,006	0,006	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
28 Milos2_1	0,091	0,084	0,091	0,091	0,094	0,087	0,084	0,040	0,040	0,036	0,036	0,043	0,040	0,038	0,040	0,040	0,051	0,051	0,036	0,036	0,034	0,010	0,008	0,008	0,008	0,008	0,002		0,000	0,002	0,004	0,003	0,003	
29 Milos3_2	0,091	0,084	0,091	0,091	0,094	0,087	0,084	0,040	0,040	0,036	0,036	0,043	0,040	0,038	0,040	0,040	0,051	0,051	0,036	0,036	0,034	0,010	0,008	0,008	0,008	0,008	0,002	0,000		0,002	0,004	0,003	0,003	
30 Milos4_1	0,089	0,082	0,089	0,089	0,091	0,084	0,082	0,038	0,038	0,034	0,034	0,040	0,038	0,036	0,038	0,038	0,049	0,049	0,038	0,038	0,036	0,008	0,006	0,006	0,006	0,000	0,002	0,002		0,004	0,002	0,002	0,002	
31 Paros1_6	0,084	0,078	0,084	0,084	0,087	0,080	0,078	0,038	0,038	0,034	0,034	0,036	0,034	0,034	0,040	0,040	0,038	0,038	0,036	0,012	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,008	0,010	0,010	0,008	0,008	0,003	0,003	0,003	
32 Serif1_2	0,087	0,080	0,087	0,087	0,089	0,082	0,080	0,036	0,036	0,032	0,032	0,038	0,036	0,034	0,036	0,036	0,047	0,047	0,036	0,036	0,034	0,006	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004	0,004	0,002	0,006	0,006	
33 Serif2_4	0,087	0,080	0,087	0,087	0,089	0,082	0,080	0,036	0,036	0,032	0,032	0,038	0,036	0,034	0,036	0,036	0,047	0,047	0,036	0,036	0,034	0,006	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004	0,004	0,002	0,006	0,006	0,000	
34 Astakl_1	0,066	0,055	0,062	0,066	0,069	0,062	0,060	0,055	0,055	0,060	0,060	0,062	0,060	0,062	0,060	0,062	0,062	0,069	0,069	0,075	0,066	0,064	0,064	0,064	0,064	0,064	0,066	0,069	0,069	0,066	0,066	0,064	0,064	0,064
35 Astak2_1	0,066	0,055	0,062	0,066	0,069	0,062	0,060	0,055	0,055	0,060	0,060	0,062	0,060	0,062	0,060	0,062	0,062	0,069	0,069	0,075	0,066	0,064	0,064	0,064	0,064	0,066	0,069	0,069	0,066	0,066	0,064	0,064	0,064	
36 Sofr1_1	0,066	0,055	0,062	0,066	0,069	0,062																												

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4.3 (συνέχεια): Κάτω από τη διαγώνιο γενετικές αποστάσεις μόνο για τις μεταστροφές με βάση το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura. Πάνω από τη διαγώνιο το τυπικό σφάλμα(με πλάγια γραφή).

