

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΛΑΓΩΝ ΤΗΣ
ΚΡΗΤΗΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΗΣ
ΥΠΟΛΟΠΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΕΠΙΤΡΟΠΗ
Καθηγητής Ελευθερίου Α.
Ερευνητής Β' Μαγουλάς Α.

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
"ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ"

ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΑΓΛΑΪΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002

Ο Μύθος του Λαγού και του Ωρίωνα

Αν κάποιο βράδυ με ξαστεριά κοιτάξει κανείς τον ουρανό, θα δει να δεσπόζει ο αστερισμός του Ωρίωνα, του μεγάλου αυτού κυνηγού για τον οποίο υπάρχουν πολλοί μύθοι. Κάτω από τα πόδια του Ωρίωνα βρίσκεται ένας μικρός αστερισμός που συνήθως η παρουσία του περνά απαρατήρητη. Ο αστερισμός αυτός



καλείται *Lepus* ο λαγός. Φαίνεται λοιπόν ο Ωρίωνας να ήταν λάτρης του κυνηγιού και αρέσκονταν να κυνηγά λαγούς. Όταν κατάφερε να εντοπίσει το λαγό άρχισε να τον κυνηγά στέλνοντας παράλληλα και τα δύο σκυλιά του τον Μεγάλο (*Canis Major*) και τον Μικρό (*Canis Minor*) για να τον κυνηγήσουν. Ο λαγός κυνηγημένος από τον Ωρίωνα έτρεξε πάνω σε έναν λόφο με τα σκυλιά να τον καταδιώκουν. Το κυνήγι οδήγησε τον

Ωρίωνα στην ανακάλυψη των Πλειάδων τις οποίες και ερωτεύτηκε από την πρώτη ματιά. Οι πλειάδες όμως δεν ανταποκρίθηκαν στον έρωτά του και έτσι ένα άλλο είδος κυνηγιού ακολούθησε. Οι Πλειάδες βρήκαν καταφύγιο στους ώμους του Ταύρου (Βία) με τον οποίο ο Ωρίωνας ήρθε αντιμέτωπος. Σήμερα ο Ταύρος και ο Ωρίωνας ισορροπούν στον ουρανό αλλά είναι πάντα σε ετοιμότητα για τη μάχη. Ο λαγός παρατηρώντας όλα αυτά, επέλεξε για καταφύγιο του σημείο ακριβώς κάτω από τα πόδια του κυνηγού. Η απόφασή του αυτή τον καθιστά ασφαλή μιας και ο Ωρίωνας θα πρέπει για πάντα να έχει την προσοχή του στον Ταύρο με τον οποίο είναι έτοιμος να δώσει μάχη ενώ τα σκυλιά αναλώνουν όλο τους τον χρόνο ικετεύοντας τον κυνηγό για φαγητό ώστε δεν είναι σε θέση να παρατηρήσουν τον μικρό λαγό που κρύβεται ακριβώς από κάτω (Copyright © 1997 *Kathy A. Miles and Charles F. Peters II*).

Υπάρχουν αρκετές ερμηνείες για τη θέση του *Lepus* στην ιστορία αυτή. Μια από αυτές είναι ότι το καλύτερο μέρος για να κρύφει κανείς κάτι που έχει για αυτόν αξία είναι σε σημείο όπου μπορεί πολύ εύκολα να βρεθεί. Η ειρωνεία είναι ότι οι περισσότεροι δεν θα έφραχναν σε μια τόσο προφανή τοποθεσία. Η απλότητα, η αλήθεια και η ομορφιά που κυνηγάμε τόσο πολύ και που δύσκολα βρίσκουμε ίσως να έχει το καταφύγιο της μπροστά στα μάτια μας ενώ εμείς είμαστε πολύ απασχολημένοι για να το δούμε. Και όμως είναι πολύ ειρωνικό να κυνηγά κανείς κάτι για όλη του τη ζωή και τελικά στο δρόμο να παρασύρεται από όλα αυτά που του συμβαίνουν στην πορεία και να μην μπορεί να δει πια την αιτία για την οποία ξεκίνησε το κυνήγι του αυτό.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Βιολογικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης στο εργαστήριο του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας Κρήτης (Ι.ΘΑ.ΒΙ.Κ.).

Πρόκειται για μία μελέτη που θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί χωρίς την βοήθεια των Κυνηγετικών Συλλόγων της Κρήτης που συνέλεξαν δείγματα την κυνηγετική περίοδο 2001-2002, καθώς και τη βοήθεια των Κυνηγετικών Συλλόγων της ηπειρωτικής Ελλάδας, της Στ' Κυνηγετικής Ομοσπονδίας (Μακεδονίας-Θράκης) κατά τη διάρκεια των κυνηγετικών περιόδων 1997-1998 και 1999-2000 και τη βοήθεια των Κυνηγετικών Συλλόγων των Δωδεκανήσων, των Επτανήσων, της Νάξου και των Κυθήρων. Η προθυμία και το ενδιαφέρον τους αποτέλεσαν κρίσιμο σημείο για την πορεία της μελέτης αυτής. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον 1^ο Κυνηγετικό Σύλλογο Ηρακλείου που μας βοήθησε όχι μόνο στη συλλογή των δειγμάτων αλλά και στη συλλογή πολύτιμων πληροφοριών για τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν. Ιδιαίτερη μνεία αρμόζει στον δασολόγο Π. Πλατή για τον ενδιαφέρον, τις επιστημονικές συμβουλές και πληροφορίες καθώς και για το μεράκι του, που είναι εμφανές από την λεπτομερέστατη και σημαντική συμμετοχή του όχι μόνο στη συλλογή των δειγμάτων αλλά και στην χαρτογράφηση των περιοχών της βορείου Ελλάδας από τις οποίες συλλέχθηκαν δείγματα.

Η διεκπεραίωση της μελέτης αυτής θα ήταν ελλιπής χωρίς τη βοήθεια των φίλων και κυνηγών Μανώλη Παπαδημητράκη και Μανώλη Κοσκινά η αγάπη των οποίων για το κυνήγι τους ώθησε να αφιερώνουν πολύ από το χρόνο τους στο κυνήγι της γνώσης για το λαγό.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να αναφέρω ότι το θέμα της μελέτης αποτελεί «μεράκι» του ερευνητή Γιώργου Κωτούλα, ο οποίος και επέβλεψε την όλη μελέτη σε συνεργασία με τον ερευνητή Αντώνη Μαγουλά και τον καθηγητή του Πανεπιστημίου Κρήτης, Ελευθερίου Αναστάσιο. Η συνεργασία τους μαζί μου ήταν περισσότερο ουσιαστική και καθόλου τυπική και θα ήθελα να τονίσω ότι είχαν το ρόλο του δασκάλου με όλη τη σημασία της λέξεως καθόλη τη διάρκεια πραγματοποίησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Τους ευχαριστώ θερμά για την υποστήριξη, την κατανόηση και τη γνώση που μου παρείχαν όλον αυτό τον καιρό.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα «παιδιά» του εργαστηρίου τον Στέλιο Δαριβιανάκη, την Κατερίνα Οικονομάκη και τη Βάσω Τερζόγλου που δημιούργησαν και συνεχίζουν να δημιουργούν πολύ όμορφη και ζεστή ατμόσφαιρα στο εργαστήριο γεγονός που με έκανε από την πρώτη στιγμή να αισθανθώ πολύ όμορφα όντας στο εργαστήριο αυτό Τον Δρ. Τσιγγερόπουλο Κώστα τον ευχαριστώ θερμά για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε όποτε του τη ζήτησα.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Για το επίπονο όμως έργο μιας μεταπτυχιακής διατριβής απαραίτητη κρίνεται όχι μόνο η ηρεμία αλλά και η ευφορία της ψυχής και του μυαλού που για αυτήν ευθύνονται οι καλοί φίλοι και συνάδελφοι Κώστας Τριάντης, Άρης Παρμακέλης, Πέτρος Λυμπεράκης και Γεωργία Μάντζιου. Ευχαριστώ για όλα, ίσως να μην έχετε καταλάβει πόσο πολύτιμοι και απαραίτητοι ήσασταν για μένα.

Πώς όμως μπορείς να εκφράσεις τις ευχαριστίες σε κάποιον που αποτέλεσε και αποτελεί αιτία για την οποία δεν άφησα την απογοήτευση να με καταβάλει και να με αποτρέψει από την επίτευξη των στόχων μου. Νίκο σε ευχαριστώ για όλα...νομίζω ότι αν γράψω περισσότερα θα αλλοιωθεί το νόημα της πρότασης.

Τελευταίοι στον κατάλογο αυτό αλλά σίγουρα οι πιο σημαντικοί είναι εκείνοι χάρη στους οποίους βρέθηκα στο σημείο αυτό και οι οποίοι μου παρέχουν ολοκληρωτική αγάπη, κατανόηση, στήριξη και εφόδια για να γίνω καλύτερος άνθρωπος, η οικογένειά μου. Λεωνίδα, Μάτα και Ελινάκι σας χρωστάω τα πάντα και είμαι πολύ ευγνώμων για αυτό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Γενικά στοιχεία για τα Λαγόμορφα	3
1.1.1 Χαρακτηριστικά των Λαγόμορφων	3
1.1.2 Οικογένειες Λαγομόρφων	4
1.1.2.1 Οικογένεια Ochotonidae	4
1.1.2.2 Οικογένεια Leporidae	4
1.1.2.3 Τα Λαγόμορφα στην Ευρώπη	5
1.1.2.4 Το γένος <i>Lepus</i>	6
1.1.2.5 Το είδος <i>Lepus europaeus</i> Pallas 1778	6
1.2 Προέλευση των Λαγόμορφων	9
1.2.1 Φυλογενετικές σχέσεις των Leporidae μέσω Μοριακών Δεικτών	10
1.2.2 Μελέτες γενετικής διαφοροποίησης των Leporidae στην Ευρώπη	12
1.2.2.1 Αναλύσεις πρωτεϊνών	12
I) Αλλοένζυμα	12
II) Πεπτιδάσες	15
1.2.2.2 Αναλύσεις γενετικού υλικού (DNA)	16
I) Μιτοχονδριακό DNA	16
II) Πυρηνικό DNA (Μικροδορυφορικές αλληλουχίες)	17
1.2.2.3 Τι έχει γίνει στην Ελλάδα	18
1.2.2.4 Συμπεράσματα επί των γενετικών μελετών του <i>L. europaeus</i>	19
1.3 Μοριακοί Δείκτες	21
1.3.1 Γενικά Στοιχεία	21
1.3.1.1 Τι είναι οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες	22
1.3.2 Στάδια προετοιμασίας και μελέτης μικροδορυφορικών αλληλουχιών	23
1.3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων	23
1.3.2.2 Εξαγωγή του DNA	24
1.3.2.3 Ποσοτικοποίηση του DNA	24
1.3.2.4 Γονοτύπηση	24
1.3.2.4.1 Πολλαπλασιασμός του DNA	24
1.3.2.4.2 Multiplex PCR	26

1.3.2.4.3 Προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων της PCR	27
1.3.2.5 Πληθυσμιακή γενετική ανάλυση	27
1.4. Εναλλακτικές πηγές γενετικών δεδομένων για πληθυσμιακές μελέτες	28
1.4.1 Γενικά στοιχεία	28
1.4.1.1 Χρήση δειγμάτων περιττωμάτων ως πηγή γενετικού υλικού (DNA)	29
1.5 Σκοπός της παρούσας εργασίας	31
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
2.1 Γενικά στοιχεία	33
2.2 Δείγματα ιστών	33
2.3 Εξαγωγή γενετικού υλικού	34
2.4 Ποσοτικοποίηση του DNA	35
2.5 Γονοτύπηση	35
2.5.1 Οι εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό μικροδορυφορικών αλληλουχιών	35
2.5.2 Πολλαπλασιασμός του DNA	36
2.5.3 Οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων	37
2.5.4 Προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων της PCR	38
2.6 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	38
2.6.1 Προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση	38
2.7 Δείγματα περιττωμάτων	41
2.7.1 Εξαγωγή ολικού DNA από τα περιττώματα	41
2.7.2 Πολλαπλασιασμός DNA που εξάχθηκε από τα περιττώματα	42
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	44
3.1 Εξαγωγή και πολλαπλασιασμός του DNA	44
3.2 Στατιστική Ανάλυση των αποτελεσμάτων	45
3.2.1 Ομαδοποίηση των δεδομένων	45
3.2.2 Εκτιμήσεις Πληθυσμιακών Παραμέτρων	47
3.3 Αποτελέσματα από την ανάλυση των περιττωμάτων	61
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	63
4.1 Εύρος μεγέθους και αριθμός αλληλομόρφων	63
4.2 Ομαδοποίηση των δεδομένων - Εκτίμηση πληθυσμιακών παραμέτρων	64

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

4.3 Συμπεράσματα	72
4.4 Προοπτικές	72
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	75
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	92
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	96

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η φυλογεωγραφική δομή των πληθυσμών του ευρωπαϊκού λαγού (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) για ένα μεγάλο τμήμα της παραμένει άγνωστη, παρά τον μεγάλο αριθμό ετερογενών μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί σε ολόκληρη την Ευρώπη.

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν τρία ζευγάρια μικροδορυφορικών εκκινήτων για τον καθορισμό, σε επίπεδο πυρηνικού DNA, της μικρο και μακρο-γεωγραφικής γενετικής δομής του ευρωπαϊκού λαγού. Η ποικιλότητα των μικροδορυφορικών τόπων μελετήθηκε σε 142 άτομα της Κρήτης και 171 άτομα από πληθυσμούς της υπόλοιπης ηπειρωτικής και νησιωτικής Ελλάδας, της Κύπρου και της Ιταλίας. Οι υπό μελέτη πληθυσμοί παρουσιάζουν υψηλή ποικιλότητα με αναμενόμενη ετεροζυγωτία $H_e = 0.6881$ και μέση τιμή αλληλομόρφων $A = 6.66$. Παρατηρήθηκε σημαντική γεωγραφική διαφοροποίηση (μέση τιμή $F_{ST} = 0.19$) ενδεικτική της μικρής γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών. Αυτό φαίνεται να οφείλεται κατά κύριο λόγο σε απόλυτους φραγμούς (νησιά) αλλά και στη γεωγραφική απόσταση. Σημαντικές όμως τιμές F_{ST} παρατηρούνται και σε κοντινούς γεωγραφικά πληθυσμούς γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί βάσει δημογραφικών παραμέτρων. Η φυλογενετική ανάλυση των πληθυσμών ομαδοποιεί όλους τους νησιωτικούς πληθυσμούς έναντι των ηπειρωτικών κατά τρόπο που δεν μπορεί να εξηγηθεί εύκολα με την επίκληση ιστορικών παραγόντων και μόνο. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά της γενετικής δομής του Ελλαδικού χώρου έρχονται σε αντιπαράθεση με τη σχεδόν πλήρη απουσία γενετικής δομής που παρατηρείται σε πολύ μεγαλύτερη γεωγραφική κλίμακα στην κεντρική και βόρεια Ευρώπη. Αυτό στηρίζει τη βασισμένη σε μιτοχονδριακό DNA υπόθεση ότι η Βαλκανική αποτέλεσε καταφύγιο για τους λαγούς την τελευταία Παγετώδη περίοδο. Τα δεδομένα μας σε συνδυασμό με πληροφορία μιτοχονδριακού DNA δείχνουν ότι ο περιορισμός της γονιδιακής ροής αφορά και τα δύο φύλα σε αντίθεση με οικολογικές παρατηρήσεις της διασποράς των δύο φύλων.

SUMMARY

The phylogeographic structure of the European hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) remains largely unknown, despite the high number of miscellaneous studies conducted across Europe.

We have used three microsatellite primer pairs to determine the micro and macro-geographical genetic structure of European hares in terms of nuclear DNA. Variability in microsatellite DNA loci of 142 European hares from Crete and 171 from insular and continental parts of Greece as well as Cyprus and Italy was studied. A rich gene pool variability in all studied hare populations is suggested by high values of average expected heterozygosity ($H_e = 0.6881$) and mean number

of alleles ($A = 6.66$). The observed high level of genetic differentiation between hare populations ($F_{ST} = 0.19$) suggests slight gene flow between populations probably due to “ultimate” barriers (islands) and to a major effect of geographical distance. Substantial F_{ST} values observed at close populations in terms of geography can be explained by demographic parameters. Population phylogenetic analyses results to the formation of two distinct groups (insular and continental populations) in a way that can not be easily interpreted only with the appeal of historical parameters. The population structure observed in Greek populations is over against the almost complete absence of genetic structure observed in larger geographical scale (central and northern Europe). This is in accordance with the hypothesis suggested by mtDNA data that European hare probably differentiated in isolated refuges of Balkan peninsula during the last glaciation. Combination of our data and mtDNA data are indicative that limited gene flow is due to both sexes contrary to some ecological dispersion studies.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά στοιχεία για τα Λαγόμορφα

1.1.1 Χαρακτηριστικά των Λαγόμορφων

Τα λαγόμορφα, που περιλαμβάνουν του λαγούς, τα κουνέλια και τις πίκες ή ποντικολαγούς, διακρίνονται δύο μεγάλες οικογένειες, την Ochotonidae και τη Leporidae. Η πρώτη οικογένεια (ochotonids: πίκες ή ποντικολαγού) περιλαμβάνει το γένος *Ochotona*, στο οποίο έχουν αναγνωριστεί 25 είδη. Η δεύτερη οικογένεια, Leporidae (κουνέλια και λαγού), περιλαμβάνει 11 αρτίγονα γένη (54 είδη), 8 από τα οποία είναι μονοτυπικά (περιέχουν ένα μόνο είδος) (Hoffman 1993, Chapman and Flux 1990). Αντίθετα τα άλλα γένη, με εξαίρεση το γένος *Pronolagus* (περιλαμβάνει μόνο τρία είδη), διαθέτουν ένα σημαντικό αριθμό ειδών (30 είδη στο γένος *Lepus* και 13 είδη στο γένος *Sylvilagus*) (Halanych and Robinson 1999).

Μορφολογία: Ο οδοντικός τους τύπος περιλαμβάνει 2/1 κοπήρες, 0/0 κυνόδοντες, 3/2 προγόμφιους και 2-3/3 γομφίους, έχοντας συνολικά 26 ή 28 δόντια (Lawlor 1979, DeBlase and Martin 1981).

Τα Λαγόμορφα, εξαιτίας της παρουσίας δύο ζευγών κοπήρων στην άνω γνάθο, καλούνται και διπλόδοντα. Η ουρά απουσιάζει εξωτερικά ή είναι πολύ κοντή και τριχωτή (Οντριας 1996). Είναι χερσόβια, σκαπτικά, φυτοφάγα θηλαστικά, τα οποία μετακινούνται κυρίως με πηδήματα, που αν και υπάρχουν ορισμένες εξαιρέσεις, περνούν όλη τους τη ζωή πάνω από το έδαφος (DeBlase & Martin 1981).

Η κοινωνική τους δομή ποικίλλει από ένα διάσπαρτο σύστημα (π.χ *Lepus*) έως ένα ιεραρχικό σύστημα (dominance hierarchies) όπως παρατηρείται στο Ευρωπαϊκό κουνέλι (*Oryctolagus cuniculus*) (Eisenberg 1966 από DeBlase & Martin 1981).

Διατροφή: Τρέφονται κυρίως με μικρά ποώδη φυτά, αλλά και με θάμνους (DeBlase & Martin 1981). Σε εξαιρετικές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί σαρκοφαγία από κάποια είδη Λαγομόρφων, όταν αυτά βρεθούν σε αντίξοες για την επιβίωση συνθήκες. Τα περισσότερα είδη λαγών προσαρμόζονται εύκολα στη βλάστηση που τους περιβάλλει. Η **κοπροφαγία** (η επανάληψη της διαδικασίας της πέψης των κοπράνων) αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό της συμπεριφοράς των λαγόμορφων (Watson and Taylor 1955). Τα λαγόμορφα παράγουν δύο τύπους περιττωμάτων. Τα μαλακά και υγρά περιττώματα, τα οποία τρώγονται και τα σκληρά και ινώδη περιττώματα, τα οποία και αποβάλλονται. Αυτή η συνήθεια επιτρέπει στο ζώο να απορροφά τη μέγιστη δυνατή θρεπτική αξία των ινωδών φυτικών τροφών που καταναλώνει (πρωτεΐνες βιταμίνες και άλλοι μεταβολίτες), καθώς και ορισμένων βιταμινών, που παράγονται από τα βακτήρια του εντέρου (τυφλό) (Hansen & Flinders 1969, Lawlor 1979).

Κατανομή: Τα Λαγόμορφα κατανέμονται σε όλες τις κύριες χερσαίες περιοχές με εξαίρεση τη Νότια Αμερική, τη Μαδαγασκάρη, τις Δ. Ινδίες και τα περισσότερα νησιά της ΝΑ Ασίας. Παράλληλα έχουν εισαχθεί από τον άνθρωπο στις περιοχές της Αυστραλίας, της Νέας Ζηλανδίας, της Ιάβας, καθώς και σε πολλά ωκεάνια νησιά (DeBlase & Martin 1981).

1.1.2 Οικογένειες Λαγομόρφων

1.1.2.1 Οικογένεια Ochotonidae

Στην οικογένεια αυτή ανήκουν οι πίκες ή ποντικολαγοί, που δεν έχουν ουρά και διαθέτουν κοντά αυτιά και τέσσερα ισομήκη άκρα. Τρέφονται κατά τη διάρκεια της νύχτας και αναπαύονται σε κοιλότητες βράχων την ημέρα. Απαντώνται με ασυνεχή εξάπλωση σε περιοχές της κεντρικής και βόρειας Ασίας και της Βόρειας Αμερικής (Οντριας 1996).