		34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67			
1	Avgo_5	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,013	0,014	0,014	0,013	0,014	0,013	0,013	0,014	0,014	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,014	0,013	0,013	0,013	0,014	0,014	0,014	0,016	0,016	0,022	0,022	0,021		
2	Chrysi_5	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,011	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,012	0,011	0,011	0,011	0,012	0,013	0,013	0,013	0,014	0,014	0,014	0,017	0,016	0,021	0,021	0,021			
3	GLARON_1	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,014	0,014	0,013	0,013	0,012	0,011	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,013	0,014	0,014	0,016	0,017	0,021	0,021	0,020				
4	Petalid_2	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,014	0,014	0,014	0,013	0,014	0,013	0,013	0,014	0,013	0,012	0,011	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,014	0,014	0,014	0,017	0,017	0,021	0,021	0,020			
5	Pontik_1	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,014	0,014	0,014	0,014	0,013	0,013	0,014	0,014	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,014	0,014	0,016	0,017	0,021	0,021	0,020				
6	Psirol_4	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,012	0,011	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,013	0,014	0,017	0,017	0,021	0,021	0,020				
7	Psira_1	0,011	0,011	0,011	0,012	0,011	0,011	0,012	0,013	0,012	0,014	0,013	0,013	0,013	0,013	0,012	0,013	0,014	0,013	0,012	0,011	0,011	0,011	0,012	0,013	0,013	0,013	0,014	0,014	0,016	0,017	0,021	0,021	0,020				
8	NGreec1_7	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,011	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,010	0,011	0,011	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,016	0,019	0,020	0,020	0,019	
9	NGreec2_1	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,011	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,010	0,011	0,011	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,016	0,019	0,020	0,020	0,019
10	Alon_1	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,011	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,010	0,010	0,011	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,016	0,019	0,020	0,020	0,019
11	Perist_1	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,011	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,010	0,010	0,011	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,016	0,019	0,020	0,020	0,019
12	Npelop1_1	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,017	0,017	0,019	0,019	0,018			
13	Npelop2_2	0,011	0,011	0,011	0,012	0,011	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,012	0,011	0,012	0,011	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,012	0,017	0,017	0,019	0,019	0,018		
14	Npelop3_1	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,012	0,017	0,017	0,019	0,019	0,018		
15	Spelop_1	0,012	0,012	0,011	0,012	0,011	0,011	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,012	0,012	0,011	0,012	0,011	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,012	0,017	0,017	0,019	0,019	0,018			
16	Aegina_1	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,013	0,012	0,011	0,010	0,010	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,017	0,017	0,019	0,019	0,018			
17	Tinos1_4	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,018	0,018	0,020	0,020	0,019			
18	Tinos2_1	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,018	0,018	0,020	0,020	0,019			
19	Kythir1_1	0,012	0,012	0,012	0,013	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,011	0,012	0,011	0,012	0,013	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,012	0,016	0,018	0,019	0,019	0,019			
20	Kythir2_1	0,012	0,012	0,012	0,013	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,011	0,012	0,011	0,012	0,013	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,012	0,016	0,018	0,019	0,019	0,019			
21	AntiKr_5	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,014	0,014	0,014	0,013	0,014	0,012	0,012	0,012	0,012	0,013	0,011	0,011	0,011	0,011	0,010	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,016	0,018	0,019	0,019	0,019		
22	Amorgos_1	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,012	0,013	0,011	0,011	0,012	0,014	0,013	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,018	0,018	0,019	0,019	0,019			
23	Astyp1_1	0,012	0,012	0,011	0,012	0,011	0,011	0,012	0,012	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,012	0,013	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,017	0,018	0,021	0,021	0,020			
24	Astyp2_2	0,012	0,012	0,011	0,012	0,011	0,011	0,012	0,012	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,012	0,013	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,017	0,018	0,021	0,021	0,020			
25	Astyp3_1	0,012	0,012	0,011	0,012	0,011	0,011	0,012	0,012	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,012	0,013	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,017	0,018	0,021	0,021	0,020			
26	Astyp4_1	0,012	0,012	0,011	0,012	0,011	0,011	0,012	0,012	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,012	0,013	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,017	0,018	0,021	0,021	0,020			
27	Milos1_2	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,012	0,013	0,011	0,011	0,012	0,014	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,012	0,018	0,018	0,020	0,020	0,019			
28	Milos2_1	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,012	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,012	0,018	0,018	0,020	0,020	0,019			
29	Milos3_2	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,012	0,013	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,012	0,018	0,018	0,020	0,020	0,019			
30	Milos4_1	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,012	0,013	0,011	0,011	0,012	0,014	0,012	0,012	0																

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4.4: Κάτω από τη διαγώνιο δίνεται ο συνολικός αριθμός των νοοκλειστικών υποκαταστάσεων. Πάνω από τη διαγώνιο ο αριθμός των μεταπτώσεων.