1.1.2.2 Οικογένεια Leporidae

Στην οικογένεια αυτή ανήκουν οι λαγοί και τα κουνέλια. Σύμφωνα με τους Dice (1929) και Simpson (1945), η οικογένεια **Leporidae** υποδιαιρείται σε δύο υποοικογένειες: την **Paleolaginae**, που περιλαμβάνει τα γένη *Pentalagus*, *Pronolagus* και *Romerolagus* και την **Leporinae**, η οποία περιλαμβάνει όλα τα υπόλοιπα γένη (Wilson and Reeder 1993). Οι υποοικογένειες αυτές όμως δεν αναγνωρίζονται από τους Ellerman & Morrison-Scott (1951).

Η ουρά τους είναι κοντή και πολύ τριχωτή. Τα οπίσθια άκρα είναι κατά πολύ μακρύτερα από τα πρόσθια. Όλα τα άκρα είναι πενταδάκτυλα, όμως το πρώτο δάκτυλο σε κάθε άκρο είναι υποπλασμένο.

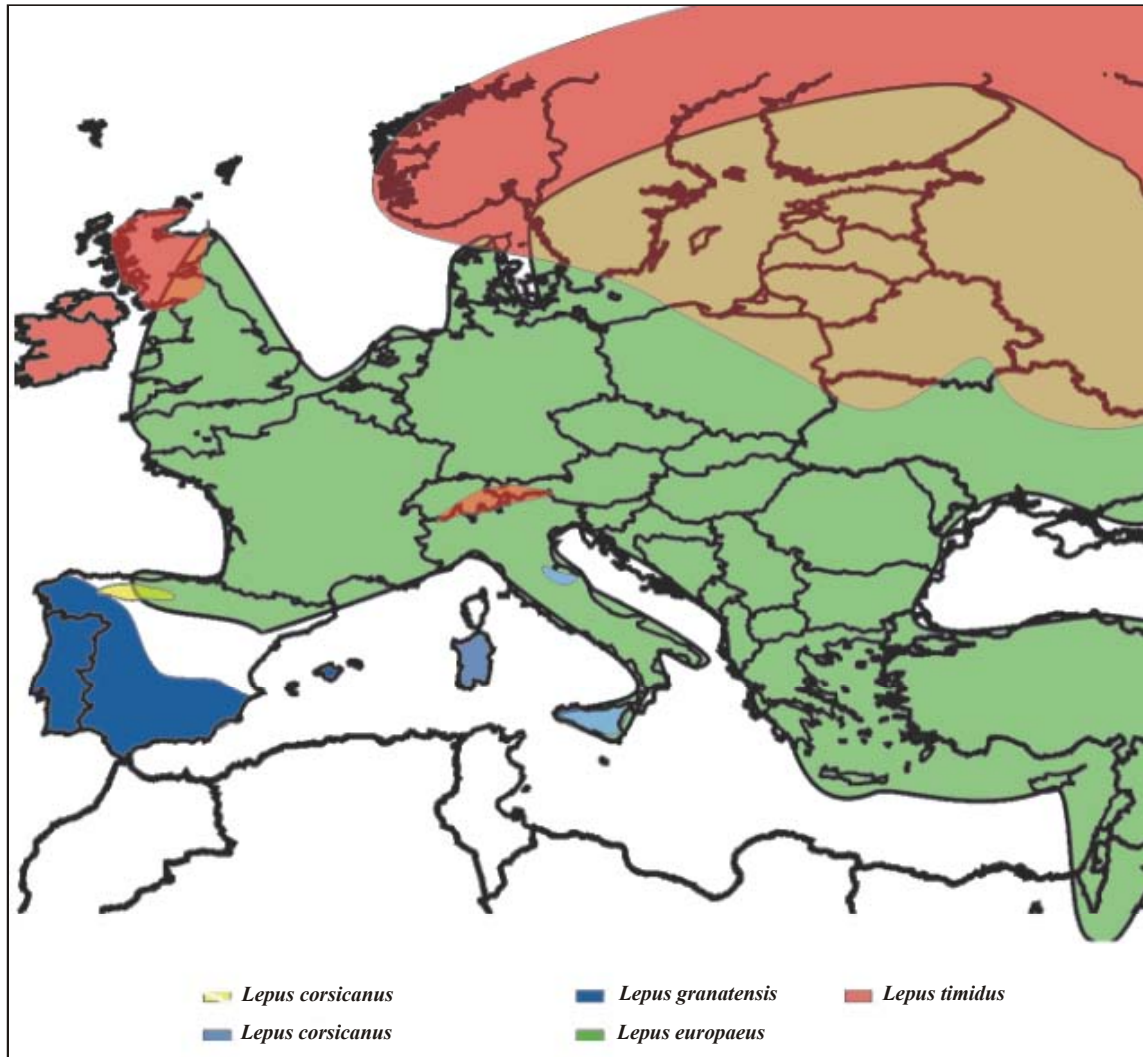
Τα αρσενικά άτομα είναι μικρότερα από τα θηλυκά, το αντίθετο δηλαδή από ότι παρατηρείται συνήθως στα θηλαστικά. Το βάρος τους κυμαίνεται από 2Kg (οι αντιπρόσωποι του Ισημερινού) έως 5Kg (αντιπρόσωποι των βόρειων περιοχών) (Flux & Angermann 1990).

Ζουν κυρίως σε ανοικτές εκτάσεις, καταλαμβάνοντας ποικίλα ενδιαιτήματα (αρκτική τούνδρα, στέπες, γεωργικά λιβάδια, τροπικές σαβάνες και ερήμους) σε βόρειες, εύκρατες και τροπικές περιοχές, από το επίπεδο της στάθμης της θάλασσας έως τα 5000 μέτρα. Το εύρος της χωροκράτειας (home range) κυμαίνεται από 10 έως 300ha (Monaghan and Metcalfe 1985). Είναι κυρίως νυκτόβιοι οργανισμοί, οι πληθυσμοί των οποίων εμφανίζουν μεγάλες κυκλικές διακυμάνσεις (Keith 1963).

Συνήθως γεννούν από 1 έως 6 μικρά. Στους λαγούς των βόρειων περιοχών έχουν παρατηρηθεί πολλές φορές ακόμα και 8 μικρά. Αντίθετα στις περιοχές του Ισημερινού γεννούν 1-2 μικρά, έχοντας όμως μια εκπληκτική συνεχή αναπαραγωγή καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου, ώστε τελικά να γεννιούνται μέσα σε ένα χρόνο περίπου 10 μικρά ανά θηλυκό άτομο (Flux 1981).

1.1.2.3 Τα Λαγόμορφα στην Ευρώπη

Στην Ευρώπη, εμφανίζονται μόνο αντιπρόσωποι της οικογένειας Leporidae όπου ζουν συνολικά 6 είδη (δύο γένη *Lepus* και *Oryctolagus*-**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1: Χάρτης κατανομής των ειδών της οικογένειας *Leporidae* στην Ευρώπη. Στην εικόνα δεν παρουσιάζεται η κατανομή του είδους *Oryctolagus cuniculus* εξαιτίας της έντονης επικάλυψής της με αυτές των υπολοίπων ειδών.

Στην παραπάνω εικόνα δεν παρουσιάζεται η κατανομή του είδους *Oryctolagus cuniculus* το οποίο επίσης κατανέμεται σε περιοχές της Ευρώπης.

1.1.2.4 Το γένος *Lepus*

Το γένος *Lepus*, που εξαπλώνεται τόσο στον Παλαιό όσο και στον Νέο Κόσμο, είναι αρκετά πολύπλοκο από ταξινομική άποψη, αφού τα είδη που αναγνωρίζονται μέσα σε αυτό ποικίλλουν από 12 έως πάνω από 30 ανάλογα με την ταξινομική κλείδα που χρησιμοποιείται.

Έκτός από κάποιες μελέτες που έχουν γίνει σε μικρές περιοχές (Dixon *et al.* 1983, Robinson 1982, Schneider and Leipoldt 1983) οι σχέσεις μεταξύ των λαγών παραμένουν αρκετά ασαφείς, αφού δεν υπάρχει κάποια γενικότερη ομοφωνία, όσον αφορά την εγκυρότητα αρκετών ειδών αυτής της ομάδας. Μια από τις μεγαλύτερες δυσκολίες αποτελεί το γεγονός ότι τα είδη που εμφανίζουν ευρεία κατανομή, παρουσιάζουν πολύ μεγαλύτερη ενδοειδική ποικιλομορφία (απομακρυσμένοι γεωγραφικά πληθυσμοί) παρά διαειδική. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι επιστήμονες να τείνουν να περιγράφουν τις τοπικές αυτές μορφές ως νέα είδη (Flux and Flux 1983). Οι περισσότεροι ταξινομικοί χαρακτήρες παρουσιάζουν τοπική ποικιλομορφία και η μελέτη αυτών αλλά και μοριακών δεδομένων μπορεί να οδηγήσει σε εντελώς αντίθετα συμπεράσματα (π.χ. Palacios 1983, Schneider and Leipoldt 1983).

Δεδομένης αυτής της αβέβαιης ταξινομικής είναι σχεδόν αδύνατο να καθοριστούν τα εξελικτικά μονοπάτια που ακολούθησε το γένος *Lepus*, όπως και οι πρόγονοί του.

1.1.2.5 Το είδος *Lepus europaeus* Pallas 1778

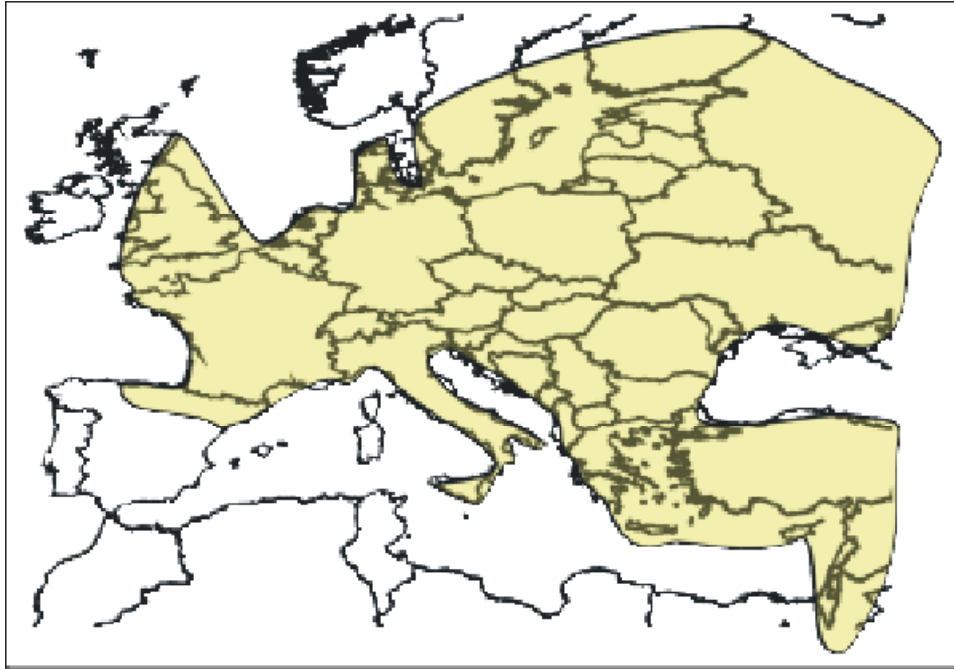
Ο Ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaeus*), η συστηματική κατάταξη του οποίου δίνεται στον Πίνακα 1, προήλθε από τα ανοιχτά λιβάδια στέπας της Ευρασίας και προσαρμόστηκε με μεγάλη επιτυχία σε περιοχές μικτής καλλιέργειας (Frylestam 1980).

Μορφολογικά χαρακτηριστικά: Είναι ένα ζώο με μέσο βάρος 3.8Kg (3-5Kg) και σχετικά ομοιόμορφη εμφάνιση. Το τρίχωμά του είναι μακρύ και σγουρό στην περιοχή της ράχης, με καφέ-κίτρινο χρώμα στο στήθος και στο πλάι, σκουρότερο στην πάνω πλευρά και άσπρο στην κάτω. Η ουρά τους είναι μεγάλη και εμφανής, μαύρη στην κορυφή και άσπρη στην κάτω μεριά της. Οι άκρες των αυτιών τους διαθέτουν τριγωνικό μαύρου χρώματος κομμάτι στην πίσω πλευρά τους, που έρχεται σε αντίθεση με το απαλότερο γκρίζο χρωματισμό του υπόλοιπου αυτιού τους (Flux & Angermann 1990).

Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη του είδους *Lepus europaeus* και υποείδη που έχουν αναγνωριστεί (Flux & Angermann 1990). Τα υποείδη που φαίνονται με έντονα γράμματα αποτελούν αναφορές για την περιοχή της Ελλάδας (Ondrias 1965).

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ	
ΦΥΛΟ	Χορδωτά
ΚΛΑΣΗ	Θηλαστικά
ΤΑΞΗ	Λαγόμορφα
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Leporidae
ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Leporinae
ΓΕΝΟΣ	<i>Lepus</i>
ΕΙΔΟΣ	<i>Lepus europaeus</i>
Υποείδη που έχουν αναγνωριστεί	<i>L.e. alba</i> , <i>L.e. argenteogrisea</i> , <i>L.e. briamicus</i> , <i>L.e. borealis</i> , <i>L.e. caspicus</i> , <i>L.e. europaeus</i> , <i>L.e. flavus</i> , <i>L.e. gallaecius</i> , <i>L.e. hispanicus</i> , <i>L.e. hybridus</i> , <i>L.e. hyemalis</i> , <i>L.e. iturissius</i> , <i>L.e. kalmykorum</i> , <i>L.e. karpatorium</i> , <i>L.e. medius</i> , <i>L.e. meridionalis</i> , <i>L.e. niger</i> , <i>L.e. occidentalis</i> , <i>L.e. ponticus</i> , <i>L.e. pyrenaicus</i> , <i>L.e. tesquorum</i> , <i>L.e. tumak</i> , <i>L.e. carpathous</i> , <i>L.e. creticus</i> , <i>L.e. cyrensis</i> , <i>L.e. ghigii</i> , <i>L.e. meridiei</i> , <i>L.e. niethammeri</i> , <i>L.e. parnassius</i> , <i>L.e. rhodius</i> , <i>L.e. transsylvanicus</i>

Κατανομή: Ο ευρωπαϊκός λαγός είναι ιθαγενής του μεγαλύτερου τμήματος της Ευρώπης (Εικόνα 2). Εξαιτίας όμως της σημαντικότητάς του ως θηρεύσιμου είδους (game animal) έχουν παρατηρηθεί επιτυχημένες εισαγωγές πληθυσμών τους σε περιοχές του Καναδά, σε βορειοανατολικές περιοχές των Η.Π.Α., στο μεγαλύτερο τμήμα της Νότιας Αμερικής, στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία. Μικροί πληθυσμοί έχουν επίσης εισαχθεί σε αρκετά νησιά της Βόρειας Θάλασσας, τα νησιά Barbados, Réunion καθώς και τα νησιά Falkland (Flux & Angermann από 1990). Ο ευρωπαϊκός λαγός είναι το μοναδικό είδος λαγού που υπάρχει στα Βαλκάνια και τη Μικρά Ασία και αποτελεί κύριο στοιχείο της πανίδας των ανοικτών δασικών και αγροτικών περιοχών, φτάνοντας σε υψόμετρο άνω των 1500m (Mitchell-Jones *et al.* 1999).



Εικόνα 2: Χάρτης Κατανομής του είδους *Lepus europaeus* (MacDonald & Barrett 1995).

Διατροφή: Ζει από το επίπεδο της θάλασσας έως και σε αρκετά μεγάλο υψόμετρο (άνω των 1500m στις Άλπεις και ακόμα σε μεγαλύτερο στα Πυρηναία) (MacDonald & Barrett 1995). Οι τροφικές του συνήθειες ποικίλλουν και εξαρτώνται από τον τύπο του περιβάλλοντος στο οποίο διαβιεί. Στην Ευρώπη η διατροφή συνίσταται κατά 90% από ποώδη φυτά, 5,5% από ξυλώδη φυτά, 2,2% από ρίζες σπαρτών, 1,7% από σπόρους των σπαρτών και 0,5% από φυτά δασικών περιοχών (Zörner 1977).

Συμπεριφορά: Είναι ζώο μοναχικό και κυρίως νυκτόβιο. Έχει μεγάλη δυνατότητα ημερήσιας μετακίνησης, αφού μπορεί να διανύσει μια απόσταση 15Km προκειμένου να βρει τροφή (Flux 1967). Η τροφοληψία του αρχίζει τη νύχτα ή αργά το απόγευμα σε περιοχές μεγάλου γεωγραφικού πλάτους, μια διαδικασία που καλύπτει περίπου το 1/3 της ζωής του. Σε ορισμένες περιπτώσεις δημιουργούν κατά τη διάρκεια συλλογής της τροφής μικρές ομάδες. Αυτό τους δίνει το πλεονέκτημα ο κάθε λαγός να καταναλώνει λιγότερο χρόνο στο να προσέχει για θηρευτές (MacDonald & Barrett 1995). Επιπρόσθετα, πριν την είσοδό του στην κρυψώνα του κατά τη διάρκεια της ημέρας, επαναπραγματοποιεί τις διαδρομές που έκανε κατά τη διάρκεια της νύχτας, έτσι ώστε να μπερδέψει τους θηρευτές του (Flux 1981b).

Αναπαράγεται σχεδόν ολόκληρο το χρόνο, αν και η αναπαραγωγική περίοδος θεωρείται ότι αρχίζει το χειμερινό ηλιοστάσιο. Η αναπαραγωγική συμπεριφορά του είδους κορυφώνεται κατά την περίοδο της άνοιξης (Mad March hares) παρατηρώντας περίπου 12 αρσενικούς λαγούς

να συναθροίζονται γύρω από ένα θηλυκό άτομο που βρίσκεται σε οίστρο (Schneider 1978, MacDonald & Barrett 1995).

Αναπαραγωγή: Τα νεογνά γεννιούνται πάνω στο έδαφος με πλήρες τρίχωμα και με ανοιχτά μάτια (MacDonald & Barrett 1995). Το ζώο αποκτά το μέγεθος του ενήλικου ατόμου στην ηλικία 5 μηνών. Τα αρσενικά άτομα ωριμάζουν αναπαραγωγικά από τον 6 μήνα ζωής τους, ενώ τα θηλυκά άτομα από τον 7-8 μήνα και γεννούν 6-10 μικρά. Η κυοφορία διαρκεί περίπου 41-42 ημέρες, ενώ το μέγιστο όριο ηλικίας που έχει παρατηρηθεί φτάνει τα 13 χρόνια. (Flux & Angermann 1990, MacDonald & Barrett 1995)

Η έντονη θήρευση των νεογνών από τους θηρευτές και ιδιαίτερα από τις αλεπούδες (οι οποίες αντικαθιστώνται από τις ζουρίδες για την περιοχή της Κρήτης), οι πολυάριθμοι γεωργικοί κίνδυνοι, οι οποίοι περιλαμβάνουν τα γεωργικά μηχανήματα, τα φυτοφάρμακα, η εντατικοποίηση της γεωργίας, η εγκατάλειψη της μικτής γεωργίας (δημιουργία μονοκαλλιεργειών), η απώλεια της ποικιλότητας των ενδιαιτημάτων στις αγροτικές περιοχές, η παράνομη θανάτωση των λαγών (φαινόμενο πολύ έντονο στην Κρήτη), ο εμβολιασμός κατά της λύσσας και η επακόλουθη αύξηση των πληθυσμών των αλεπούδων, τα ατυχήματα στους δρόμους από τα διερχόμενα οχήματα και οι ασθένειες (κοκκιδίαση, η αιμορραγική νόσος (EBHS) και η yersiniosis) έχουν τόσο άμεσες όσο και έμμεσες επιδράσεις στη βιωσιμότητα των λαγών (Marboutin and Peroux 1995, MacDonald & Barrett 1995, Edwards *et al.* 2000). Αντίθετα, το κυνήγι δεν αναφέρεται στις αιτίες μείωσης του πληθυσμού διότι αποτελεί δραστηριότητα που διέπεται από κανονισμούς με σκοπό να προσεγγίσουν τη μέγιστη αειφορική κάρπωση χωρίς τα θέσουν τους πληθυσμούς σε κίνδυνο.

1.2 Προέλευση των Λαγόμορφων

Σύμφωνα με το αρχείο των απολιθωμάτων τα **Λαγόμορφα** πρωτοεμφανίστηκαν στην Ασία (Κίνα – Μογγολία) πριν από 60 περίπου εκατομμύρια χρόνια (Κατώτερο Παλαιόκαινο). Το παλαιότερο γνωστό απολίθωμα, ηλικίας Κ. Παλαιοκαίνου, της ομάδας αυτής ανήκει στο γένος *Eurymylus* (Μογγολία), και αποτελεί μέλος της εξαφανισμένης οικογένειας Eurymylidae. Παράλληλα αποτελεί το μοναδικό αντιπρόσωπο των λαγόμορφων μέχρι το Ανώτερο Ηώκαινο, οπότε και έχουμε την εμφάνιση αντιπροσώπων των δύο σύγχρονων οικογενειών των λαγόμορφων (Leporidae, Ochotonidae) σε περιοχές της Νεαρκτικής και της Ολαρκτικής (Lawlor 1979, DeBlase & Martin 1981).

Τα λαγόμορφα που υπάρχουν και σήμερα, φαίνεται να έχουν προέλθει από τις μορφές του ανώτερου Τεταρτογενούς (τελευταία 1 εκατ. χρόνια) (Dawson 1958).