1	Avgo_5		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
2	Chrysi_5	17		15	14	15	10	14	46	45	51	51	46	43	44	45	46	48	49	54	54	50	65	61	62	61	59	62	61	60	61	66	63	63	
3	Glaron_1	22	20		16	20	17	19	49	48	55	55	50	48	49	50	51	50	51	57	57	53	63	61	62	61	59	59	59	59	58	59	62	60	60
4	Petalid_2	16	19	20		5	10	14	50	49	55	55	48	48	48	46	46	49	50	57	57	55	62	59	60	59	57	58	59	58	59	62	58	60	
5	Pontik_1	19	21	25	6		11	18	49	48	52	52	47	49	49	45	52	53	58	58	53	60	57	58	57	55	60	59	58	59	60	60	60	60	
6	Psilor_4	16	13	21	14	16		14	48	47	53	53	45	45	45	43	46	47	56	56	54	66	62	63	62	60	63	61	60	61	64	63	63	63	
7	Psira_1	19	18	22	17	22	17		50	49	55	55	52	51	51	46	48	49	50	59	59	58	67	63	64	63	61	60	61	60	61	67	61	63	
8	NGreec1_7	87	88	88	91	91	87	88		1	22	23	50	50	49	55	53	44	45	52	52	48	74	65	66	65	63	62	62	61	63	65	63	65	
9	NGreec2_1	86	87	87	90	90	86	87	1		23	24	49	49	48	54	52	43	44	51	51	47	73	66	67	66	64	66	68	67	68	70	67	66	
10	Alon_1	93	91	94	94	92	90	91	24	25		2	51	48	47	54	53	45	46	55	55	50	66	58	59	58	58	59	61	60	61	65	60	59	
11	Perist_1	93	91	94	94	92	90	91	25	26	2		50	48	47	51	52	45	46	56	56	56	47	66	58	59	58	60	59	61	60	61	65	60	59
12	Npelop1_1	88	89	90	90	90	85	91	65	64	66	65		32	36	34	29	32	33	57	56	51	70	69	70	69	69	68	66	65	66	68	68	68	
13	Npelop2_2	90	87	89	91	93	86	91	64	63	62	62	35		3	31	20	24	25	54	55	49	65	61	62	61	59	66	66	65	64	63	63	63	
14	Npelop3_1	90	87	89	90	92	85	90	62	61	60	38	4		35	21	27	28	53	54	48	66	62	63	62	60	67	67	66	65	64	64	64	64	
15	Spelop_1	88	89	91	89	93	86	86	69	68	68	65	37	33	36		30	26	25	53	52	52	65	63	64	63	63	64	62	63	64	65	61	61	
16	Aegina_1	87	88	90	87	87	82	86	65	64	65	64	32	22	22	32		26	27	53	52	50	67	63	64	63	61	66	66	65	66	67	65	65	
17	Tinos1_4	92	93	92	93	97	88	90	61	60	62	62	40	31	33	33	33		1	44	44	47	67	62	63	62	60	60	60	59	60	66	62	62	
18	Tinos2_1	93	94	93	94	98	89	91	62	61	63	63	41	32	34	32	34	1		45	45	48	68	63	64	63	61	61	61	60	61	67	63	63	
19	Kythiri_1	99	98	98	100	102	97	99	64	63	67	68	74	70	68	69	67	65	66		1	24	70	65	66	65	63	62	61	62	62	66	65	66	
20	Kythir2_1	99	98	98	100	102	97	99	64	63	67	68	73	71	69	68	66	65	66	1		23	69	66	67	66	64	63	62	63	63	67	64	65	
21	Antikr_5	95	95	95	97	96	96	99	59	58	61	58	67	64	62	67	63	67	68	27	26		59	61	62	61	61	60	59	60	60	57	60	59	
22	Amorgos_1	111	106	107	106	105	108	108	95	94	85	85	92	86	86	86	88	91	92	91	90	79		13	14	15	14	19	20	19	18	15	12	10	
23	Astyp1_1	104	99	102	100	99	101	101	85	86	76	76	90	81	81	83	83	87	88	83	84	78	18		1	2	2	23	24	23	22	19	19	17	
24	Astyp2_2	105	100	103	101	100	102	102	86	87	77	77	91	82	82	84	84	88	89	84	85	79	19	1		1	3	24	25	24	23	20	20	18	
25	Astyp3_1	104	99	102	100	99	101	101	85	86	76	76	90	81	81	83	83	87	88	83	84	78	20	2	1		4	25	26	25	24	21	21	19	
26	Astyp4_1	102	97	100	98	97	99	99	83	84	76	78	90	79	79	83	81	85	86	81	82	78	19	2	3	4		25	26	25	24	19	21	19	
27	Milos1_2	104	101	101	100	103	103	99	86	85	76	76	88	85	85	83	85	84	85	81	82	78	23	26	27	28	28		7	6	7	25	20	20	
28	Milos2_1	105	101	102	102	103	102	101	89	88	79	79	87	86	86	86	85	86	85	86	79	80	76	25	28	29	30	8		1	2	25	21	19	
29	Milos3_2	104	100	101	101	102	101	100	88	87	78	78	86	85	85	83	85	84	85	80	81	77	24	27	28	29	29	7	1		1	24	20	18	
30	Milos4_1	105	100	101	101	102	101	100	88	87	78	78	86	83	83	83	85	84	85	81	82	78	22	25	26	27	27	7	3	2		24	19	17	
31	Paros1_6	105	103	102	102	101	102	104	88	89	82	82	86	80	80	82	84	86	87	85	86	75	21	24	25	26	24	29	30	29	28		22	20	
32	Serif1_2	104	101	101	99	102	102	99	86	85	76	76	87	81	81	79	83	85	86	83	82	77	15	21	22	23	23	21	23	22	20	25		2	
33	Serif2_4	106	101	101	101	102	102	101	85	84	75	75	87	81	81	79	83	85	86	84	83	76	13	19	20	21	21	21	21	20	18	23	2		
34	Astak1_1	93	90	87	97	98	96	89	85	84	86	86	97	96	97	101	96	88	89	90	96	90	91	92	91	90	87	87	86	84	94	88	89		
35	Astak2_1	94	91	88	98	99	97	90	85	84	86	86	96	95	96	100	97	87	88	89	89	95	89	90	91	90	89	86	86	85	83	93	87	88	
36	Sofr1_1	84	79	78	85	88	81	79	84	83	86	86	91	88	88	94	87	80	81	94	94	98	95	89	90	89	88	90	90	89	89	92	92	93	
37	Sofr2_1	84	79	78	85	88	81	79	85	84	87	87	92	89	89	95	88	81	82	94	94	98	96	90	91	90	89	91	91	90	90	93	93	94	
38	TR1_1	85	80	79	86	89	82	80	85	84	87	87	92	89	89	95	88	79	80	95	95	99	96	90	91	90	89	91	91	90	90	93	93	94	
39	TR2_1	85	80	79	86	89	82	80	85	84	87	87	92	89	89	95	88	79	80	95	95	99	96	90	91	90	89	91	91	90	90	93	93	94	
40	Karpat1_1	90	88	83	91	92	91	88	77	76	87	87	98	92	92	100	90	81	82	89	89	86	99	98	99	98	97	92	93	92	93	93	92	93	
41	Karpat2_1	96	95	88	93	95	97	94	81	82	89	89	103	95	95	105	95	84	85	91	91	85	101	99	100	99	98	96	97	96	96	93	94	95	
42	Karpat3_1	89	87	82	90	91	90	87	77	76	85	85	97	91	91	99	89	80	81	91	91	87	100	99	100	99	98	93	94	93	94	94	93	94	
43	Kasos1_1	88	88	86	89	90	90	90	82	82	88	86	95	97	97	102	96	90	91	98	98	93	100	97	98	97	98	93	94	93	94	94	94	95	
44	Kasos2_3	88	88	86	89	90	90	90	82	82	88	86	95	97	97	102	96	89	90	98	98	93	99	98	99	98	99	92	93	92	93	93	93	94	
45	Kasos3_1	88	88	86	87	88	90	88	83	83	89	87	94	98	98	101	95	90	91	99	99	94	98	97	98	97	98	91	92	91	92	92	92	93	
46	Prason1_1	87	87	83	87	88	90	87	83	82	86	86	96	90	90	99	89	85	86	89	89	88	101	98	99	98	97	92	93	92	91	95	96	97	
47	Prason2_1	88	88	83	88	89	90	88	83	82	86	86	94	90	90	98	87	82	83	89	89	87	102	99	100	99	98	92	93	92	93	96	98	98	
48	Fournoi_1	96	89	92	94	96	90	93	85	84	84	81	84	78	78	80	82	77	78	84	85	84	92	93	94	93	93	90	90	89	89	91	90	90	
49	Marathi_1	96																																	

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4.4 (συνέχεια): Κάτω από τη διαγώνιο δίνεται ο συνολικός αριθμός των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων. Πάνω από τη διαγώνιο ο αριθμός των μεταπτώσεων.