Υπάρχουν αμφισβητήσεις και αντιπαραθέσεις, όσον αφορά την προέλευση των λαγόμορφων. Μέχρι πριν από λίγα χρόνια υπήρχε η πεποίθηση ότι οι πρόγονοι του *Eurymylus* ήταν είτε τα Εντομοφάγα είτε τα Οπληφόρα θηλαστικά (MacDonald & Barrett 1995). Κάποτε θεωρήθηκαν στενά συγγενικές μορφές με τα Τρωκτικά και για αυτό είχαν ταξινομηθεί ως υπόταξη της παραπάνω ομάδας (Lawlor 1979), ενώ ακόμα και σήμερα πολλοί συγγραφείς εξακολουθούν να τοποθετούν τις δύο ομάδες τη μία μετά την άλλη στη συστηματική σειρά. Παράλληλα πολλοί ερευνητές επηρεασμένοι από τις ομοιότητες που παρατηρούνται μεταξύ των Τρωκτικών και των Λαγόμορφων (τόσο στο κρανίο όσο και στην εμβρυακή μεμβράνη και την ανάπτυξη των δοντιών) υποστηρίζουν ότι οι ομάδες αυτές θα πρέπει να ταξινομηθούν στην υπέρταξη των Glires.

Οι μέχρι σήμερα δημοσιευμένες φυλογενετικές μελέτες δεν έχουν ξεκαθαρίσει πλήρως την εικόνα. Δεδομένα πυρηνικού DNA (nuclearDNA) υποδεικνύουν μια σύνθετη ομάδα, η οποία αποτελείται από τα Πρωτεύοντα, τα Λαγόμορφα και τα Τρωκτικά (Miyamoto and Goodman 1986). Μοριακές αναλύσεις ποντικολαγών (Ασιατικοί λαγοί) είναι ενδεικτικές των στενών σχέσεων με τους σκίουρους (Τρωκτικά), καθώς και με Σαρκοφάγα (MacDonald & Barrett 1995). Αντίθετα δεδομένα από mtDNA τοποθετούν τα Λαγόμορφα (χρησιμοποιώντας ως αντιπρόσωπο το κουνέλι) πιο κοντά στα Περισοδόακτυλα (Perissodactyla), τα Cetartiodactyla (φάλαινες και αγελάδες) και τα Σαρκοφάγα (Carnivora), παρά στα Πρωτεύοντα (Primates) (Waddell *et al.* 1999). Παράλληλα δεδομένα που προκύπτουν από τις αναλύσεις tRNA υποστηρίζουν την ύπαρξη της παραπάνω ομάδας και προσθέτουν σε αυτήν και τους σκαντζόχοιρους (Εντομοφάγα). Παρόλα αυτά δεν απορρίπτεται η ύπαρξη της ομάδας των Glires (Waddell *et al.* 1999).

1.2.1 Φυλογενετικές σχέσεις των Leporidae μέσω Μοριακών Δεικτών

Τα είδη της οικογένειας Leporidae (Λαγόμορφα) έχουν ελάχιστα μελετηθεί από εξελικτική άποψη (Dawson 1958, 1981, Hibbard 1963, Myers and MacInnes 1981). Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην αρχή της εισαγωγής, δεν έχει αποσαφηνιστεί η θέση των Λαγομόρφων μέσα στην ομοταξία των θηλαστικών, όπου οι απόψεις είναι αρκετές και πολλές φορές αντικρουόμενες (Li *et al.* 1987, Novacek *et al.* 1988, Novacek 1990, 1993, Meng *et al.* 1994, Graur *et al.* 1996, Halanych 1998). Το γεγονός αυτό απαιτεί τη μελέτη φυλογενετικών σχέσεων μέσα στην οικογένεια των Leporidae που θα επιτρέψει τη διερεύνηση στο μέλλον των εξελικτικών μηχανισμών της διαφοροποίησης των λαγόμορφων (Halanych and Robinson 1999).

Οι σύγχρονες μελέτες της οικογένειας Leporidae (Corbet 1983, Chapman and Flux 1990) βασίζονται κατά πολύ στην ερμηνεία, τόσο του Dawson (1958, 1981), όσο και του Hibbard (1963), των μηδαμινών παλαιοντολογικών ενδείξεων. Βασισμένος στα απολιθώματα ο Hibbard

(1963) ανέπτυξε μια θεωρία κατά την οποία το γένος *Lepus* προέκυψε για πρώτη φορά στη Βόρεια Αμερική υπονοώντας ότι οι λαγοί εξαπλώθηκαν στη συνέχεια (μέσω ακτινωτής εξέλιξης) και στις άλλες ηπείρους. Αυτή η υπόθεση αν και δεν έχει επιβεβαιωθεί μέχρι σήμερα δεν έχει απορριφθεί. Δεδομένα ωστόσο από την μελέτη των Halanych *et al.* (1999) δείχνουν καθαρά ότι τα είδη του γένους αυτού για την περιοχή της Βόρειας Αμερικής δεν αποτελούν ένα μονοφυλετικό κλάδο.

Τα κυτταρογενετικά δεδομένα τα οποία είναι διαθέσιμα για 8 αρτίγονα γένη (Robinson 1980, Robinson *et al.* 1981, 1983a,b, 1984, van der Loo *et al.* 1981, Robinson and Skinner 1983) δεν περιέχουν πληροφοριακούς χαρακτήρες με τους οποίους να γίνει δυνατή η εξαγωγή φυλογενετικών συμπερασμάτων. Η απουσία συναπομορφιών, τόσο στα παλαιοντολογικά, όσο και στα κυτταρογενετικά δεδομένα, είναι ενδεικτικό της σχεδόν ταυτόχρονης προέλευσης πολλών γενών της παραπάνω οικογένειας (συμπεριλαμβανομένων και των γενών *Lepus* και *Sylvilagus*) κατά τη διάρκεια μιας σύντομης ακτινωτής διαφοροποίησης (Halanych and Robinson 1999).

Μελέτες παλαιότερων ετών τοποθετούν την διαφοροποίηση αυτή στο Μέσο με Ανώτερο Πλειστόκαινο (Dawson 1981, Hibbard 1963, Chapman and Flux 1990). Ωστόσο, οι Biju-Duval *et al.* (1991) βασισμένοι στην ανάλυση περιοριστικών θέσεων του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) χρονολογούν τον κοινό πρόγονο των γενών *Sylvilagus*, *Lepus* και *Oryctolagus* στα 6-8 εκατ. χρόνια.

Αντίθετα, η μελέτη των Halanych και Robinson (1999) βασισμένη στη μικρή υπομονάδα του μιτοχονδριακού ριβοσώματος (12S rDNA) παρουσιάζει μια ακόμα παλιότερη χρονολογία (12.2 με 16.3 εκ. χρόνια πριν). Σύμφωνα με την ίδια μελέτη, το γένος *Pronolagus*, το οποίο τοποθετείται στη βάση των φυλογενετικών γραμμών των Leporidae, διαφέρει κατά πολύ από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας. Το στοιχείο αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, βάσει των οποίων το γένος *Pronolagus* διαχωρίζεται μορφολογικά από τα περισσότερα Leporidae (Dice 1929, Corbert 1983). Ωστόσο, οι χαμηλές τιμές στατιστικής υποστήριξης (bootstrap values) διατηρούν διαφορούμενη τη μονοφυλετικότητα του γένους (Halanych and Robinson 1999).

Οι εξελικτικές σχέσεις και η ταξινομική των ειδών λαγού που ζουν στην Ευρώπη είναι αντιφατικές και ένα μεγάλο μέρος αυτής της αντίφασης εντοπίζεται στην Ιβηρική χερσόνησο. Σύμφωνα με κάποιους ερευνητές, το πιο κοινό είδος λαγού που εντοπίζεται στην Ιβηρική χερσόνησο είναι το *Lepus capensis* ενώ το είδος λαγού που εντοπίζεται δυτικά από τα Πυρηναία είναι το *Lepus europaeus*. Διάφορες μορφολογικές και γενετικές μελέτες παρουσιάζουν αντιφατικές απόψεις, βάσει των οποίων υπάρχουν τρία είδη λαγού στην Ιβηρική χερσόνησο (*L.*

granatensis, *L. castroviejoii*, οι οποίοι αποτελούν τις ενδημικές μορφές της Ιβηρικής χερσονήσου και τέλος *L. europaeus*). Το παλαιότερο από αυτά τα είδη είναι το *L. europaeus*, ενώ τα είδη *L. granatensis* και *L. castroviejoii*, η ειδογένεση των οποίων πραγματοποιήθηκε στην Ιβηρική χερσόνησο, έχουν πιο πρόσφατη προέλευση, όπως χαρακτηριστικά υποστηρίζεται στη φυλογενετική μελέτη των Pérez-Suárez *et al.* (1994), που στηρίζεται σε δεδομένα μιτοχονδριακού DNA.

1.2.2 Μελέτες γενετικής διαφοροποίησης των Leporidae στην Ευρώπη

Η γνώση της γενετικής ποικιλότητας των ειδών λαγού που υπάρχουν στην Ευρώπη αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την κατανόηση της πληθυσμιακής δομής και δυναμικής των ειδών αυτών κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπρόσθετα, η συσσώρευση τέτοιου είδους πληροφορίας από συγγενικά είδη μπορεί να βοηθήσει στο ξεκαθάρισμα των αντιφατικών απόψεων για την ταξινομική του γένους στην Ευρώπη (Flux 1983, Angermann *et al.* 1990).

Παρόλο που τα είδη της οικογένειας Leporidae και ιδιαίτερα το είδος *L. europaeus* είναι αρκετά διαδεδομένο στην Ευρώπη, οι μελέτες που σχετίζονται με την πληθυσμιακή δομή μέσω μοριακών δεικτών, τόσο του είδους αυτού, όσο και της οικογένειας που το περιλαμβάνει, είναι περιορισμένες. Αναλυτικότερα, οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί περιλαμβάνουν μελέτες της διαφοροποίησης σε επίπεδο πρωτεϊνών και σε επίπεδο DNA. Οι μελέτες αυτές παρατίθενται αναλυτικά στον Πίνακα 2.

1.2.2.1 Αναλύσεις πρωτεϊνών

1) Αλλοένζυμα

Από μελέτη των Hartl *et al.* (1995) σε πληθυσμούς λαγών *Lepus europaeus* της Αυστρίας, βρέθηκε να υπάρχει μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ της κυμαινόμενης ασυμμετρίας (fluctuating asymmetry) και της ετεροζυγωτίας των αλλοενζύμων μόνο σε μεριστικούς χαρακτήρες του κρανίου και όχι σε χαρακτήρες συνεχούς κατανομής. Το γεγονός αυτό σύμφωνα με τους συγγραφείς είναι ενδεικτικό του ότι στους λαγούς του είδους αυτού, διαφορετικά μορφολογικά συστήματα επηρεάζονται σε διαφορετικό βαθμό από την αναπτυξιακή ομοιόσταση και κατά τη διάρκεια διαφορετικών καταστάσεων της ζωής τους. Η αναπτυξιακή ομοιόσταση θεωρείται ένδειξη της αρμοστικότητας ενός πληθυσμού. Το κατά πόσο όμως εξαρτάται η αναπτυξιακή ομοιόσταση από τη γενετική ποικιλότητα αποτελεί θέμα έντονης διαμάχης στον τομέα της εξελικτικής βιολογίας. Η αναπτυξιακή ομοιόσταση εκφράζεται με τη κυμαινόμενη μορφολογική ασυμμετρία, καθώς και με τη γενετική ποικιλομορφία (Suchentrunk *et al.* 1998).

Πίνακας 2: Μελέτες γενετικής διαφοροποίησης που έχουν πραγματοποιηθεί για την οικογένεια *Leporidae* στην Ευρώπη.

Μελέτες γενετικής διαφοροποίησης των <i>Leporidae</i> στην Ευρώπη		
Πρωτεΐνες	Αλλοένζυμα	Hartl <i>et al.</i> (1989, 1994, 1995), Suchentrunk <i>et al.</i> (1998, 2000, 2001)
	Πεπτιδάσες	Alves and Ferrand (1999), Alves <i>et al.</i> (2000)
	Άλλοι πρωτεϊνικοί τόποι	Hartl (1987, 1991), Hartl and Ferrand (1993), Hartl <i>et al.</i> (1990, 1992, 1993), Markowski <i>et al.</i> (1990)
MtDNA	RFLPs	Thulin <i>et al.</i> (1997), Branco <i>et al.</i> (2000), Mamuris <i>et al.</i> (2001)
	Γονιδιακοί τόποι	Pérez-Suárez <i>et al.</i> (1994), Pierpaoli <i>et al.</i> (1999)
NDNA	Μικροδορυφορικές αλληλουχίες	SurrIDGE <i>et al.</i> (1997, 1999), Andersson <i>et al.</i> (1999), Fickel <i>et al.</i> (1999)

Στη μελέτη των Suchentrunk *et al.* 1998, οι πληθυσμοί από την Αγγλία παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα ετεροζυγωτίας τα οποία διέφεραν σημαντικά από την ποικιλότητα που παρουσιάζουν οι γενετικές δεξαμενές των πληθυσμών της Αυστρίας στις μελέτες του Hartl και των συνεργατών του (1993, 1995). Αντιθέτως, η μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία δύο πληθυσμών της Αγγλίας υπερβαίνει τις ελάχιστες τιμές των Αυστριακών πληθυσμών, γεγονός που συμφωνεί με τις θεωρίες και τα πειραματικά δεδομένα πληθυσμών σπονδυλόζωων μετά από το πέρας μιας πληθυσμιακής στενωπού (Suchentrunk *et al.* 1998). Επιπλέον, γενετικά δεδομένα από πληθυσμούς της Αγγλίας και της Νέας Ζηλανδίας υποδεικνύουν τη στενή σχέση που υπάρχει μεταξύ των γενετικών δεξαμενών των πληθυσμών της Αγγλίας και της Νέας Ζηλανδίας με πληθυσμούς της κεντρικής Ευρώπης. Η κυρίαρχη διαφορά των πληθυσμών της Αγγλίας και της Νέας Ζηλανδίας με αυτούς της κεντρικής Ευρώπης έγκειται στην απώλεια πολλών αλληλομόρφων, τα οποία είναι παρόντα στους πληθυσμούς της κεντρικής Ευρώπης. Οι πληθυσμοί της Νέας Ζηλανδίας δεν παρουσιάζουν σημαντική απώλεια γενετικής ποικιλότητας σε σχέση με τους πληθυσμούς της Αγγλίας, από τους οποίους θεωρείται ότι προήλθαν. Αυτό που ίσως αληθεύει είναι η γενικότερη απώλεια γενετικής ποικιλότητας στους πληθυσμούς της Αγγλίας, σε αντίθεση με τη γενετική ποικιλότητα που παρατηρείται στους πληθυσμούς της Αυστρίας (Hartl *et al.* 1989, 1990, 1992, 1993, 1994). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τις υποθέσεις που έχουν διατυπωθεί για την εκ προθέσεως εισαγωγή λαγών στα Βρετανικά νησιά από τους Ρωμαίους αμέσως μετά το άνοιγμα του καναλιού και των διαχωρισμό των νησιών

αυτών από την ηπειρωτική περιοχή (Arnold 1993). Οι απελευθερώσεις εκείνης της εποχής μάλλον βασίστηκαν σε λίγα άτομα, τα οποία αποτέλεσαν και τον ιδρυτή όλων των πληθυσμών που παρουσιάζονται σήμερα στην Αγγλία. Επομένως, η στενωπός που μελετάται στην εργασία των Suchentrunk *et al.* (1998) πιθανότατα συνέβη πριν από 2.000 χρόνια. Εναλλακτικά, λαγοί με χαμηλά ποσοστά γενετικής ποικιλότητας θα μπορούσαν να έχουν εισβάλει στην Αγγλία πριν από το άνοιγμα του καναλιού μέσω της φυσικής γέφυρας που ένωνε τα Βρετανικά νησιά με τη σημερινή ηπειρωτική Ευρώπη πριν από περίπου 8.000 χρόνια (Suchentrunk *et al.* 1998).

Η μελέτη των Suchentrunk *et al.* (2000) αποκάλυψε ελαφρώς αυξημένη διαφοροποίηση σε αλλοένζυμα που μελετήθηκαν σε πληθυσμούς του Ευρωπαϊκού λαγού της Βουλγαρίας, σε σύγκριση με αυτή που παρατηρείται σε μεγαλύτερες περιοχές της κεντρικής Ευρώπης (Αυστρίας). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συμφωνούν με την υπόθεση ότι οι γενετικές δεξαμενές της κεντρικής Ευρώπης δέχθηκαν γονιδιακή ροή από περιοχές πέρα από την νοτιοανατολική Ευρώπη. Οι πληθυσμοί της Βουλγαρίας που εμφάνισαν χαμηλή συχνότητα ενός αλληλομόρφου, που δεν εμφανίζεται στους πληθυσμούς της κεντρικής Ευρώπης, εντοπίζονται στο νοτιοδυτικό άκρο της χώρας, μία περιοχή που συνδέεται άμεσα με τη Βόρεια Ελλάδα. Επομένως αυτή η παρέκκλιση μπορεί να είναι ενδεικτική περιορισμένης γενετικής ροής, η οποία λαμβάνει χώρα από τη Βόρεια Ελλάδα προς τη Βουλγαρία. Το χαμηλό επίπεδο γεωγραφικής διαμερισματοποίησης της γενετικής δεξαμενής των πληθυσμών του *L. europaeus* της Βουλγαρίας είναι σύμφωνο με τη μικρή γενετική διαφοροποίηση που παρατηρείται στους πληθυσμούς της κεντρικής Ευρώπης. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται μερικώς στις εντατικές μεταφορές λαγών (500-1000 λαγοί, δύο με τρεις φορές το χρόνο για τη δεκαετία 1970-1980, ιδιαίτερα από τις ανατολικές προς τις δυτικές περιοχές της Βουλγαρίας, Suchentrunk *et al.* 2000). Μελέτες των δεικτών εγκαθίδρυσης (F-statistics) δείχνουν ότι η κατανομή της γενετικής ποικιλότητας στις περιοχές της κεντρικής και νοτιοανατολικής Ευρώπης δεν επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από τις μεγάλες γεωγραφικές αποστάσεις. Το γεγονός αυτό είναι ενδεικτικό σημαντικού βαθμού γονιδιακής ροής μεταξύ μεγάλων γεωγραφικών αποστάσεων, γεγονός που παραπέμπει σε ένα μάλλον παμμικτικό δίκτυο τοπικών πληθυσμών. Παρά τη γενικότερη εικόνα υψηλού επιπέδου γονιδιακής ροής για μεγάλες γεωγραφικές αποστάσεις, υπάρχει ωστόσο μια τάση μικρής διαφοροποίησης των τοπικών γενετικών δεξαμενών των πληθυσμών της νοτιοανατολικής (Βουλγαρία) και κεντρικής (Αυστρία) Ευρώπης. Το γεγονός αυτό μπορεί εν μέρει να οφείλεται σε γονιδιακή ροή από άλλες περιοχές της νοτιοανατολικής Ευρώπης προς την κεντρική Ευρώπη (Suchentrunk *et al.* 2000).

Το κλίμα και η βλάστηση της Ευρώπης κατά τη διάρκεια της τελευταίας Παγετώδους περιόδου εμπόδιζαν την παρουσία του Ευρωπαϊκού λαγού στις κεντρικές και βόρειες περιοχές

της. Με τη βελτίωση του κλίματος και την επακόλουθη μεταβολή, κατά το Ανώτερο Πλειστόκαινο, της τούνδρας της κεντρικής Ευρώπης σε ενδιαιτήματα κατάλληλα για τον ευρωπαϊκό λαγό, άρχισε η επανεποίκηση του είδους αυτού από τις στέπες και τις θαμνώδεις εκτάσεις της ανατολικής και της νοτιοανατολικής Ευρώπης. Κατά την πορεία τους αυτή πιθανότατα να υπήρξαν απώλειες γενετικής ποικιλότητας (ιδιαίτερα με την έννοια απώλειας αριθμού αλληλομόρφων σε κάθε γενετικό τόπο), εξαιτίας των χαμηλών δραστικών μεγεθών των πληθυσμών που εισέβαλαν και εποίκισαν τις περιοχές της κεντρικής Ευρώπης (Suchentrunk *et al.* 2000).

II) Πεπτιδάσες

Για τα είδη *L. europaeus* και *L. granatensis*, που αποτελούν τους κύριους αντιπροσώπους του γένους στη δυτική Ευρώπη, οι γενετικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν ανιχνεύσει πολύ λίγους πολυμορφισμούς μέχρι σήμερα. Οι περισσότερες μελέτες έχουν διεξαχθεί για το *L. europaeus* και έως τώρα έχουν περιγραφεί 17 πολυμορφικοί γενετικοί τόποι οι οποίοι κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Hartl 1987, 1991, Hartl and Ferrand 1993, Hartl *et al.* 1990, 1992, 1993, Markowski *et al.* 1990, Suchentrunk *et al.* 2000).

Η μελέτη των Alves *et al.* (2000) παρουσιάζει τη γενετική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε δύο είδη του γένους *Lepus*, που ζουν στη δυτική Ευρώπη μέσω ανάλυση πρωτεϊνών του πλάσματος. Στην έρευνα αυτή πραγματοποιείται μελέτη γενετικού τόπου και πιο συγκεκριμένα μιας πεπτιδάσης (HBA) με την οποία μπορεί να γίνει διαχωρισμός των δύο παραπάνω ειδών. Ο διαχωρισμός αυτός οφείλεται στην ύπαρξη μοναδικών αλληλομόρφων στα δύο αυτά είδη. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι τα προϊόντα των διαφορετικών αλληλομόρφων για κάθε είδος, παρουσιάζουν παρόμοιο πρότυπο διαχωρισμού. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ταυτόσημης μοριακής βάσης της πεπτιδάσης αυτής για τα δύο είδη, παρουσιάζοντας έτσι μια περίπτωση προγονικού πολυμορφισμού.

Συμπερασματικά από τη μελέτη των Alves *et al.* (2000), αποκαλύπτεται υψηλότερο επίπεδο γενετικής ποικιλότητας στον ιβηρικό λαγό από αυτό που παρατηρείται στον ευρωπαϊκό λαγό των περιοχών της κεντρικής Ευρώπης. Ωστόσο η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι πληθυσμοί του Ευρωπαϊκού λαγού που αναλύθηκαν προέρχονται από πληθυσμούς της Γαλλίας και της Αυστρίας που βρίσκονται σε κατάσταση αιχμαλωσίας οι οποίοι μπορεί να έχουν υποστεί σε σημαντικό βαθμό την επίδραση του ιδρυτικού φαινομένου. Υψηλό επίπεδο γενετικής διαφοροποίησης ανιχνεύθηκε, μεταξύ των δύο αυτών ειδών, το οποίο εκφράζεται με τις μεγάλες διαφορές που παρατηρούνται στις συχνότητες των αλληλομόρφων, καθώς και από κάποια ατομικά αλληλόμορφα και τέλος από έναν διαγνωστικό για το κάθε είδος γενετικό τόπο.

Χαμηλά επίπεδα γενετικής διαφοροποίησης παρατηρήθηκαν σε πληθυσμούς της Πορτογαλίας σε σχέση με αντίστοιχες παρατηρήσεις του *Lepus europaeus* της κεντρικής Ευρώπης (Hartl *et al.* 1990, 1992, 1993, Suchentrunk *et al.* 2000). Το χαμηλό επίπεδο πληθυσμιακής δομής που παρατηρείται είναι ενδεικτικό της χαμηλής επίδρασης της γεωγραφικής απόστασης στην κατανομή της γενετικής διαφοροποίησης, ενώ καθιστά σχεδόν βέβαιη την επικοινωνία μεταξύ των πληθυσμών της Πορτογαλίας του είδους *Lepus granatensis*. Τα δεδομένα γονιδιακής διαφοροποίησης και πιο συγκεκριμένα ο υψηλός αριθμός των αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο και η χαμηλή γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών αποτελούν στοιχεία ότι οι πληθυσμοί του είδους *Lepus granatensis* δεν έχουν υποστεί σοβαρές και μακροχρόνιες μειώσεις του πληθυσμιακού τους μεγέθους (γενετικοί στενωποί). Δεδομένα από ένζυμα πληθυσμών λαγού από τις περιοχές επαφής των δύο ειδών (*Lepus granatensis*-*Lepus europaeus* της Ιβηρικής χερσονήσου), αποκαλύπτουν την ύπαρξη ισχυρής γενετικής απομόνωσης των ειδών αυτών, αλλά δεν αποκλείουν την πιθανότητα ανταλλαγής γενετικού υλικού σε χαμηλά επίπεδα (Bonhomme *et al.* 1986, Alves and Ferrand 1999).

1.2.2.2 Αναλύσεις γενετικού υλικού (DNA)

Δ)Μιτοχονδριακό DNA

Οι Pérez-Suárez *et al.* (1994) παρατήρησαν μεγάλη ενδοειδική διαφοροποίηση στο mtDNA του *Lepus europaeus* από τη βόρεια Ισπανία, γεγονός που μπορεί να είναι ενδεικτικό δύο διαφορετικών μεταναστευτικών κυμάτων του ευρωπαϊκού λαγού στην Ιβηρική χερσόνησο.

Οι Thulin *et al.* (1997) ανέλυσαν τους πολυμορφισμούς των μεγεθών περιοριστικών θραυσμάτων του mtDNA σε πληθυσμούς της Σουηδίας στα είδη *L. europaeus* και *L. timidus*, που βρίσκονται τόσο σε συμπάτρια όσο και σε αλλοπάτρια κατάσταση. Η απόκλιση των αλληλουχιών του mtDNA μεταξύ των δύο αυτών ειδών έφτανε το 8%. Μια τέτοιου είδους διαφοροποίηση αν και υψηλή, θεωρείται σχετικά φυσιολογική μεταξύ ειδών θηλαστικών του ίδιου γένους (Tegelström *et al.* 1988, Martin and Palumbi 1993). Υπολογίζοντας έναν ρυθμό απόκλισης του mtDNA 2-4%/εκ. χρόνια (Brown *et al.* 1979, Martin and Palumbi 1993), ο εκτιμώμενος χρόνος απόκλισης του *Lepus europaeus* από τον *Lepus timidus* είναι περίπου 2-4 εκ. χρόνια.

Όσον αφορά τον *L. europaeus*, η διαφοροποίηση που ανιχνεύθηκε μεταξύ των απλοτύπων ήταν χαμηλή και κυμαινόταν από 0.09 έως 0.38%. Αιτία αυτού θεωρείται το γεγονός ότι οι πληθυσμοί του *L. europaeus* στις Σκανδιναβικές χώρες εισήχθησαν από διάφορες περιοχές της κεντρικής και βόρειας Ευρώπης, στις οποίες παρατηρείται χαμηλό επίπεδο ποικιλότητας

όσον αφορά το mtDNA (Thulin *et al.* 1997). Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από την έρευνα των Hartl *et al.* (1993), στην οποία βρέθηκε χαμηλή διαφοροποίηση, τόσο του mtDNA όσο και των αλλοενζύμων, σε πληθυσμούς *Lepus europaeus* που μελετήθηκαν από περιοχές της Αυστρίας.

Σε καταστάσεις αιχμαλωσίας έχει παρατηρηθεί ότι τα θηλυκά άτομα του είδους *L. timidus* ζευγαρώνουν αυθόρμητα με τα αρσενικά άτομα του είδους *L. europaeus* και παράγουν βιώσιμους απογόνους. Τα αποτελέσματα της έρευνας των Thulin *et al.* (1997) παρέχουν ενδείξεις για τον υβριδισμό των ειδών *L. europaeus* και *L. timidus* στη φύση, γεγονός που ήδη έχει παρατηρηθεί για τα δύο αυτά είδη σε κατάσταση αιχμαλωσίας. Η μονόδρομη μεταβίβαση του mtDNA από το είδος *L. timidus* στο είδος *L. europaeus* συμπεραίνεται από το ασύμμετρο πρότυπο ζευγαρώματος, που παρατηρείται για τα είδη αυτά σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Η συνεχής ασύμμετρη μεταβίβαση mtDNA κατά τη διάρκεια του χρόνου θα δημιουργούσε διείσδυση απλοτύπων του *L. timidus* σε αυτούς του *L. europaeus*. Ο ασυνήθιστα υψηλός βαθμός ενδοειδικής ποικιλότητας του mtDNA του είδους *L. europaeus* στην περιοχή της Ιβηρικής χερσονήσου, που περιγράφουν οι Pérez-Suárez *et al.* (1994), αποτελεί ακόμα μια ένδειξη την ύπαρξης μιας τέτοιας ανάμειξης mtDNA.

Σύμφωνα με τη μελέτη των Pierpaoli *et al.* (1999), ο *Lepus corsicanus* αποτελεί ξεχωριστό είδος, γεγονός που μπορεί να διακριθεί τόσο από μορφολογικούς όσο και από μοριακούς χαρακτήρες (περιοχή ελέγχου του mtDNA και κυτόχρωμα β). Εμφανίζεται να είναι απομονωμένος αναπαραγωγικά και προφανώς να μην υβριδίζεται με συμπατριους πληθυσμούς ευρωπαϊκού λαγού. Οι φυλογενετικές αναλύσεις παρουσιάζουν τα είδη αυτά (*L. corsicanus* και *L. europaeus*) να ανήκουν σε ξεχωριστές φυλογενετικές γραμμές οι οποίες εποίκησαν τη δυτική Ευρώπη σε διαφορετικές χρονικές περιόδους του Πλειστοκαίνου. Οι Ιταλικοί λαγοί παρουσιάζουν φυλογεωγραφική δομή, φαινόμενο το οποίο δεν παρατηρείται στον ευρωπαϊκό λαγό (της κεντρικής και βόρειας Ευρώπης) καθώς και στον ορεσίβιο λαγό, που πιθανά οφείλεται στη δημογραφική ιστορία του είδους κατά το Πλειστόκαινο.

II) Πυρηνικό DNA (Μικροδορυφορικές αλληλουχίες)

Σύμφωνα με τους Andersson *et al.* (1999), οι οποίοι μελέτησαν με τη βοήθεια 5 μικροδορυφορικών δεικτών τον υβριδισμό που παρατηρείται μεταξύ του είδους *Lepus europaeus* και του είδους *Lepus timidus* στη Σουηδία, δεν είναι δυνατός ο διαχωρισμός των υβριδίων που παράγουν.

Οι Fickel *et al.* (1999) μελέτησαν γενετική ποικιλότητα και δομή δύο πληθυσμών του *L. europaeus* από περιοχή της Γερμανίας (Westphalia). Για τις αναλύσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν

4 μικροδορυφορικοί γενετικοί τόποι, καθώς και η περιοχή ελέγχου (control region) του μιτοχονδριακού DNA. Σύμφωνα με την κατανομή των απλοτύπων και οι δύο πληθυσμοί εμφανίζονται να είναι γενετικά δομημένοι και να διαφέρουν σημαντικά ο ένας από τον άλλο, ενώ η παρατηρούμενη μητρική γονιδιακή ροή είναι πολύ περιορισμένη. Η κατανομή των αλληλομόρφων των μικροδορυφορικών τόπων δεν μπόρεσε να αναδείξει κάποιες διαφορές μεταξύ των ομάδων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι ενώ το mtDNA χαρακτηρίζεται από μητρική κληρονομικότητα, το μικροδορυφορικό DNA, κληρονομείται τόσο μητρικά όσο και πατρικά σε ίσες αναλογίες. Αφού τα θηλυκά άτομα είναι αποκλεισμένα από τη γονιδιακή ροή, η οποία καθορίζει και την κατανομή των απλοτύπων, συμπεράναν ότι μόνο τα αρσενικά άτομα είναι υπεύθυνα για την ανταλλαγή αλληλομόρφων μικροδορυφορικών τόπων μεταξύ των δύο υποπληθυσμών. Τα αίτια μιας τέτοιας κατάστασης μπορεί να είναι από τη μια πλευρά η υψηλή φιλοπατρική συμπεριφορά των θηλυκών ατόμων, και από την άλλη πλευρά ο υψηλότερος βαθμός διασποράς ή η μεγαλύτερη χωροκράτεια (home range) των αρσενικών ατόμων.

1.2.2.3 Τι έχει γίνει στην Ελλάδα

Στον ελληνικό χώρο έχουν πραγματοποιηθεί δύο μόνο γενετικές μελέτες που θα μπορούσαν να παρέχουν πληροφορία σχετική με την τη διατήρηση και διαχείριση των πληθυσμών του λαγού καθώς και την φυλογενετική τους κατάσταση. Η εργασία των **Mamuris *et al.* (2001)**, έχει ως θέμα την μελέτη της γενετικής δομής των πληθυσμών της κεντρικής Ελλάδας και τις εφαρμογές των αποτελεσμάτων αυτών στη διαχείριση. Στόχοι της μελέτης αυτής ήταν ο έλεγχος της φυλογενετικής κατάστασης των αυτόχθονων πληθυσμών λαγού, το επίπεδο της γενετικής διαφοροποίησης, τόσο εντός όσο και μεταξύ των πληθυσμών που μελετήθηκαν και τέλος η διερεύνηση της γενετικής επίδρασης της απελευθέρωσης εκτρεφόμενων ατόμων στους φυσικούς πληθυσμούς. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν η RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms: πολυμορφισμοί μήκους των θραυσμάτων του μιτοχονδριακού DNA μετά από πέψη του με περιοριστικές ενδονουκλεάσες). Η ανάλυση των δεδομένων αποκάλυψε εκτεταμένη ποικιλότητα απλοτύπων μέσα και μεταξύ των πληθυσμών που μελετήθηκαν. Η ποικιλότητα των απλοτύπων ήταν ισότιμα κατανομημένη μέσα και μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών, ενώ ήταν εμφανής η σημαντικού βαθμού γενετική δομή από την ετερογένεια των συχνοτήτων των απλοτύπων μεταξύ των περιοχών δειγματοληψίας. Τα εκτρεφόμενα άτομα, που είχαν απελευθερωθεί στο παρελθόν και συλλέχθηκαν στους υπό μελέτη άγριους πληθυσμούς, εμφάνισαν ειδικά πρότυπα του mtDNA που τα διαφοροποίησαν σαφέστατα από τα άγρια άτομα. Η ανάλυση του mtDNA είναι ενδεικτική της εισβολής αλλόχθονων γενετικών δεξαμενών στους τοπικούς πληθυσμούς. Στην εργασία τους αυτή, οι συγγραφείς προτείνουν την παύση των

ενεργειών απελευθέρωσης εκτρεφόμενων ατόμων στη φύση με προϋπόθεση την προσαρμογή κατάλληλων διαχειριστικών πρακτικών στη δυναμική των τοπικών πληθυσμών, ώστε να επιτευχθεί διατήρηση των αυτόχθονων γονότυπων και να παρεμποδιστεί η απώλεια της γενετικής τους ποικιλότητας.

Η μέση ανά ζεύγη διαφοροποίηση των απλότυπων για τους πληθυσμούς της ίδιας εργασίας έφτανε το 2%. Η τιμή αυτή είναι περίπου πέντε φορές μεγαλύτερη από την υψηλότερη τιμή (0.38%), η οποία παρατηρήθηκε σε πληθυσμούς του είδους αυτού της Σκανδιναβίας και σχεδόν δύο φορές υψηλότερη από τη μέση τιμή πληθυσμών της Ιταλίας (1.3%) (Pierpaoli *et al.* 1999). Είναι όμως τρεις φορές μικρότερη από τη μέση τιμή διαφοροποίησης που παρατηρείται σε πληθυσμούς του είδους της Ιβηρικής χερσονήσου (Pérez-Suárez *et al.* 1994). Εμπίπτει όμως στο εύρος διαφοροποιήσεων που παρατηρούνται για άλλα είδη ευρέως διαδεδομένων θηλαστικών (όπως η νυχτερίδα *Macroderma gigas*: 2.56-7.37%) (Worthington-Wilmer *et al.* 1994).

Στα πλαίσια της μελέτης του Ευρωπαϊκού λαγού στη χώρα μας έλαβε χώρα μια αρκετά ενδιαφέρουσα μελέτη, τα δεδομένα της οποίας έχουν υποβληθεί προς δημοσίευση από τους Kasapidis *et al.* και έχει ως θέμα τα φυλογεωγραφικά πρότυπα που παρουσιάζονται με αναλύσεις του μιτοχονδριακού DNA του *Lepus europaeus*, κάτω από την επίδραση τόσο των κλιματικών διακυμάνσεων του Ανώτερου Πλειστοκαίνου, όσο και των μετακινήσεων του εξαιτίας ανθρωπογενών επιδράσεων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, παρουσιάζονται δύο τύποι μιτοχονδριακού DNA με μέση νουκλεοτιδική απόσταση 6.4% που αντιστοιχούν σε έναν «δυτικό τύπο» και έναν «ανατολικό τύπο». Στον «δυτικό τύπο» περιλαμβάνονται απλότυποι από την ηπειρωτική Ελλάδα, τη Λευκάδα, τη Νάξο, τα Κύθηρα και την Κρήτη. Αντίθετα, στον «ανατολικό τύπο» περιλαμβάνονται απλότυποι από την ανατολική Μακεδονία και τη Θράκη, τα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου Λέσβος, Χίος, Σάμος και Ρόδος και τέλος και από την Κύπρο. Επιπρόσθετα, οι απλότυποι της Βουλγαρίας, της Γερμανίας, της Ιταλίας της Σερβίας, της Ρουμανίας και της Αυστρίας εντοπίζονταν στην ομάδα των δυτικών απλότυπων. Αντίθετα απλότυποι του Ισραήλ περιλαμβάνονται στον «ανατολικό τύπο». Οι δύο απλότυποι εμφανίζουν μια ζώνη επικάλυψης στην περιοχή της Θράκης και της Βουλγαρίας.

1.2.2.4 Συμπεράσματα επί των γενετικών μελετών του *L. europaeus*

Σε γενικές γραμμές, βάσει των προαναφερθείσων μελετών, γίνεται κατανοητό ότι οι γενετικές μελέτες, που έχουν πραγματοποιηθεί για τους πληθυσμούς του *L. europaeus* και οι οποίες βασίζονται στα αλλοένζυμα δεν έχουν αποκαλύψει ουσιαστικές βιοχημικές γενετικές διαφορές μεταξύ των ατόμων από διάφορα σημεία της Ευρώπης (Hartl *et al.* 1993, Suchentrunk *et al.* 2000). Από την άλλη πλευρά, μελέτες του mtDNA με τη χρήση πολυμορφισμών

περιοριστικών θραυσμάτων (RFLPs) ή άμεση αλληλούχηση τμημάτων του mtDNA δείχνουν διαφορετικά επίπεδα γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών για ολόκληρη την Ευρώπη (Hartl *et al.* 1993, Pérez-Suárez *et al.* 1994, Thulin *et al.* 1997, Pierpaoli *et al.* 1999), χωρίς όμως να είναι δυνατή η εξαγωγή φυλογενετικών συμπερασμάτων από τα δεδομένα που προκύπτουν. Πιο αναλυτικά οι ευρωπαϊκοί λαγοί της Ιταλικής χερσονήσου για το μεγαλύτερο τμήμα της περιοχής ελέγχου του mtDNA ήταν πρακτικά αδύνατο να διαχωριστούν από πληθυσμούς της κεντρικής Ευρώπης και για αυτό δόθηκε η ερμηνεία ότι προέκυψαν από λαγούς που είχαν πρόσφατα εισαχθεί στη χώρα. Τέλος, η ανάλυση μικροδορυφορικών αλληλουχιών σε πληθυσμούς της κεντρικής Ευρώπης (Γερμανία, Fickel *et al.* 1999) δεν θεωρήθηκαν κατάλληλοι δείκτες διαχωρισμού των υπό μελέτη πληθυσμών.

1.3 Μοριακοί Δείκτες

1.3.1 Γενικά Στοιχεία

Η προσέγγιση θεμάτων, που αφορούν ερωτήματα βιογεωγραφικών κατανομών, βιοϊστορικών γεγονότων, φυλογεωγραφίας και γενετικής δομής διαφόρων ταξινομικών ομάδων γίνεται μέσω ενός πολυπαραγοντικού συστήματος συλλογής, ανάλυσης και επεξεργασίας δεδομένων.

Η μελέτη των μορφολογικών χαρακτήρων δεν μπορεί από μόνη της να προσφέρει αξιόπιστη εκτίμηση των φυλογενετικών, βιογεωγραφικών και γενετικών σχέσεων διαφόρων ειδών και πληθυσμών. Οι μορφολογικοί χαρακτήρες παρουσιάζουν μια σειρά μειονεκτημάτων, όπως εξάρτηση από το φύλο, την ηλικία, τη φυσιολογία του οργανισμού, αλλά και την ποικιλότητα που σε μεγάλο βαθμό μπορεί να οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Για τους λόγους αυτούς οι ερευνητές στράφηκαν προς τη χρήση βιοχημικών και μοριακών δεικτών που κληρονομούνται με απλό τρόπο, αποτελούν μόνιμο χαρακτηριστικό των ατόμων και εμπεριέχουν γενετική ποικιλότητα, που δεν θα μπορούσε να αποκαλυφθεί μόνο με τη μελέτη μορφολογικών χαρακτήρων.

Από τα μέσα της δεκαετίας του 1960 και μετά χρησιμοποιήθηκε ευρέως η μελέτη των αλλοενζύμων (δηλαδή των ηλεκτροφορητικών προτύπων διαφόρων ενζύμων), που αποκάλυψε μια εκτεταμένη γενετική ποικιλότητα μεταξύ φυσικών πληθυσμών (Futuyma 1991). Τα αλλοένζυμα όμως παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα αφού λίγα είναι αυτά που παρουσιάζουν πολυμορφισμό, ενώ παράλληλα διαφορετικά είδη ενζύμων εμφανίζουν την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Η ανακάλυψη νέων μοριακών τεχνικών οδήγησε στην τους επιστήμονες που ασχολούνται με τη μελέτη των εξελικτικών διαδικασιών στο θεμέλιο λίθο της ζωής, το DNA. Η δυνατότητα εκτίμησης της απόκλισης νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταξύ ατόμων, πληθυσμών, ειδών ή ανώτερων ταξινομικών βαθμίδων, αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα για τις μελέτες της εξελικτικής και συστηματικής βιολογίας (Harrison 1989).