	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	
1 Avgo_5	61	62	52	51	53	53	55	59	55	51	50	50	50	50	60	59	51	52	58	60	66	59	56	47	49	48	56	56	55	51	50	55	53	61	
2 Chrysi_5	63	64	52	51	53	53	58	63	58	54	55	55	55	55	56	55	52	53	57	59	65	58	55	47	49	48	58	56	56	48	48	57	55	58	
3 Glaron_1	57	58	48	47	49	49	50	53	50	49	50	50	48	47	58	57	43	53	55	58	63	63	60	43	45	44	54	54	52	47	42	54	52	56	
4 Petalid_2	65	66	53	52	54	54	56	58	56	50	51	49	50	50	58	57	45	52	55	59	65	55	52	44	46	47	56	58	58	53	50	59	57	63	
5 Pontik_1	65	66	55	54	56	56	56	59	56	50	51	49	50	50	59	58	48	52	58	55	62	54	51	46	48	49	55	57	58	51	53	60	58	64	
6 Psilor_4	66	67	51	50	52	52	58	62	58	53	54	54	55	54	56	55	51	55	56	58	65	56	53	47	49	48	56	56	54	51	50	57	55	60	
7 Psira_1	60	61	50	49	51	51	56	60	56	52	53	51	53	53	60	59	46	51	54	58	67	55	52	44	46	45	53	55	54	52	44	55	53	58	
8 NGreec1_7	58	58	57	57	58	58	47	51	48	48	49	50	51	50	60	59	62	56	57	56	62	65	63	49	49	48	63	62	49	53	54	57	55	63	
9 NGreec2_1	57	57	56	56	57	57	46	52	47	48	49	50	50	49	59	58	63	57	58	57	63	64	62	50	50	49	62	61	48	54	54	56	54	63	
10 Alon_1	57	57	59	59	60	60	57	59	56	54	55	56	54	53	61	62	62	53	51	54	58	64	62	53	66	65	52	50	58	63	61	60			
11 PeriSt_1	57	57	59	59	60	60	57	59	56	52	53	54	54	53	58	59	61	53	52	55	57	65	63	52	51	52	66	65	51	50	58	64	62	60	
12 Npelop1_1	67	66	63	63	64	64	67	72	67	62	63	62	65	64	54	52	55	63	59	55	56	62	59	56	57	56	61	62	53	55	63	68	73		
13 Npelop2_2	67	66	59	59	60	60	60	63	60	61	62	63	56	57	49	49	58	55	54	53	52	55	53	59	60	59	57	56	58	51	59	66	64	58	
14 Npelop3_1	67	66	60	60	61	61	64	61	62	63	64	57	58	50	50	57	55	55	53	52	55	53	60	61	60	58	57	59	52	59	67	65	57		
15 Spelop_1	70	69	65	65	66	66	68	73	68	66	67	66	65	65	51	49	61	60	54	56	61	62	62	56	57	56	59	60	56	51	58	67	65	68	
16 Aegina_1	67	68	60	60	61	61	58	63	58	60	61	60	55	54	55	55	60	55	53	58	56	54	55	56	55	57	58	57	53	59	64	62	58		
17 Tinosis_4	58	57	54	54	53	53	52	55	52	57	57	58	52	52	47	46	58	55	49	45	50	55	54	47	49	48	48	46	50	59	57	57			
18 Tinosis_2	59	58	55	55	54	54	53	56	53	58	58	59	53	53	48	47	59	56	50	46	51	56	55	48	49	48	48	47	49	47	51	60	58	58	
19 Kythir1_1	57	56	61	60	62	62	55	57	58	62	61	62	55	54	55	57	63	61	51	63	66	72	70	59	60	59	67	66	51	57	62	66	64	73	
20 Kythir2_1	57	56	61	60	62	62	55	57	58	62	61	62	55	54	56	58	64	60	64	67	71	71	59	60	59	68	67	51	57	61	65	63	72		
21 AntiKr 5	60	59	64	63	65	65	51	52	53	56	55	56	51	49	54	59	58	57	49	66	63	69	70	58	59	58	71	70	58	58	64	64	62	70	
22 Amorgos_1	58	57	65	65	66	66	68	70	70	65	65	64	68	68	64	66	66	66	65	68	63	59	61	61	58	59	57	58	60	62	54	55	57	62	65
23 Astyp1_1	60	59	60	60	61	61	68	69	70	65	65	64	66	66	66	66	65	68	63	59	61	61	58	59	57	58	60	62	54	55	57	62	62	65	