Για την εκτίμηση της νουκλεοτιδικής απόκλισης του DNA έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι, που ποικίλουν ως προς το είδος της πληροφορίας που παρέχουν και ως προς το τμήμα του γονιδιώματος που εξετάζουν. Η λιγότερο πληροφοριακή, αλλά και ταυτόχρονα λιγότερο επίπονη θεωρείται η μέθοδος της υβριδοποίησης DNA-DNA που παρέχει μόνο μια απλή εκτίμηση της μέσης απόστασης των γονιδιωμάτων από διαφορετικά είδη. Οι πολυμορφισμοί στα μήκη περιοριστικών θραυσμάτων (RFLPs) και της σύγκρισης των περιοριστικών χαρτών είναι περισσότερο πληροφοριακές και ταυτόχρονα αρκετά εύκολες στην εφαρμογή τους. Για το λόγο αυτό προτιμούνται σε πολλές μελέτες. Οι πλέον πληροφοριακές, αλλά ταυτόχρονα πιο δαπανηρές είναι οι αναλύσεις της πρωτοταγούς δομής του DNA, καθώς και οι αναλύσεις των

πολυμορφισμών των αλληλομόρφων που μπορούν να παρατηρηθούν σε μικροδορυφορικούς τόπους. Οι παραπάνω αναλύσεις αποκαλύπτουν το μέγιστο ποσοστό πληροφορίας, που μπορεί να αντληθεί κατά τη διάρκεια μιας μελέτης της γενετικής δομής και ποικιλομορφίας ενός πληθυσμού ή των γενετικών σχέσεων των πληθυσμών μεταξύ τους, λόγω της υψηλής διακριτικής ικανότητας και της εύκολης ερμηνείας των αποτελεσμάτων.

1.3.1.1 Τι είναι οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες

Την τελευταία δεκαετία αναπτύχθηκε μια καινούργια κατηγορία μοριακών σημαντών που έχουν να κάνουν με το δορυφορικό DNA που βρίσκεται στο γονιδίωμα των οργανισμών. Το 1985 ο Jeffreys χρησιμοποίησε το όρο “αποτύπωση του DNA” (DNA fingerprinting, “γενετική αποτύπωση” σαν ο πιο δόκιμος ελληνικός όρος) για να περιγράψει το πρότυπο των ιδιαίτερα πολυμορφικών, ξεχωριστών για κάθε άτομο, ζωνών που ανίχνευε στο πυρηνικό DNA του ανθρώπου κατόπιν υβριδοποίησης με κατάλληλο ανιχνευτή (Jeffreys *et al.* 1985a, b). Η χρήση της γενετικής αποτύπωσης βασίζεται στη δυνατότητα ανίχνευσης πολλαπλών αντιγράφων, μεταβλητού αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR) στο γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών. Οι αλληλουχίες που χαρακτηρίζονται από αυτές τις επαναλήψεις διακρίθηκαν σε δυο κατηγορίες: τις μίνι- και το μικρο- δορυφορικές αλληλουχίες. Οι **μινιδορυφορικές αλληλουχίες** χαρακτηρίζονται από την επανάληψη 9-65 ζευγών βάσεων (bp), είναι συχνά πλούσιες σε γουανίνη (G-rich) και τα αλληλόμορφα τους μπορεί να ποικίλλουν σε μέγεθος μέχρι και 25 kbp (Wright 1992). Αντίθετα οι **μικροδορυφορικές αλληλουχίες** χαρακτηρίζονται από επαναλήψεις μονο-, δι-, τρι- και τετρα-νουκλεοτιδίων (Wright 1992). Εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους, τα μικροδορυφορικά μπορούν να πολλαπλασιαστούν με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR Polymerase Chain Reaction) χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο ελάχιστη ποσότητα DNA (Tautz 1989, Litt & Luty 1989, Weber & May 1989, Love *et al.* 1990). Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού που οφείλονται στον μεγάλο ρυθμό μετάλλαξης, που εκτιμάται στο 10^{-2} έως 10^{-5} ανά γενετικό τόπο / γαμέτη / γενιά (Dallas 1992, Edwards *et al.* 1992, Weber & Wong 1993). Η απλότητα και η ταχύτητα της ανάλυσης, καθώς και τα υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού του μικροδορυφορικού DNA, το έκαναν ιδιαίτερα δημοφιλές στην πληθυσμιακή ανάλυση (Slatkin 1995, Goldstein *et al.* 1995).

Τα μικροδορυφορικά έχουν χρησιμοποιηθεί σε πληθυσμιακές ή άλλες μελέτες διαφόρων **θηλαστικών**, όπως ο άνθρωπος (Hamada & Kakunaga 1982, Hamada *et al.* 1982, Weber & May 1989, Edwards *et al.* 1991, Beckmann & Weber 1992, Deka *et al.* 1995), το ποντίκι (Stallings *et al.* 1991, Dietrich *et al.* 1992), ο χοίρος (Johansson *et al.* 1992), ο λύκος (Roy *et al.* 1994),

διαφόρων **ψαριών**, όπως ο βακαλάος (Brooker *et al.* 1994), ο σολομός (McConnell *et al.* 1995), η καφέ πέστροφα (Estoup *et al.* 1993a), το λαβράκι (Garcia de Leon *et al.* 1995) και το γατόψαρο (Galbusera *et al.* 1996), το zebrafish (Goff *et al.* 1992) ή άλλων υδρόβιων οργανισμών όπως η γαρίδα (Wolfus *et al.* 1997) και η χελώνα (FitzSimmons *et al.* 1995) καθώς επίσης και **εντόμων**, όπως η *Drosophila* (Tautz & Renz 1984, Pardue *et al.* 1987) και η μέλισσα (Estoup *et al.* 1993b) και **φυτών**, όπως η σόγια (Akkaya *et al.* 1992, Condit & Hubbell 1991).

Η χρήση, όμως, των μικροδορυφορικών αλληλουχιών δεν εξαντλείται στα παραπάνω. Ένας άλλος τομέας, ο οποίος έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερα στα χερσαία αγροτικά ζώα αλλά και σε άλλα είδη, όπως ο άνθρωπος ή τα έντομα είναι η χαρτογράφηση του γονιδιώματος με τη χρήση των μικροδορυφορικών. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η ανίχνευση και παρακολούθηση σημαντικών γονιδίων που ευθύνονται για συγκεκριμένες ασθένειες ή λειτουργίες γεικότερα (Richards & Sutherland 1992a,b, Brook *et al.* 1992, Buxton *et al.* 1992, Tsilfidis *et al.* 1992). Μια άλλη, εξίσου σημαντική, εφαρμογή της χαρτογράφησης είναι η βασιζόμενη σε σημαντές επιλογή (marker-based ή marker-assisted selection) σύμφωνα με την οποία μπορούμε να ανιχνεύσουμε γονίδια που συμβάλλουν στη δημιουργία της γενετικής παραλλακτικότητας ενός ποσοτικού χαρακτήρα, πχ. του βάρους, και να εντοπιστεί εκείνο το αλληλόμορφο που έχει τη μέγιστη επίδραση στον υπό μελέτη χαρακτήρα (Lander & Botstein 1989, Georges *et al.* 1990, Zhang & Smith 1992, Knott & Haley 1992, Crawford *et al.* 1994, Xu & Atchley 1995, Keightley *et al.* 1996, Falconer & Mackay 1996, Hoeschele *et al.* 1997, Hospital & Charcosset 1997, Whittaker *et al.* 1997).

1.3.2 Στάδια προετοιμασίας και μελέτης μικροδορυφορικών αλληλουχιών

Τα στάδια προετοιμασίας και μελέτης του DNA σε γενικές γραμμές, είναι τα ακόλουθα:

1.3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Στις διαδικασίες ανάλυσης σύγχρονου DNA απαιτείται καταστροφή μικρού τμήματος του δείγματος από το οποίο προέρχεται το DNA. Γενικά, η ποσότητα υλικού που απαιτείται για εξαγωγή DNA είναι μικρή (0,1-1 gr. μαλακού ιστού). Από ένα εσωτερικό τμήμα του δείγματος λαμβάνονται 0,1 έως 1 γραμμάρια ιστού και τοποθετούνται σε ένα αποστειρωμένο τρυβλίο petri. Εν συνεχεία, με τη βοήθεια μιας χειρουργικής λεπίδας τεμαχίζεται σε μικρότερα κομμάτια. Πολλές φορές, για την διευκόλυνση του τεμαχισμού, τα δείγματα ψύχονται με υγρό άζωτο. Το τεμαχισμένο δείγμα τοποθετείται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα για περαιτέρω επεξεργασία ή αποθηκεύονται σε αποστειρωμένα δοχεία στους -20°C .

1.3.2.2 Εξαγωγή του DNA

Η διαδικασία της εξαγωγής του DNA αρχίζει με το σπάσιμο των κυττάρων για να απελευθερωθούν τα νουκλεϊκά οξέα, ενώ ταυτόχρονα προκαλείται καθαρισμός του από πρωτεΐνες και άλλα συστατικά, που μπορεί να συνεξαχθούν με τα νουκλεϊκά οξέα και να λειτουργήσουν ως αναστολείς για τον πολλαπλασιασμό των πρώτων κατά τη διάρκεια των μετέπειτα σταδίων.

1.3.2.3 Ποσοτικοποίηση του DNA

Η ποσοτικοποίηση είναι η διαδικασία που πραγματοποιείται για την εύρεση της ποσότητας του DNA που εξήχθη από το δείγμα. Η συγκέντρωση του απομονωμένου DNA υπολογίζεται είτε από τα μεγέθη των ζωνών αυτού σε πήκτωμα μετά από ηλεκτροφόρηση είτε διαβάζοντας το φάσμα απορρόφησής του, γνωρίζοντας ότι το δίκλωνο μόριο του DNA απορροφά στα 260nm.

1.3.2.4 Γονοτύπηση

1.3.2.4.1 Πολλαπλασιασμός του DNA

Η πλέον χρησιμοποιούμενη σήμερα μέθοδος είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (**Polymerase Chain Reaction, PCR**), η ανακάλυψη της οποίας (στα μέσα της δεκαετίας του '80) άλλαξε δραματικά τον τρόπο ανάκτησης μοριακών δεδομένων, χαρίζοντας το βραβείο Νόμπελ Χημείας στον Kary Mullis το 1993 (Saiki *et al.* 1985, Mullis and Fallona 1987, Saiki *et al.* 1988). Η τεχνική αυτή ξεπέρασε τα προβλήματα που αναπτύσσονται κατά την διάρκεια των μέχρι τότε τεχνικών για τον πολλαπλασιασμό του DNA, καθώς πολλαπλασιάζει τεμάχια DNA και τα καθιστά έτοιμα για ανάλυση της αλληλουχίας τους ακόμα και αν αυτά τα τεμάχια βρίσκονται σε απειροελάχιστες ποσότητες. Είναι χαρακτηριστικό ότι με μία αντίδραση PCR των 100 μ l παράγονται τόσα μόρια DNA που αν τα διαλύσουμε σε μία πισίνα Ολυμπιακών διαστάσεων, σε κάθε 100 μ l νερού της πισίνας θα περιέχονται περίπου 400 αντίγραφα του DNA (Kwock & Higuchi 1989). Επιπλέον, ο υπό μελέτη γενετικός τόπος μπορεί να «στοχευτεί» απ' ευθείας, αποφεύγοντας τη μονότονη, χρονοβόρα και πολλές φορές άκαρπη εξέταση της γενωμικής βιβλιοθήκης του κλώνου (Brown & Brown 1994).

Η μόνη δυσκολία με την PCR είναι ότι η αντίδραση πρέπει να ξεκινήσει με δύο μικρά μόρια DNA (20 – 30 νουκλεοτίδια σε μήκος), των οποίων οι αλληλουχίες πρέπει να είναι συμπληρωματικές με αντίστοιχες των τεμαχίων DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστούν. Οι μικρές αυτές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες είναι γνωστές ως εκκινήτες (primers). Εάν η νουκλεοτιδική ακολουθία είναι τελείως άγνωστη, η PCR είναι θεωρητικά αδύνατη.

Σε γενικές γραμμές το DNA το οποίο εξάγεται από τους οργανισμούς και ένα ένζυμο (πολυμεράση) (συνήθως *Taq* πολυμεράση) προσθέτονται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα που είναι γνωστό ως ρυθμιστικό διάλυμα. Το διάλυμα αυτό εμπεριέχει τους ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές, τα νουκλεοτίδια (dNTPs) και μαγνήσιο. Η σύσταση του διαλύματος της αντίδρασης μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με την χλωριούχο εμπορική παραγωγή του ενζύμου ή της μεθόδου εξαγωγής που χρησιμοποιήθηκε. Το μίγμα της αντίδρασης γίνεται κατόπιν το αντικείμενο των τριών βημάτων της διαδικασίας του πολλαπλασιασμού (*O'Rourke et al. 1996*), που είναι

A) αποδιάταξη

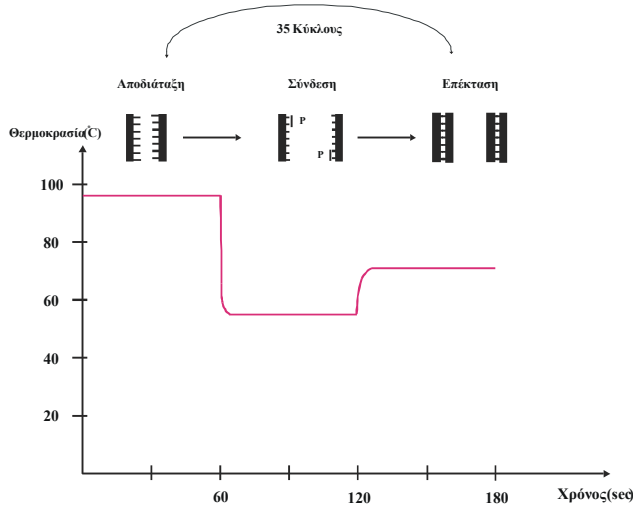
B) σύνδεση

Γ) επέκταση

Η θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα κάθε βήμα της PCR, ειδικά της επέκτασης καθορίζεται από την τιμή T_M των εκκινητών.

Οι δύο ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες του DNA (εκκινητές) είναι κατάλληλα σχεδιασμένες να είναι συμπληρωματικές, όσον αφορά τις βάσεις των νουκλεοτιδίων, με τμήματα του DNA στόχου. Το DNA μήτρα πρέπει πρώτα να αποδιαταχθεί με θέρμανση, παρουσία μεγάλης περίσσειας των εκκινητών και των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (dNTPs). Το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται κατόπιν μέχρι τη θερμοκρασία που επιτρέπει την υβριδοποίηση των εκκινητών με το DNA στόχο. Η πρώτη αλληλουχία προσδένεται στο ένα άκρο της μίας αλυσίδας του μορίου του DNA και η δεύτερη στο άλλο άκρο της άλλης αλυσίδας του μορίου του DNA. Κατόπιν με την προσθήκη της πολυμεράσης του DNA αρχίζει η επιμήκυνση των ολιγονουκλεοτιδίων με τη προσθήκη των δεοξυνουκλεοτιδίων στις αντίστοιχες θέσεις, μέχρις ότου παραχθεί ένα πλήρες αντίγραφο του αρχικού μορίου του DNA (στόχος) (**Εικόνα 3**).

Με την ολοκλήρωση αυτής της διαδικασίας διαθέτουμε δύο πιστά αντίγραφα του αρχικού μορίου του DNA, τα οποία όμως είναι συνδεδεμένα στο επίπεδο των εκκινητών. Για το λόγο αυτό θερμαίνουμε το διάλυμα, ώστε να αποσυνδεθούν. Αφού αποσυνδεθούν, οι εκκινητές επαναπροσδένονται σε καθένα από τα δύο νέα αντίγραφα του DNA, με σκοπό να επαναληφθεί η προηγούμενη διαδικασία. Με τον τρόπο αυτό και συγκεκριμένα με συνεχείς επαναλήψεις της διαδικασίας που περιγράφηκε παραπάνω, μπορούν να παράγονται συνεχώς αντίγραφα του αρχικού μορίου του DNA, μέχρις ότου αποκτηθεί η επιθυμητή ποσότητα του DNA, που απαιτεί η μελέτη που θα ακολουθήσει.



Εικόνα 3: Απεικόνιση της αρχής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού (PCR) παρουσιάζοντας ένα θερμικό προφίλ κατά τη διάρκεια ενός κύκλου από [Yang 1997](#).

Όμως, αν και είναι πολύ αποδοτικός ο εκθετικός πολλαπλασιασμός των αλληλουχιών στόχων, δεν είναι μια απεριόριστη διαδικασία. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες το ποσό της πολυμεράσης *Taq* γίνεται περιοριστικό μετά από 25-40 κύκλους. Αν θέλουμε να συνεχίσουμε τον πολλαπλασιασμό μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε, με μία αραιώση της τάξης του 1000 - 10.000 του προϊόντος της PCR, σαν μήτρα για επιπλέον κύκλους σε μία καινούργια αντίδραση. Έτσι μπορούμε με 60 κύκλους να έχουμε 10^9 - 10^{10} αντίτυπα του αρχικού DNA ([Griffith et al. 1996](#)).

Το κύριο προϊόν αυτής της εκθετικής αντίδρασης είναι ένα κομμάτι DNA, που τα άκρα του καθορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών και το μέγεθος του από την απόσταση των δύο εκκινητών.

1.3.2.4.2 Multiplex PCR

Η multiplex PCR (mpxPCR) αποτελεί διαδικασία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού, κατά την οποία πραγματοποιείται ταυτόχρονος πολλαπλασιασμός δύο ή περισσότερων γενετικών τόπων (μέγιστη καταγραφή αποτελούν οι 14 γενετικοί τόποι των [Broude et al. 2001](#)) σε μια αντίδραση ([Chamberlain et al. 1988](#), [Edwards & Gibbs 1994](#) από [Broude et al. 2001](#)), αυξάνοντας έτσι την ποσότητα των προϊόντων που παρήχθησαν και επιτρέποντας την πιο αποτελεσματική χρήση κάθε δείγματος DNA. Η multiplex PCR είναι μια ακριβής μέθοδος PCR, η οποία χρησιμοποιείται για γενετικό έλεγχο, ανάλυση μικροδορυφορικών αλληλουχιών, καθώς και άλλες εφαρμογές όπου κρίνεται απαραίτητος ο ταυτόχρονος πολλαπλασιασμός (σε μια αντίδραση) αρκετών προϊόντων.

Το είδος των εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση αυτή εξαρτάται, τόσο από τη σύστασή τους, όσο και από το μέσο που θα χρησιμοποιηθεί για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Ο σχεδιασμός των εκκινητών θα πρέπει να είναι τέτοιος, ώστε να επιτρέπει τον ελάχιστο δυνατό σχηματισμό διμερών μεταξύ των διαφορετικών ζευγών εκκινητών που χρησιμοποιούνται. Επομένως τα ζεύγη των εκκινητών που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να μην

περιλαμβάνουν συμπληρωματικές περιοχές. Έναν άλλο περιοριστικό παράγοντα της multiplex αντίδρασης αποτελεί το μέγεθος των προϊόντων που παράγονται από τα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Στην περίπτωση που τα προϊόντα πολλαπλασιασμού έχουν αισθητή διαφορά μεγέθους, τα αποτελέσματα μπορούν να γίνουν εμφανή με μια απλή ηλεκτροφόρηση σε πήγμα ακρυλαμίδης, στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί ειδική χρώση. Στην περίπτωση όμως που τα μεγέθη των προϊόντων επικαλύπτονται κρίνεται απαραίτητη η χρήση αυτόματου αλληλουχητή (sequencer) με διακριτική ικανότητα περισσότερων της μιας χρωστικών ουσιών, έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Η mpxPCR αποτελεί ωστόσο μια διαδικασία, η επιτυχία της οποίας αν και είναι συχνή, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Κάθε ζεύγος εκκινητών που προστίθεται στην αντίδραση, μειώνει την ικανότητα ευελιξίας των συνθηκών της αντίδρασης, που επιτρέπουν τον επιτυχή πολλαπλασιασμό κάθε τμήματος DNA. Επιπρόθετα, οι αλληλεπιδράσεις των εκκινητών (δημιουργία διμερών) και η παρουσία μη ειδικών προϊόντων μπορεί να παρέμβει στη διαδικασία πολλαπλασιασμού των επιθυμητών ειδικών προϊόντων. Αν και ο σχηματισμός διμερών των εκκινητών μπορεί να αποφευχθεί με τη χρήση hot-start PCR, ωστόσο η ειδικότητα του πολλαπλασιασμού μπορεί να επηρεαστεί από άλλους παράγοντες όπως το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και η συγκέντρωση των εκκινητών. Επομένως, ο σχεδιασμός εκκινητών mpxPCR δεν πρέπει να γίνεται επιπόλαια, αφού υπάρχει μεγάλη πιθανότητα αποτυχίας των εργαστηριακών ελέγχων.

1.3.2.4.3 Προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων της PCR

Μετά από την παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται ο προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων της PCR με τη βοήθεια μιας ήδη γνωστής όσον αφορά το μέγεθος αλληλουχίας. Στη συνέχεια ακολουθεί στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν.

1.3.2.5 Πληθυσμιακή γενετική ανάλυση

Με τη βοήθεια διαφόρων προγραμμάτων (GenePop, GENETIX, PHYLIP, PAUP), που στηρίζονται σε διάφορους πολύπλοκους και μη μαθηματικούς αλγόριθμους γίνεται εκτίμηση των συχνοτήτων των αλληλομόρφων κάθε γενετικού τόπου, της απόκλισης από τις αναλογίες Hardy-Weinberg, της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας, του δραστικού μεγέθους του πληθυσμού καθώς και άλλων πληθυσμιακών παραμέτρων. Τέλος, μπορούν να πραγματοποιηθούν φυλογενετικά δέντρα με τις μεθόδους Σύνδεσης Γειτόνων και Μέγιστης Πιθανότητας.

1.4. Εναλλακτικές πηγές γενετικών δεδομένων

1.4.1 Γενικά στοιχεία

Οι λαγοί αποτελούν οργανισμούς πολύ κινητικούς, με μεγάλο εύρος μετακίνησης, η συλλογή των οποίων (για οποιαδήποτε πληθυσμιακή μελέτη) δεν είναι εύκολη υπόθεση. Αποτέλεσμα είναι η συλλογή των δειγμάτων να βασίζεται στην ευγενική προσφορά των κυνηγών, που εκπληρώνοντας την αγαπημένη τους συνήθεια (κυνήγι), συλλέγουν λαγούς και παρέχουν ιστούς στους ερευνητές, για οποιαδήποτε μελέτη. Ωστόσο, η κυνηγετική περίοδος, στη χώρα μας, έχει διάρκεια 6 μηνών (Σεπτέμβρης-Φεβρουάριος), αφού η κυνηγετική δραστηριότητα παύει τις χρονικές εκείνες περιόδους που αρχίζει η αναπαραγωγή του είδους, γεγονός που δεν επιτρέπει τη συλλογή δειγμάτων καθόλη τη διάρκεια του χρόνου. Η χρονική αυτή περίοδος έχει να δεχθεί σημαντικές αμφισβητήσεις, αφού στην Ελλάδα και ιδιαίτερα στην Κρήτη και την Κεφαλονιά μαρτυρίες κυνηγών αποκαλύπτουν ότι οι πληθυσμοί λαγών, εξαιτίας των άριστων περιβαλλοντικών συνθηκών, συνεχίζουν να αναπαράγονται ολόκληρο το χρόνο. Γίνεται λοιπόν σαφής η αναγκαιότητα εύρεσης μη παρεμβατικών μεθόδων, οι οποίες θα επιτρέπουν την παρατήρηση και τη μελέτη των πληθυσμών καθόλη τη διάρκεια του χρόνου, χωρίς να είναι αναγκαία η συλλογή και πιθανώς η θανάτωση των ατόμων που μελετώνται.

Στα πλαίσια αυτά σε διάφορες μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικές πηγές DNA οι τρίχες, τα φτερά, το σάλιο, το δέρμα, τα νύχια, τα οστά και τα περιττώματα. Μεταξύ αυτών αναφέρουμε τις πιο χαρακτηριστικές που είναι: (1) η εργασία των [Higuchi et al. \(1984\)](#) στην οποία έλαβε χώρα εξαγωγή DNA από τις τρίχες ενός εξαφανισμένου αντιπροσώπου της οικογένειας του αλόγου (*Equus quagga*), (2) η μελέτη των [Taberlet και Bouvet \(1992\)](#) που χρησιμοποίησαν τρίχες, οι οποίες είχαν συλλεχθεί στο πεδίο, ως πηγή DNA για την παρακολούθηση στο χώρο και το χρόνο του πληθυσμού της καφέ αρκούδας (*Ursus arctos*), (3) η εξαγωγή DNA από τις μεμβράνες των κελυφών των αυγών και από τα φτερά από τις περιοχές φωλιάσματος διαφόρων ειδών πάπιας ([Pearce et al. 1996](#)), (4) η ανάκτηση γενωμικού DNA από τρίχες και περιττώματα για την αναγνώριση των περισσότερων ατόμων του πληθυσμού καφέ αρκούδας (*Ursus arctos*) των Πυρηναίων και την καταγραφή των προτύπων κίνησης των ατόμων ([Taberlet et al. 1997](#)), (5) η εκτίμηση του πληθυσμιακού μεγέθους ολόκληρου του πληθυσμού φαλαινών του Ατλαντικού με τη μέθοδο σύλληψης-επανασύλληψης, χρησιμοποιώντας δείγματα ιστών που είχαν συλλεχθεί από τμήματα δέρματος ή από κομμάτια ιστού από βιοψίες φαλαινών οι οποίες είχαν τραυματιστεί με ακόντιο ([Palsbøl et al. 1997](#)), (6) η εκτίμηση του πληθυσμιακού μεγέθους των γκρίζων αρκούδων μέσω γενετικών δεδομένων που ανακτήθηκαν από τρίχες ([Woods et al. 1999](#)). Τρίχες για γενετική ανάλυση έχουν επίσης συλλεχθεί από: κουνάβια και νυφίτσες με τη χρήση κομματιών επαλειμμένων με κόλλα σε δολωματικές θέσεις ([Foran et al.](#)

1997a και b, Mowat *et al.* 1998), από μικροθηλαστικά χρησιμοποιώντας ταινία διπλής όψεως (Raphael 1994), από πρωτεύοντα στις θέσεις ανάπαυσής τους (Morin *et al.* 1994, Gagneux *et al.* 1997), από μαρμότες με τη συλλογή κατά το χειρισμό τους τη διάρκεια σύλληψής τους (Gossens *et al.* 1998).

1.4.1.1 Χρήση δειγμάτων περιττωμάτων ως πηγή γενετικού υλικού (DNA)

Οι πηγές γενετικού υλικού που προαναφέρθηκαν, είναι πιο δύσκολο να τις αποκομίσει κανείς και παρέχουν λιγότερες πληροφορίες από ότι τα δείγματα περιττωμάτων.

Στην εργασία των Kohn και Wayne (1997) γίνεται λόγος για την ανάπτυξη νέων τεχνικών ανάκτησης γενετικού υλικού από περιττώματα (molecular scatology) και των εκπληκτικών εφαρμογών που παρέχει στη μελέτη πληθυσμών διαφόρων οργανισμών και κυρίως των θηλαστικών. Οι τεχνικές αυτές επιτρέπουν τον καθαρισμό και την απομόνωση του DNA από τα περιττώματα (τα οποία περιέχουν επιθηλιακά κύτταρα που αποβάλλονται από την εντερική κυτταρική σειρά), ενώ στη συνέχεια ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με τη χρήση της μεθόδου της PCR, παρέχοντας τόσο γενετική όσο και ιστορική πληροφορία για τα άτομα που μελετώνται. Πιο συγκεκριμένα: (α) η αλληλούχιση τμημάτων μιτοχονδριακού DNA και η χρήση μικροδορυφορικών αλληλουχιών επιτρέπει την αναγνώριση ζωικών ειδών, την επίλυση ταξινομικών προβλημάτων και την ταυτοποίηση ατόμων, (β) η ανάλυση μιτοχονδριακού DNA αποκαλύπτει τις φυλογενετικές σχέσεις με άλλα είδη, (γ) ο καθορισμός του φύλου των ατόμων που αναλύονται με τη χρήση ειδικών εκκινητών (δ) η αναγνώριση αλληλουχιών παθογόνων μικροοργανισμών (ιοί, βακτήρια, πρωτίστα, μακροπαράσιτα) μέσω του πολλαπλασιασμού ειδικών για τα παθογόνα αλληλουχιών, (ε) η ανάλυση τροφικών συνηθειών των ατόμων που αναλύονται με τη χρήση ειδοειδικών εκκινητών χλωροπλαστικού DNA (π.χ. *rbcL*) των φυτών. Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι η πληροφορία που μπορεί να εξαχθεί από τα περιττώματα καλύπτει διάφορα πεδία έρευνας, όπως αυτό της βιολογίας της συμπεριφοράς των πληθυσμών, της οικολογίας (εύρος περιοχής χωροκράτειας, διατροφικές συνήθειες), της πληθυσμιακής και εξελικτικής βιολογίας (γενετική ποικιλότητα, φυλογεωγραφία).

Ρίχνοντας μία σύντομη ματιά στη διεθνή βιβλιογραφία μπορεί εύκολα να διαπιστώσει κανείς την εκπόνηση πολλών και συνάμα πολύ ενδιαφερόντων μελετών, στις οποίες η ανάκτηση DNA έγινε από τα περιττώματα.

Οι Hoss *et al.* (1992) και λίγο αργότερα οι Kohn *et al.* (1995) εκπόνησαν μια γενετική μελέτη, μέσω των περιττωμάτων, ενός μικρού πληθυσμού των καφέ αρκούδων (*Ursus arctos*), που βρίσκεται σε κατάσταση κινδύνου στο βουνό Brenta της βόρειας Ιταλίας. Στις μελέτες αυτές

πραγματοποιήθηκε ανάλυση mtDNA, καθώς και ενός πυρηνικού μοριακού δείκτη του χρωμοσώματος Y (SRY). Παρόλο που τα ζώα αυτά δεν ήρθαν σε οπτική επαφή με τους ερευνητές καθόλη τη διάρκεια της μελέτης, ωστόσο τα περιττώματα παρείχαν απαντήσεις σε ερωτήματα όπως αυτό της κατάστασης στην οποία βρίσκεται ο πληθυσμός ή ακόμα και των σχέσεων που διέπουν τους πληθυσμούς μιας ευρύτερης περιοχής, που με συμβατικές μεθόδους προϋποθέτουν άμεση παρατήρηση και χειρισμό των υπό μελέτη οργανισμών. Στις μελέτες των [Constable et al. \(1995\)](#) και [Gerloff et al. \(1995\)](#) έλαβε χώρα από περιττώματα πολλαπλασιασμός μικροδορυφορικών αλληλουχιών για την ταυτοποίηση μπαμπούνινων (*Papio cynocephalus*) και βοπόβος (*Pan paniscus*) αντίστοιχα. Αντίστοιχη ήταν και η εργασία των [Reed et al. \(1997\)](#), που πραγματοποιήθηκε σε φώκιες. Οι [Taberlet et al. \(1997\)](#) πραγματοποίησαν εξαγωγή γενωμικού DNA από περιττώματα για την αναγνώριση των ατόμων του πληθυσμού της καφέ αρκούδας (*Ursus arctos*) των Πυρηναίων και την καταγραφή των προτύπων κίνησης των ατόμων. Οι [Kohn et al. \(1998\)](#) κατάφεραν να εκτιμήσουν το μέγεθος πληθυσμού κογιότ με τη χρήση περιττωμάτων των ζώων αυτών που βρέθηκαν στην περιοχή μελέτης και χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία της σύλληψης-επανασύλληψης. Οι [Poinar et al. \(1998\)](#) πραγματοποίησαν εξαγωγή DNA από απολιθωμένα περιττώματα (κοπρόλιθους) ηλικίας 11.000 χρόνων του εξαφανισμένου *Northrotheriops shastensis*, που βρέθηκαν στη Νεβάδα των Ηνωμένων Πολιτειών. Μεταξύ άλλων προσδιόρισαν αλληλουχίες DNA από 8 οικογένειες φυτών δίνοντας μια εικόνα της τροφικής διαίτας του ζωικού οργανισμού.

Περιττώματα έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως πηγή γενετικού υλικού σε ελέφαντες (*Elephas maximus*), βίσονες (*Bison bonasus*), πολικές αρκούδες (*Ursus maritimus*), ντουγκόνγκ (*Dugong dugong*) (σύνοψη από [Kohn και Wayne 1997](#)) σπληφόρα ([Flagstad et al. 1999](#)) και λύκους ([Lucchini et al. 2002](#)).

Αν και έχουν καταμετρηθεί αρκετά τεχνικά προβλήματα στην ανάκτηση του DNA από τα περιττώματα, ωστόσο οι παραπάνω μελέτες αποτελούν μια αρκετά πειστική ένδειξη ότι τέτοιου είδους προβλήματα μπορούν να ξεπεραστούν και τα περιττώματα μπορεί κάποια μέρα να είναι τόσο χρήσιμα όσο το αίμα και τα τμήματα ιστών για γενετική ανάλυση.

Συμπερασματικά, τα περιττώματα παρέχουν πηγή ανακούφισης της δειγματοληπτικής απόγνωσης που αντιμετωπίζουν οι ερευνητές πολλών άγριων πληθυσμών. Επιπλέον αποφεύγεται η όχληση και η ενδεχόμενη αλλαγή συμπεριφοράς των υπό μελέτη οργανισμών και γίνεται εφικτή η αντιπροσώπευση όλου του πληθυσμού στη δειγματοληψία και όχι μόνο του τμήματος εκείνου που υποκύπτει στη θήρευση. Αυτό μπορεί να επιτρέψει τον έλεγχο της τυχαιότητας ή μη των ατόμων με υψηλότερη θνησιμότητα μέσω θήρευσης, δηλαδή του κατά πόσο τα άτομα που συλλέγονται κατά τη διαδικασία της θήρευσης αποτελούν τυχαίο δείγμα ή κάποιο μέρος του

πληθυσμού με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Αξιοσημείωτο γεγονός αποτελεί η αναφορά από κυνηγούς της Κρήτης τέτοιου είδους φαινομένων. Συμπερασματικά, ο συνδυασμός δεδομένων που προκύπτουν από τη συμβατική ανάλυση περιπτώσεων με τα δεδομένα που προκύπτουν από τεχνικές που βασίζονται στην ανάλυση του DNA, παρέχουν μια πολύ πιο ολοκληρωμένη εικόνα της απόκρυφης ζωής δύσκολα μελετώμενων και άγριων θηλαστικών. Συμβατές αναλύσεις μπορούν να παρέχουν πληροφορία για τους αναπαραγωγικούς κύκλους, τα παθογόνα και τη διαίτα, πληροφορίες που μπορεί να αυξηθούν με αυτές που προκύπτουν από τεχνικές που βασίζονται στην ανάλυση του DNA. Επιπρόσθετα, η ανάλυση DNA αλληλουχιών παρέχει πληροφορία γενετικών, δημογραφικών και ιστορικών δεδομένων των υπό μελέτη ατόμων (πατρότητα, συγγένεια, αναλογία των φύλων, δραστικό μέγεθος πληθυσμών, γονιδιακή ροή και φυλογεωγραφία). Η πρόκληση του μέλλοντος έγκειται στην ανάπτυξη καλύτερων μεθόδων για τον χειρισμό προβλημάτων αναστολής της PCR, ειδικότητας και μόλυνσης έτσι ώστε οι τεχνικές της Μοριακής Κοπρολογίας να μπορούν να εφαρμόζονται ως διαδικασίες ρουτίνας σε μεγάλα δείγματα πληθυσμών.

Στα πλαίσια των δυνατοτήτων που παρέχουν τα περιττώματα, σε συνδυασμό με τις δυσκολίες σύλληψης των λαγών, έγινε προσπάθεια ελέγχου του αν είναι εφικτή η ανάκτηση γενετικών δεδομένων από περιττώματα λαγών στον ελληνικό χώρο, γεγονός που αποτελεί και πρωτοτυπία για τα ελληνικά δεδομένα.

1.5 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Η εξέλιξη, οι φυλογενετικές σχέσεις καθώς και η γενετική δομή των πληθυσμών των λαγών της Ευρώπης αποτελούν πεδία ελάχιστα γνωστά, ενώ οι ταξινομικοί διαχωρισμοί ορισμένων ειδών παραμένουν ακόμα ασαφείς (Petter 1961, Angermann 1983, Flux 1983, Chapman and Flux 1990, Hoffmann 1993), παρά τις προσπάθειες που έχουν γίνει για τη αποσαφήνιση των σχέσεων μεταξύ ορισμένων προβληματικών taxa (Yom-Tov 1967, Pérez-Suárez *et al.* 1994, Palacios 1996, 1998, Hoffmann 1998, Halanych *et al.* 1999).

Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και στην Ελλάδα, με αποτέλεσμα η μελέτη της γενετικής του διαφοροποίησης να αποτελεί ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης με σημαντικές προοπτικές και μέλλον, που θα αποκαλύψουν πιθανώς τα μυστικά που κρύβει η ιστορία των λαγών στη χώρα μας. Η προσαρμοστική ικανότητα των οργανισμών αυτών και η πορεία τους στο χρόνο, δεδομένου ότι αποτελούν είδος του οποίου οι μετακινήσεις οφείλονται σε ένα μεγάλο ποσοστό στην ανθρώπινη παρέμβαση, αποτελεί μεγάλη πρόκληση.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διαπίστωση της ύπαρξης ή μη γενετικής δομής στους πληθυσμούς του είδους *L.euroaeus* που ζουν στην Κρήτη και η σύγκριση τους με πληθυσμούς από την υπόλοιπη Ελλάδα.

Η ύπαρξη ενός μεγάλου, βάσει μορφολογικών χαρακτήρων, αριθμού υποειδών (9) στον Ελλαδικό χώρο (βλέπε συστηματική του είδους παράγραφο 1.4.1.1) μας προκαλεί στο να διερευνήσουμε εάν οι διαφορές αυτές αντικατοπτρίζουν πλαστική απόκριση του ίδιου γενετικού υλικού, ή αν αντίθετα ανταποκρίνονται σε εγκαθιδρυμένες γενετικές διαφορές.

Σε μια πληθυσμιακή μελέτη, που ως στόχο έχει την ανάκτηση ενός πολύ μεγάλου όγκου δεδομένων (εκατοντάδες άτομα και πολυάριθμοι γενετικοί δείκτες), είναι πολύ σημαντικό το χρονικό διάστημα μέσα στο οποίο μπορεί και πρέπει να διεξαχθεί. Για το λόγο αυτό ένας από τους πιο βασικούς στόχους της μελέτης αυτής ήταν η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση τεχνικών για την αξιόπιστη και γρήγορη ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, σε μετέπειτα επίπεδο, τα οποία θα μπορούσαν να παρέχουν μια όσο το δυνατόν πιο ολοκληρωμένη εικόνα της κατάστασης των πληθυσμών του *L. euroaeus* στην Ελλάδα με ιδιαίτερη έμφαση στους πληθυσμούς της Κρήτης. Επιπλέον, στα πλαίσια της γενετικής μελέτης του *L. euroaeus* δόθηκε έμφαση στη προσπάθεια ανάκτησης των γενετικών δεδομένων με έναν έμμεσο τρόπο (περιπτώματα), χωρίς δηλαδή να είναι απαραίτητη η σύλληψη και η θανάτωση του ζώου, που όπως ήδη έχει αναφερθεί οι πυκνότητες των πληθυσμών του έχουν μειωθεί σημαντικά. Η επίτευξη αυτού του στόχου θα βρει σημαντικές εφαρμογές στον μέλλον, τόσο στη συνέχιση της γενετικής μελέτης του λαγού (ταυτοποίηση ατόμων, εκτίμηση πληθυσμιακού μεγέθους, εκτίμηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων, καθορισμός της διατροφής τους είδους κ.α.), όσο και σε άλλους οργανισμούς για τους οποίους ελάχιστα γνωρίζουμε, όσον αφορά της γενετική τους δομή και είναι είτε πολύ δύσκολο να συλληφθούν είτε επικίνδυνο αφού ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου προς εξαφάνιση (λύκοι, αρκούδες, αγριογούρουνα, τσακάλια, αλεπούδες).

Επιπλέον στόχο της μελέτης αποτέλεσε ο συνδυασμός γενετικών και οικολογικών στοιχείων για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη σχέση και τις δραστηριότητες των δύο φύλων που μπορούν να επηρεάσουν τη γενετική τους δομή.

Η παρούσα μελέτη έγινε σε συνεχή συνεργασία με το σύνολο των Ευρωπαϊκών ομάδων που δουλεύουν με το είδος προκειμένου να χρησιμοποιηθούν οι ίδιοι δείκτες και να τυποποιηθεί η συλλογή δεδομένων ώστε να επιτραπεί η σύνθεσή τους σε ευρύτερη γεωγραφική κλίμακα. Η προσέγγιση αυτή στόχο έχει την αντιμετώπιση των αδυναμιών πολυάριθμων πρότερων γενετικών μελετών που λόγω χρήσης διαφορετικών δεικτών δεν επέτρεψαν την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σε σχέση με ερωτήματα ταξινόμησης και γενετικής δομής.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικά στοιχεία

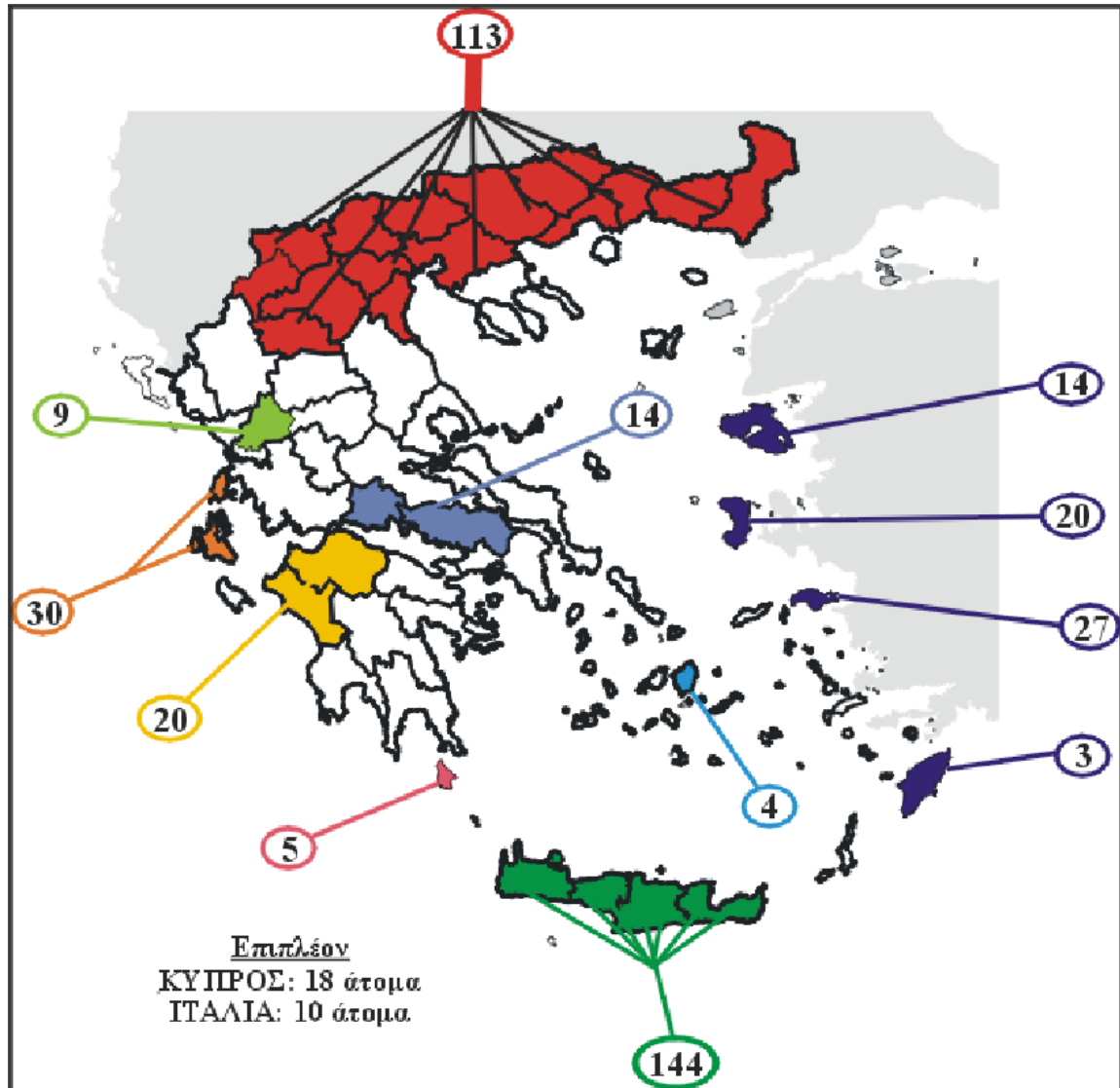
Η παρούσα πληθυσμιακή μελέτη των λαγών βασίζεται σε δείγματα που συλλέχθηκαν από κυνηγούς τόσο σε περιοχές της Κρήτης όσο και της υπόλοιπης Ελλάδας. Πιο συγκεκριμένα δείγματα ιστού λαγών συλλέχθηκαν 1) με τη βοήθεια των Κυνηγετικών Συλλόγων της Κρήτης την κυνηγετική περίοδο 2001-2002, 2) με τη βοήθεια των κυνηγών Μανώλη Παπαδημητράκη και Μανώλη Κοσκινά κατά την ίδια περίοδο και 3) με τη βοήθεια των Κυνηγετικών Συλλόγων της ηπειρωτικής Ελλάδας, της Δασικής Υπηρεσίας της Βορείου Ελλάδας και ιδιαίτερα τη βοήθεια του δασολόγου Π. Πλατή κατά τη διάρκεια των κυνηγετικών περιόδων 1997-1998 και 1999-2000 και τέλος με τη βοήθεια των Κυνηγετικών Συλλόγων των Δωδεκανήσων, των Επτανήσων, της Νάξου και των Κυθήρων.