24 Astyp2_2	60	60	61	61	62	62	69	70	71	66	66	65	67	67	67	67	66	69	64	58	60	62	59	61	63	55	56	58	63	63	66				
25 Astyp3_1	60	59	60	60	61	61	68	69	70	65	65	64	66	66	66	66	65	68	63	57	59	61	58	59	57	58	60	62	54	55	57	62	62	67	
26 Astyp4_1	59	58	59	59	60	60	67	68	69	66	66	65	65	66	66	66	65	66	61	57	61	59	56	57	57	58	60	62	56	53	55	61	61	63	
27 Milos1_2	55	54	60	60	61	61	61	65	63	58	58	57	59	58	64	66	63	73	65	57	64	61	60	59	58	59	67	69	53	61	56	62	62	70	
28 Milos2_1	54	53	59	59	60	60	63	67	65	60	60	60	59	61	60	63	65	65	75	63	55	62	64	63	59	58	64	66	55	59	55	61	61	68	
29 Milos3_2	53	52	58	58	59	59	62	66	64	59	59	58	60	59	62	64	64	74	64	54	61	63	62	58	57	58	63	65	54	58	54	60	60	67	
30 Milos4_1	52	51	59	59	60	60	62	65	64	59	59	59	63	65	65	64	63	55	62	62	61	59	58	59	62	64	53	60	55	59	59	67			
31 Paros1_6	64	63	64	64	65	65	64	64	66	61	61	60	64	64	67	67	62	66	66	57	61	61	60	59	60	61	63	65	57	57	62	65	65	67	
32 Serif1_2	57	56	63	63	64	64	62	64	64	60	60	59	64	65	65	65	69	69	61	57	64	62	63	62	61	62	61	63	58	57	59	62	62	67	
33 Serif2_4	58	57	64	64	65	65	63	65	65	61	61	60	65	65	65	65	69	71	63	57	64	63	64	62	61	62	61	63	57	55	60	62	67		
34 Astak1_1	2	39	38	38	38	47	47	46	46	46	48	39	40	63	66	66	65	53	63	69	61	58	48	48	49	57	57	52	56	40	47	45	56		
35 Astak2_1	2	41	40	40	40	49	49	48	46	46	48	41	42	63	66	65	65	55	63	69	63	59	48	48	49	58	58	51	57	39	49	47	58		
36 Sofr1_1	43	45	0	1	1	41	44	39	45	45	47	39	68	67	58	61	52	62	64	63	59	42	42	43	58	58	56	55	45	49	49	49	49		
37 Sofr2_1	43	45	1	1	1	40	43	38	44	44	46	38	38	67	66	58	60	52	62	64	62	58	43	43	44	59	59	56	55	45	49	49	49		
38 TR1_1	42	44	1	2	0	40	43	38	44	44	46	38	38	69	68	57	60	51	61	63	62	58	43	43	44	57	57	55	56	44	50	50	48		
39 TR2_1	42	44	1	2	0	40	43	38	44	44	46	38	38	69	68	57	60	51	61	63	62	58	43	43	44	57	57	55	56	44	50	50	48		
40 Karpat1_1	58	60	48	48	47	47	11	2	18	18	20	16	16	64	67	58	57	66	57	65	63	43	43	44	58	58	61	52	46	53	51	54			
41 Karpat2_1	60	62	53	53	52	52	15	9	23	23	23	22	22	70	71	58	57	65	60	65	63	44	44	45	58	58	63	54	46	54	52	55			
42 Karpat3_1	56	58	45	45	44	44	3	12	17	17	19	15	15	66	67	58	58	66	59	65	63	43	43	44	59	59	61	52	46	52	50	53			
43 Kasos1_1	61	61	56	56	55	55	26	33	24	0	2	15	15	60	61	53	61	57	62	56	61	59	43	43	44	56	56	55	51	51	60	58	58		
44 Kasos2_3	60	60	55	55	54	54	25	32	23	1	2	15	15	61	62	54	62	58	62	57	62	60	44	44	45	57	57	56	51	51	60	58	59		
45 Kasos3_1	62	62	57	57	56	56	27	32	25	3	2	17	17	61	62	52	62	58	60	57	60	58	44	44	45	55	57	56	51	53	60	58	61		
46 Prason1_1	50	52	50	50	49	49	24	30	22	25	24	26	0	68	71	58	58	48	61	60	59	56	43	43	44	57	57	59	51	48	60	58	56		