2.2 Δείγματα ιστών

Το τμήμα του ιστού το οποίο αναλύθηκε αποτελούσε μικρό κομμάτι του αυτιού του ζώου ή μικρό μαλακό κομμάτι κάποιου εσωτερικού οργάνου το οποίο αποθηκεύθηκε αμέσως μετά τη θανάτωση του ζώου σε πλαστικό εργαστηριακό σωληνάκι (erpendorff) όγκου 2ml το οποίο περιείχε 95% αιθανόλη. Αυτή η μέθοδος διατήρησης του ιστού επιλέχθηκε με βάση την ευκολία που παρουσιάζει κατά το χειρισμό των σωληναρίων από τους κυνηγούς, την ευκολία στη μεταφορά, καθώς και τη δίχως ιδιαίτερα προβλήματα εξαγωγή γενωμικού DNA που μπορεί να επιτευχθεί από ιστούς διατηρημένους με την παραπάνω μέθοδο. Το κάθε δείγμα συνοδευόταν από αναλυτικό πίνακα, ο οποίος συμπληρωνόταν από τον εκάστοτε κυνηγό και ο οποίος περιείχε πληροφορίες για την ακριβή περιοχή της δειγματοληψίας, το βάρος του ατόμου, το φύλο και την ημερομηνία κατά την οποία θανατώθηκε. Τα δείγματα αυτά εν συνεχεία συγκεντρώνονταν στο εργαστήριο Γενετικής και Μοριακής Βιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας Κρήτης (ΙΘΑΒΙΚ) για περαιτέρω μελέτη.

Συνολικά συλλέχθηκαν 431 άτομα από ολόκληρη την Ελλάδα. Αναλυτικός χάρτης με τις περιοχές δειγματοληψίας καθώς και με τον αριθμό των δειγμάτων που προέρχονται από τις περιοχές αυτές δίνεται στην **(Εικόνα 4)**.

Στη στατιστική επεξεργασία ωστόσο χρησιμοποιήθηκαν 313 άτομα από πληθυσμούς ολόκληρης της Ελλάδας. Η ομαδοποίηση των πληθυσμών πραγματοποιήθηκε μετά από έλεγχο ομοιογένεια όπως παρουσιάζεται και στο Κεφάλαιο των Αποτελεσμάτων. Το πληθυσμιακό μέγεθος των πληθυσμών της τελικής ομαδοποίησης παρουσιάζεται στον **Πίνακα 8**.



Εικόνα 4: Χάρτης κατανομής περιοχών δειγματοληψίας και αριθμού ατόμων που προέρχονται από αυτές.

2.3 Εξαγωγή γενετικού υλικού

Για την εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA, μικρά κομμάτια (1 ή 2 mm³) αυτιού ή ιστού εσωτερικού οργάνου απομονώθηκαν και επώστηκαν στους 55°C για τουλάχιστον 12 ώρες σε διάλυμα πέψης 700μl (10mM Tris-HCl pH=7.5, 10mM EDTA pH=8.0), που περιέχει 87,5μl SDS (10%) και 10μl πρωτεΐνάση K(10mg/ml). Στη συνέχεια ακολούθησε εξαγωγή με τη μέθοδο των αλάτων σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Hillis *et al.* 1996. Το πρωτόκολλο αυτό παρουσιάζεται αναλυτικά, στο Παράρτημα I.

2.4 Ποσοτικοποίηση του DNA

Για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί το προϊόν της εξαγωγής (γενωμικό DNA) ως μήτρα (template) κατά τη διάρκεια της διαδικασίας του ενζυμικού πολλαπλασιασμού (PCR) ακολούθησε η ποσοτικοποίηση του DNA. Η συγκέντρωση του απομονωμένου DNA υπολογίστηκε (κατά προσέγγιση) από τα μεγέθη των ζωνών αυτού σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε σχέση με μάρτυρα γνωστής ποσότητας DNA (DNA Ladder 100bp) μετά από ηλεκτροφόρηση τάσης 120Volts για 45 λεπτά.

Μετά την ποσοτικοποίηση του DNA πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις στα δείγματα που κρίθηκε ότι ήταν απαραίτητες, έτσι ώστε οι ποσότητες που θα χρησιμοποιούνταν ως μήτρα της PCR να είναι οι κατάλληλες, δεδομένου ότι μεγάλες ποσότητες DNA μπορούν να δράσουν ως αναστολείς της αντίδρασης.

2.5 Γονοτύπηση

2.5.1 Οι εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό μικροδορυφορικών αλληλουχιών

Η εξελικτική διατήρηση των μικροδορυφορικών τόπων σε συγγενικά taxa δίνει τη δυνατότητα χρησιμοποίησης εκκινητών που αναπτύχθηκαν σε ένα είδος, για τον πολλαπλασιασμό με PCR ομόλογων γονιδίων σε άλλα είδη (Andersson *et al.* 1999). Η ανάπτυξη εκκινητών για τον πολλαπλασιασμό μικροδορυφορικών αλληλουχιών αποτελεί μία δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία και για αυτό το λόγο προτιμήθηκε η χρήση μικροδορυφορικών εκκινητών, οι οποίοι είχαν αναπτυχθεί στο παρελθόν και υπήρχαν αποδείξεις ότι δουλεύουν ικανοποιητικά (SurrIDGE *et al.* 1997, Andersson *et al.* 1999) στο υπό μελέτη είδος. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 6 πολυμορφικοί μικροδορυφορικοί τόποι, που σχεδιάστηκαν για το κουνέλι, *Oryctolagus cuniculus* (SurrIDGE *et al.* 1997, Mougél *et al.* 1996). Τα ονόματα των μικροδορυφορικών αυτών τόπων και η σύνθεση των επαναλήψεων που τους χαρακτηρίζει παρατίθενται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Στον πίνακα αυτόν παρουσιάζονται οι μικροδορυφορικοί τόποι που αναλύθηκαν καθώς και η σύνθεση των νουκλεοτιδικών επαναλήψεων που τους χαρακτηρίζει.

Μικροδορυφορικοί Τόποι	Μικροδορυφορική Σύνθεση
Sat-2	(TC) ₁₅ (TG) ₁₀
Sat-12	(CTAT) ₁₀
Sat-5	(TC) ₂₃ (T) ₃ (CT) ₅
Sat-8	(CT) ₁₄ (GT) ₈ (T) ₂ (GT) ₅
Sol-03	(TC) ₁₄ (T) ₄ (TC) ₆
Sol-30	(TC) ₁₄ A(T) ₄ (TC) ₅

2.5.2 Πολλαπλασιασμός του DNA

Ο πολλαπλασιασμός των μικροδορυφορικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της **multiplex PCR** για δύο ζεύγη εκκινητών στην κάθε αντίδραση, αφού πρώτα πραγματοποιήθηκε έλεγχος της καταλληλότητας των εκκινητών. Ο έλεγχος αυτός διαχωρίζεται σε δύο σκέλη. Το πρώτο σκέλος είχε σκοπό τον έλεγχο της δυνατότητας δημιουργίας διμερών μεταξύ των διαφορετικών ζευγών εκκινητών που λάμβαναν μέρος στη αντίδραση και πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Oligos 9.4 (Oligos[®] 1999-2002 v. 9.4). Το δεύτερο σκέλος του ελέγχου είχε στόχο την εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας σύνδεσης για κάθε ζεύγος εκκινητών, καθώς και το εύρος μεγέθους των προϊόντων που παράγονταν. Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε με τη διεξαγωγή «απλού τύπου» PCR με διαβάθμιση των θερμοκρασιών σύνδεσης (Gradient PCR) για κάθε ζεύγος εκκινητή σε 10 άτομα. Οι βέλτιστες θερμοκρασίες υβριδοποίησης για το κάθε ζεύγος εκκινητών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**. Τα αποτελέσματα των παραπάνω ελέγχων σε συνδυασμό με το εύρος μεγέθους των προϊόντων των εκκινητών λήφθηκαν υπόψη για την επιλογή κατάλληλων συνδυασμοί εκκινητών δύο μικροδορυφορικών τόπων για κάθε αντίδραση.

Μετά την επιλογή των κατάλληλων συνδυασμών εκκινητών πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης με αυξομείωση των συγκεντρώσεων των επί μέρους αντιδραστηρίων της PCR (MgCl₂, dNTPs, primers-εκκινητές). Οι συγκεντρώσεις των επί μέρους αντιδραστηρίων της PCR, καθώς και οι συνδυασμοί των εκκινητών που επιλέχθηκαν με τις αντίστοιχες θερμοκρασίες σύνδεσης παρατίθενται στους **Πίνακες 5** και **6** αντιστοίχως.

Πίνακας 4: Βέλτιστες θερμοκρασίες σύνδεσης ζεύγους εκκινητών για κάθε μικροδορυφορικό τόπο.

Μικροδορυφορικοί Τόποι	Βέλτιστες θερμοκρασίες υβριδοποίησης (T _A)
Sat-2	55°C
Sat-12	56°C
Sat-5	57°C
Sat-8	58°C
Sol-03	56°C
Sol-30	55°C

Πίνακας 5: Βέλτιστες Συγκεντρώσεις των επί μέρους αντιδραστηρίων της PCR.

Αρχικές Συγκεντρώσεις Αντιδραστηρίων PCR	Τελικές Συγκεντρώσεις για κάθε αντίδραση PCR
Ρυθμιστικό διάλυμα Taq 10X	1X
MgCl ₂ 50mM	1.5mM
DNTPs 10mM	0.2mM
Εμπρόσθιος Εκκινητής (μη σημασμένος) 10μM	0.2μM για κάθε Εμπρόσθιο Εκκινητή
Ανάστροφος Εκκινητής (μη σημασμένος) 10μM	0.13μM για κάθε Ανάστροφο Εκκινητή
Ανάστροφος Εκκινητής (σημασμένος με Texas Red) 10μM	0.06μM για κάθε σημασμένο Ανάστροφο Εκκινητή
Taq 5u/μl	0.025 u/μl
Συνολικός όγκος	15μl

Πίνακας 6: Συνδυασμοί εκκινητών που επιλέχθηκαν και βέλτιστες θερμοκρασίες υβριδοποίησης τους.

Συνδυασμός εκκινητών	Θερμοκρασία Υβριδοποίησης (T _A)
Sat-2 Sat-12	55°C
Sat-5 Sat-8	58°C
Sol-03 Sol-30	56°C

Η τεχνική της **multiplex PCR** περιορίστηκε στα δύο ζεύγη εκκινητών ανά αντίδραση, αφού το μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων αποτελούσε ένας αυτοματοποιημένος αλληλουχητής (Vistra DNA 725 automated sequencer) με διακριτική ικανότητα μιας μόνο χρωστικής (Texas Red) με την οποία είχαν σημειωθεί και τα δύο ζεύγη εκκινητών ως προς τον ανάστροφο εκκινητή τους.

Όλες οι αντιδράσεις PCR που προαναφέρθηκαν, πραγματοποιήθηκαν σε μηχανήμα με δυνατότητα διακύμανσης της θερμοκρασίας υβριδοποίησης (Gradient PCR) MJ-PTC 200.

2.5.3 Οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων των παραπάνω αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήγμα ακρυλαμίδης 6% (150ml 40% acrylamide, 100ml 10X TBE, 420g urea, ddH₂O τελικού όγκου 1L) σε αυτόματο αλληλουχητή (Vistra DNA 725

automated sequencer). Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης κυμάνθηκε από 2 έως 3 ώρες ανάλογα με το μέγεθος του μικροδορυφορικού τόπου που πολλαπλασιάστηκε.

2.5.4 Προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων της PCR

Ο προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μιας ήδη γνωστής, όσον αφορά το μέγεθος, αλληλουχίας. Αναλυτικότερα πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση ατόμων που διέθεταν κατάλληλο εύρος μεγέθους αλληλομόρφων για τον **κάθε** μικροδορυφορικό τόπο (προτιμήθηκαν δύο άτομα τα αλληλόμορφα των οποίων εμφανίζονταν με τη μορφή κλίμακας καλύπτοντας όλα τα πιθανά μεγέθη που μπορούσαν να φέρουν τα άτομα που αναλύθηκαν) με αλληλουχία γνωστού μεγέθους (marker του sequencer Vistra). Από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης αυτής, βρέθηκε το μέγεθος των αλληλομόρφων των δύο ατόμων κυρίως με το μάτι, αλλά και με τη βοήθεια του προγράμματος FragmeNT 1.1a (**FragmeNT Analysis Molecular Dynamics version 1.1a Copyright © 1993-1994**). Τα άτομα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια ως «αλληλουχίες δείκτες» για κάθε μικροδορυφορικό τόπο που ηλεκτροφορήθηκε.

Τέλος, τα μεγέθη των αλληλομόρφων που προσδιορίστηκαν, καταγράφηκαν με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου Excel με στόχο την περαιτέρω στατιστική τους ανάλυση.

2.6 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

2.6.1 Προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος πληθυσμιακής διαφοροποίησης με σκοπό τον ορισμό των πληθυσμών που αντιπροσωπεύουν ξεχωριστές μονάδες. Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα GENEPOP 3.2A (**Raymond and Rousset 1995**) και λαμβάνει υπόψη την κατανομή των αλληλομόρφων στους υπό μελέτη πληθυσμούς και έχει ως μηδενική υπόθεση την $H_0 =$ η κατανομή των αλληλομόρφων να είναι η ίδια για ζεύγη πληθυσμών.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος, με το ίδιο πρόγραμμα, ανισορροπίας σύνδεσης για την στατιστική τεκμηρίωση του ανεξάρτητου διαχωρισμού των γενετικών τόπων που μελετήθηκαν ($H_0 =$ οι γονότυποι σε έναν γενετικό τόπο είναι ανεξάρτητοι από τους γονότυπους ενός άλλου γενετικού τόπου).

Επιπρόσθετα με το πρόγραμμα GENETIX 4.02 υπολογίστηκαν οι αλληλικές συχνότητες, η μέση παρατηρούμενη (H_o) και αναμενόμενη ετεροζυγωτία (H_e), η αναλογία των πολυμορφικών τόπων (P , 99% κριτήριο) ο αριθμός αλληλομόρφων ανά τόπο, εκτιμήσεις των F-statistics θ (F_{ST}

Weir & Cockerham, 1984) και η γενετική απόσταση D (Reynolds *et al.* 1983, Weir and Cockerham, 1983) η οποία στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου με το πρόγραμμα PHYLIP 3.6 (Felsenstein 1993) με τη μέθοδο σύνδεσης γειτόνων (Neighbour-joining, Saitou & Nei 1987).

Με τη βοήθεια του γενετικού προγράμματος GENEPOP 3.2A πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι (exact tests) απόκλισης από την ισορροπία Hardy-Weinberg και της πληθυσμιακής διαφοροποίησης.

Η φύση των δεδομένων μας επιτρέπει τη μελέτη τους με τη χρήση της μεθόδου Παραγοντικής Ανάλυσης των Αντιστοιχιών (AFC “Analyse Factorielle des Correspondances” ή “Factorial Correspondence Analysis”) που περιγράφηκε από τον Benzecri (1973). Το θεωρητικό υπόβαθρο της μεθόδου καθώς και εφαρμογές αυτής περιγράφονται αναλυτικά από τους Benzecri (1973), Hill (1974), Lebart *et al.* (1979, 1980, 1984), Bastin *et al.* (1980), και Volle (1981).

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, αρχικά πραγματοποιείται μετασχηματισμός των γονοτύπων των ατόμων για τους υπό μελέτη γενετικούς τόπους σε πίνακα συνάφειας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πολλαπλού πίνακα συνάφειας (multiple contingency table). Στη συνέχεια πραγματοποιείται σύνδεση του παραπάνω πίνακα με νέφος σημείων $N(I)$ τοποθετημένων σε χώρο K διαστάσεων (R^k) (She *et al.* 1987).

Η μέτρηση της σχέσης μεταξύ δύο οποιονδήποτε σημείων του χώρου R^k πραγματοποιείται με την χ^2 απόσταση του Benzecri (Benzecri χ^2). Η απόσταση αυτή χρησιμοποιείται στη συνέχεια στην Ανάλυση Συνιστωσών (Benzecri 1973).

Η επιλογή της πιθανολογικής αυτής απόστασης δικαιολογείται από την ιδιότητά της να προσθέτει διαφορετικές γραμμές ή στήλες ενός πίνακα συνάφειας χωρίς να μεταβάλλει τη γεωμετρία του νέφους $N(I)$ (She *et al.* 1987).

Τα επόμενα βήματα αποτελούν τυπικές διαδικασίες μιας Canonical Analysis και περιλαμβάνουν τον υπολογισμό:

1. του πίνακα διακύμανσης V ,
2. των ιδιοδιανυσμάτων του πίνακα αυτού,
3. της σχέσης των ιδιοδιανυσμάτων με τις ιδιοτιμές του πίνακα.

Τα ιδιοδιανύσματα σταθεροποιούν τις κατευθύνσεις του χώρου R^k σύμφωνα με τα σημεία όπου παρατηρούνται οι μεγαλύτερες διακυμάνσεις. Οι κατευθύνσεις αυτές καλούνται παραγοντικοί άξονες (factor axes). Η ιδιοτιμή του παραγοντικού άξονα αποτελεί το ποσοστό της συνολικής διακύμανσης που ερμηνεύεται από τον άξονα αυτό.

4. των συντεταγμένων των σημείων στους άξονες. Τέλος, πραγματοποιείται γραφική αναπαράσταση των σημείων σε τρισδιάστατο γράφημα το οποίο καθορίζεται από τους διαφορετικούς άξονες.

Η τελική θέση ενός ατόμου (σημείου) στο γράφημα καθορίζεται από το γονότυπο (αλληλόμορφα) του ατόμου αυτού σε όλους τους γενετικούς τόπους.

Η AFC ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το γενετικό πρόγραμμα GENETIX 4.02 (Belkhir *et al.* 1998).

Οι έλεγχοι ισορροπίας Hardy-Weinberg έχουν την ίδια μηδενική υπόθεση (H_0 = τυχαία ένωση γαμετών) ενώ διαφέρουν ως προς την εναλλακτική τους. Συγκεκριμένα ο πρώτος έλεγχος είχε ως εναλλακτική υπόθεση H_1 το έλλειμμα ετεροζυγωτίας ενώ ο δεύτερος H_1 το πλεόνασμα ετεροζυγωτίας. Οι έλεγχοι αυτοί (U-tests) επιλέχθηκαν αφού είναι στατιστικά ισχυρότεροι από τον έλεγχο πιθανότητας (probability test) (Rousset and Raymond 1995).

Μια προϋπόθεση της ισορροπίας Hardy-Weinberg παραβιάζεται όταν στους υπό μελέτη πληθυσμούς δεν παρατηρούνται τυχαίες συζεύξεις. Η μεταβλητή F_{IS} χρησιμοποιείται για την περιγραφή της απόκλισης των γονοτυπικών συχνοτήτων από τις συχνότητες της ισορροπίας HW. Όταν η μεταβλητή αυτή ισούται με το μηδέν ($F_{IS} = 0$), ισχύουν οι συχνότητες της ισορροπίας HW. Για $0 < F_{IS} \leq 1$ υπάρχει πλεόνασμα ομόζυγων ατόμων σε σύγκριση με τα αναμενόμενα αποτελέσματα της ισορροπίας HW. Για $F_{IS} < 0$ υπάρχει πλεόνασμα ετερόζυγων ατόμων. Η παράμετρος F_{IS} εξαιτίας του πολύ σημαντικού ρόλου που παίζει στη γενετική πληθυσμών ερμηνευτεί με πολλούς τρόπους. Οι περισσότερες από αυτές αφορούν την περίπτωση που το F_{IS} είναι μεταξύ του μηδενός και του ένα γεγονός που παρατηρείται σε περιπτώσεις ομομιξίας και πληθυσμιακής υποδιαίρεσης (Gillespie 1998).

Πολλά είδη που καταλαμβάνουν τεράστιες γεωγραφικές περιοχές είναι υποδιαιρεμένα σε (υπο)πληθυσμούς (π.χ. λόγω ύπαρξης εμποδίων στη διαδικασία της μετανάστευσης) και δεν μπορούν να συμπεριφερθούν ως ένα πληθυσμός του οποίου τα άτομα συζεύγνυνται τυχαία. Σε τέτοιες περιπτώσεις αναμένεται γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των υποπληθυσμών, η οποία οδηγεί σε αποκλίσεις από την ισορροπία HW. Στην περίπτωση που παρατηρείται τυχαία σύζευξη σε κάθε υποπληθυσμό οι αποκλίσεις των γονοτυπικών συχνοτήτων για ολόκληρο το είδος περιγράφονται από το F_{ST} . Όταν υπάρχει διακύμανση στις αλληλικές συχνότητες μεταξύ των υποπληθυσμών, οι γονοτυπικές συχνότητες του είδους (στο σύνολο των υποπληθυσμών) θα παρουσιάζουν έλλειμμα ετεροζυγωτίας μια κατάσταση που είναι γνωστή ως αρχή του Wahlund (Gillespie 1998).

2.7 Δείγματα περιττωμάτων

Δείγματα περιττωμάτων συλλέχθηκαν από την περιοχή Θραψανό του Νομού Ηρακλείου με σκοπό τη διαπίστωση του κατά πόσο είναι εφικτή η ανάκτηση του γενετικού υλικού από αυτά. Το γενετικό υλικό που αποτέλεσε στόχο της απομόνωσης ήταν τόσο το γενετικό υλικό του λαγού από τον οποίο προέκυψε, όσο και το γενετικό υλικό των φυτικών ειδών τα οποία περιλήφθηκαν στη διατροφή του ατόμου λίγο πριν από τη δειγματοληψία.

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε μικρή περιοχή ($\approx 38\text{m}^2$), η οποία θεωρείται αντιπροσωπευτική μιας ευρύτερης καλλιεργήσιμης περιοχής έκτασης περίπου 20 στρεμμάτων.

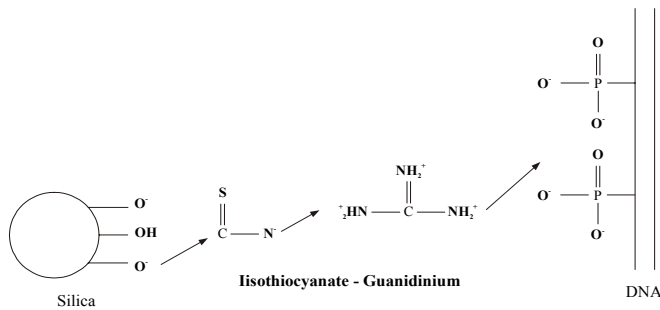
Μια ανασκόπηση των μελετών μοριακής κοπρολογίας, δείχνουν ότι το 31% των δειγμάτων κοπράνων δεν περιείχαν DNA, ακόμα και αν έγιναν επανειλημμένες διαδικασίες εξαγωγής. Η πιθανότητα να **μην** αποκτήσουμε προϊόν κατά τη διαδικασία της PCR από έναν αριθμό δειγμάτων από 3 έως 6 είναι μικρότερη από 0.05 και 0.01 αντιστοίχως. Για το λόγο αυτό οι [Frantzen et al. \(1998\)](#) προτείνουν ο αριθμός περιττωμάτων που συλλέγεται για κάθε άτομο να είναι τουλάχιστον 3 με 6, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται κατά κάποιον τρόπο η ανάκτηση τόσο μικρών τμημάτων scnDNA όσο και mtDNA από ένα τουλάχιστο από αυτά. Περισσότερα δείγματα είναι πιο επιθυμητά από επανειλημμένες διαδικασίες εξαγωγής, δεδομένης της ποικιλότητας των συνθηκών διατήρησης, τους οικολογικούς καθώς και τους ειδοειδικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη διατήρηση του DNA. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -20°C , η οποία βοηθάει στη διατήρηση τόσο του mtDNA, όσο και τμημάτων πυρηνικού DNA με μέγεθος της τάξης των 200bp και η οποία πλεονεκτεί έναντι της μεθόδου διατήρησής τους σε θερμοκρασία δωματίου ([Frantzen et al. 1998](#)).

2.7.1 Εξαγωγή ολικού DNA από τα περιττώματα

Η εξαγωγή ολικού DNA από τα περιττώματα έγινε με δύο διαφορετικούς τρόπους. Κατά τον πρώτο χρησιμοποιήθηκε ένα έτοιμο πακέτο εξαγωγής DNA (NucleoSpin Tissue, Macherey-Nagel), που βασίζεται στην ικανότητα του χαοτροπικού άλατος του γουανιδικού θειοκυανίου (GuSCN) να δεσμεύει μόρια νουκλεϊκών οξέων και έχει χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση υψηλής ποιότητας DNA από μαλακούς ιστούς, βακτηριακά κύτταρα, ιατροδικαστικά δείγματα και άλλες βιολογικές πηγές. Κατά τον δεύτερο τρόπο εξαγωγής, κυρίως εξαιτίας του υψηλού κόστους αγοράς του kit εξαγωγής έγινε προσπάθεια προσομοίωσης του πρώτου με υλικά που αγοράστηκαν ανεξάρτητα, ώστε αν αυτό είναι δυνατό να μειωθεί το κόστος των πειραμάτων.

Η όλη τεχνική στηρίζεται στην ικανότητα των σωματιδίων του διοξειδίου του πυριτίου να προσδένονται μέσω του γουανιδινικού ισοθειοκυανίου με τα μόρια του DNA (**Εικόνα 5**). Χάρη στο θετικό φορτίο των αμινομάδων του γουανιδινικού γίνεται πρόσδεση με το DNA το

οποίο εξαιτίας των φωσφορικών ομάδων έχει ένα ελαφρώς αρνητικό φορτίο και με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει η απομόνωση των μορίων του DNA.



Εικόνα 5: Γέφυρα άλατος μεταξύ του DNA και των σωματιδίων της silica (Poinar 1994)

Προφανώς η σύνδεση στο DNA εξαρτάται από την διαθεσιμότητα ελεύθερων φωσφορικών ομάδων, που δεν εμποδίζονται από άλλους παράγοντες, που δρουν ως αναστολείς. Αξίζει να σημειωθεί εδώ, ότι η προσθήκη 2 μl διαλύματος ακετικού οξέος (10%) διατηρεί πρωτονιωμένο το γουανιδικό εξασφαλίζοντας

καλύτερη πρόσδεση του DNA και των σωματιδίων (σφαιριδίων), ιδιαίτερα σε μικρά κομμάτια DNA, όπως είναι αυτά των απολιθωμάτων (Poinar 1994).

Τα στάδια αυτού του πρωτοκόλλου βασίστηκαν στα ήδη δημοσιευμένα πρωτόκολλα των Boom *et al.* (1990, 1999), Höss & Pääbo (1993) και Höss (1994) και παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα I.

2.7.2 Πολλαπλασιασμός DNA που εξήχθηκε από τα περιττώματα

Κατά τη διάρκεια της (PCR) έγινε προσπάθεια πολλαπλασιασμού 1) ενός μιτοχονδριακού γονιδίου (D-loop) του λαγού και 2) ενός χλωροπλαστικού γονιδίου (rbcL), ώστε να γίνει ταυτοποίηση της διατροφής του λαγού.

Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ένα ζευγάρι ειδικών για το λαγό εκκινητών, που σχεδιάστηκαν βάσει κάποιων αλληλουχιών που ήταν διαθέσιμες σύμφωνα με τους Kasapidis *et al.* (μελέτη που έχει υποβληθεί). Οι συνθήκες αυτής της PCR ήταν 35 κύκλοι με αποδιάταξη στους 94°C για 1min, σύνδεση στους 56°C για 1min και επέκταση στους 72°C για 1min. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι η ακόλουθη:

5' – AAT TCT CTT TAA ACT ATT CTC TGC – 3'

5' – AAG AAC CAG ATG CCA GTT ATA G – 3'

Στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ένα ζευγάρι γενικών εκκινητών για το χλωροπλαστικό γονίδιο (rbcL), η αλληλουχία των οποίων, όπως δίδεται στην εργασία των Poinar *et al.* (1998), είναι:

5' – ATG TCA CCA CAA ACA GA (AG) ACT AAA GCA AGT – 3'

5' – CGT CCT TTG TAA CGA TCA AG –3'

Οι συνθήκες αυτής της PCR ήταν 35 κύκλοι με αποδιάταξη στους 94°C για 1min, σύνδεση στους 55°C για 1min και επέκταση στους 72°C για 1min.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Εξαγωγή και πολλαπλασιασμός του DNA

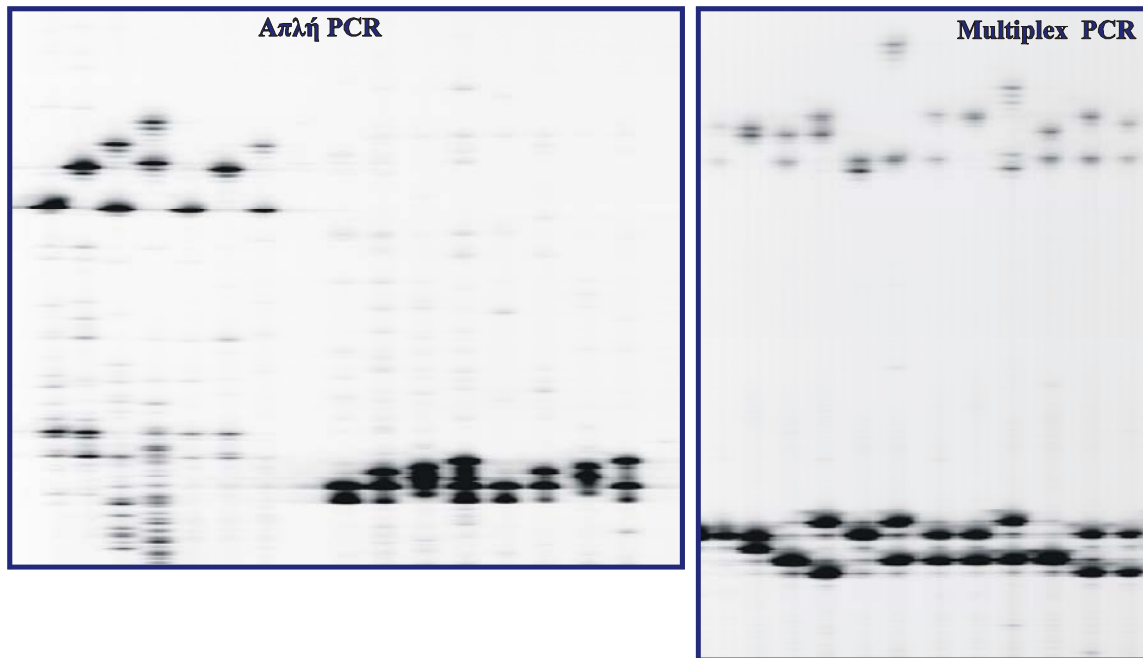
Μετά την επιτυχημένη εξαγωγή γενωμικού DNA από 431 δείγματα λαγών και την ποσοτικοποίησή του ακολούθησε η διαδικασία της γονοτύπησης. Ο συνδυασμός εκκινητών που καθιστούν εφικτή την πραγματοποίηση της multiplex PCR, το μέγεθος των προϊόντων που πολλαπλασίασαν και οι συνθήκες της multiplex PCR παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**. Στην **Εικόνα 6** έχουμε τη συγκριτική αντιπαράθεση των πηγμάτων ακρυλαμίδης μιας απλής και μιας multiplex PCR, όπου είναι εύκολο να διακρίνει κανείς τον πετυχημένο πολλαπλασιασμό έως και δύο ταυτόχρονα μικροδορυφορικών τόπων, γεγονός που επιτρέπει τη γονοτύπηση του ίδιου αριθμού δειγμάτων στο μισό χρόνο.

Πίνακας 7: Στον πίνακα αυτόν παρουσιάζονται οι κατάλληλοι συνδυασμοί εκκινητών για την επίτευξη της mpxPCR και η θερμοκρασία Σύνδεσης (T_A) της PCR. Παρουσιάζεται επίσης το εύρος του μεγέθους των προϊόντων των εκκινητών τόσο με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα (σημειώνεται με * για δεδομένα από την οικογένεια Leporidae και + μόνο για δεδομένα του γένους *Lepus*) (Rico *et al.* 1994, Andersson *et al.* 1999, Surridge *et al.* 1999) όσο και από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης. Τέλος παρουσιάζεται ο αριθμός αλληλομόρφων για κάθε μικροδορυφορικό τόπο σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής.

Συνδυασμός εκκινητών	Μεγέθη προϊόντων*	Μεγέθη προϊόντων +	Μεγέθη προϊόντων	Αριθμός Αλληλομόρφων
Sat-2	227-255bp	227-255bp	222-273bp	39
Sat-12	106-146bp	106-138bp	116-144bp	13
Sat-5	195-231bp	197-221bp	205-217bp	5
Sat-8	94-182bp	94-102bp	94-108bp	7
Sol-03	218-257bp	Δεν δίνεται	242-267bp	5
Sol-30	137-209bp	155-209bp	171-189bp	12

Ενώ πραγματοποιήθηκε μελέτη 6 συνολικά μικροδορυφορικών τόπων, στην στατιστική ανάλυση συμπεριλήφθηκαν μόνο οι 3 (Sat-2, Sat-12, Sat-8), αφού για τους υπόλοιπους 3 (Sat-5, Sol-03, Sol30) δεν ήταν δυνατή η γονοτύπηση όλων των ατόμων εξαιτίας τεχνικών προβλημάτων η επίλυση των οποίων απαιτούσε χρόνο. Επιπρόσθετα αφαιρέθηκαν από τη στατιστική ανάλυση οι πληθυσμοί εκείνοι για τους οποίους δεν υπήρχαν δεδομένα και για τους τρεις μικροδορυφορικούς τόπους (Sat-2, Sat-12, Sat-8). Συγκεκριμένα στη στατιστική ανάλυση

δεν συμπεριλαμβάνονται οι πληθυσμοί της Άρτας, της Πελοποννήσου, της Λιβαδειάς, των Κυθήρων και της Νάξου.



Εικόνα 6: Η αριστερή εικόνα παρουσιάζει τον πολλαπλασιασμό δύο μικροδορυφορικών τόπων ο οποίος πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές αντιδράσεις (απλή PCR). Η δεξιά εικόνα παρουσιάζει τον πολλαπλασιασμό δύο μικροδορυφορικών τόπων σε μια αντίδραση (multiplex PCR).

3.2 Στατιστική Ανάλυση των αποτελεσμάτων

3.2.1 Ομαδοποίηση των δεδομένων

Ένα πρόβλημα που έπρεπε να αντιμετωπιστεί πριν από την περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων ήταν ο καθορισμός των δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στη στατιστική ανάλυση ιδίως στην περίπτωση της Κρήτης. Δεδομένου ότι ο λαγός αποτελεί έναν οργανισμό με μεγάλο εύρος μετακίνησης ο καθορισμός των δειγμάτων/πληθυσμών αποτελεί ένα αρκετά πολύπλοκο εγχείρημα. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε αρχική ομαδοποίηση των δειγμάτων με βάση τη μικρότερη δυνατή γεωγραφική μονάδα που στην περίπτωση της παρούσας μελέτης αποτελούν τα χωριά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ομοιότητας των πληθυσμών (Genic differentiation for each population pair) με το πρόγραμμα GENEPOP 3.2A. Από τα αποτελέσματα που ανακτήθηκαν ομαδοποιήθηκαν εκείνοι οι πληθυσμοί οι οποίοι δεν διέφεραν και η διαδικασία επαναλαμβανόταν έως ότου να φτάσουμε στο σημείο να παρουσιάζονται πληθυσμοί, οι οποίοι διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα της τελικής

ομαδοποίησης πληθυσμών παρέχονται στο **Παράρτημα Ι**. Οι πληθυσμοί οι οποίοι ομαδοποιήθηκαν καθώς και τα ονόματα που τους δόθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8**.

Πίνακας 8: Παρουσίαση τελικής ομαδοποίησης πληθυσμών σύμφωνα με τα αποτελέσματα του GENEPOP3.2A καθώς και των πληθυσμών που περιλαμβάνονται σε αυτή. Με τον συμβολισμό N παρουσιάζονται τα άτομα του πληθυσμού της κάθε ομαδοποίησης.

<u>Τελικοί Πληθυσμοί</u>	<u>N</u>	<u>Περιοχές πληθυσμών που περιλαμβάνονται σε αυτούς</u>
Βόρειο & κεντρικό Ηράκλειο	61	Βόρειο και Κεντρικό τμήμα Νομού Ηρακλείου μέχρι τον ορεινό όγκο των Αστερουσίων
Νότιο Ηράκλειο	19	Πληθυσμοί Αστερουσίων και νότιων παρυφών του Ψηλορείτη (Μεσσαρά)
Λασιίθι	19	Πληθυσμοί της κοινότητας Ιεράπετρας και νότιων παρυφών του ορεινού όγκου της Δίκτης
Βόρειο Ρέθυμνο & Χανιά	43	Πληθυσμοί Βόρειου τμήματος Νομού Ρεθύμνης, ΒΔ παρυφών Ψηλορείτη και των κοινοτήτων Αγιάς και Τοπολίων του Νομού Χανίων
Ανατολική Μακεδονία	34	Πληθυσμοί από: Αλεξανδρούπολη, Μπέλες, Κοκάρτζα, και Πιερία
Δυτική Μακεδονία	45	Πληθυσμοί από: Γρεβενά, Αριδαία και Φλώρινα
Λαμία	4	Πληθυσμοί από το Νομό Λαμίας
Νησιά Ανατολικού Αιγαίου	30	Πληθυσμοί από τη Ρόδο και τη Σάμο
Κύπρος	18	Πληθυσμοί από την Κύπρο
Κεφαλονιά	19	Πληθυσμοί από την Κεφαλονιά
Λευκάδα	11	Πληθυσμοί από τη Λευκάδα
Ιταλία	10	Πληθυσμοί από την Ιταλία

Πριν την εκτίμηση των πληθυσμιακών παραμέτρων, πραγματοποιήθηκε έλεγχος ανεξάρτητου διαχωρισμού των μικροδορυφορικών τόπων (Genotypic disequilibrium test) τα αποτελέσματα του οποίου ήταν ενδεικτικά της απουσίας σύνδεσης των γενετικών τόπων που αναλύθηκαν (**Παράρτημα Ι**).

3.2.2 Εκτιμήσεις Πληθυσμιακών Παραμέτρων

Στο επόμενο στάδιο της στατιστικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκαν εκτιμήσεις πληθυσμιακών παραμέτρων.

Έλεγχος Απόκλισης από την Ισορροπία Hardy-Weinberg

Τα αποτελέσματα από τον υπολογισμό της παρατηρούμενης (H_o) και της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας (H_e Nei 1978) για κάθε τόπο και κάθε πληθυσμό χωριστά παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9**. Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών που παρατηρούνται καθορίστηκε με τον έλεγχο έλλειψης ετεροζυγωτίας.

Πίνακας 9: Παρατηρούμενες (H_o) και αναμενόμενες (H_e σύμφωνα με τον Nei 1978) τιμές ετεροζυγωτίας για κάθε μικροδορυφορικό τόπο και για κάθε πληθυσμό.

<u>Πληθυσμοί</u>	Sat-2		Sat-12		Sat-8	
	H_o	H_e	H_o	H_e	H_o	H_e
B.- Κ. Ηράκλειο	0.4750	0.7396	0.8246	0.7455	0.5682	0.6173
N. Ηράκλειο	0.4444	0.5714	0.8947	0.7781	0.6667	0.6536
Λασιθι	0.3684	0.5249	0.7368	0.7781	0.2667	0.6000
B. Ρέθυμνο-Χανιά	0.7632	0.8670	0.7857	0.8078	0.3125	0.6875
A. Μακεδονία	0.6552	0.8482	0.6897	0.8415	0.2188	0.2039
Δ. Μακεδονία	0.6765	0.8490	0.8333	0.8746	0.3333	0.2970
Λαμία	0.5000	0.6786	0.7500	0.7857	0.3333	0.3333
Νησιά Α. Αιγαίου	0.4667	0.8181	0.6000	0.7737	0.5000	0.5630
Κύπρος	0.8889	0.8270	0.5000	0.5606	0.6875	0.8488
Κεφαλονιά	0.5263	0.6117	0.1053	0.3300	0.9167	0.6196
Λευκάδα	0.8182	0.7273	0.9000	0.6684	0.3636	0.3117
Ιταλία	0.6000	0.8632	0.0000	-----	0.0000	0.3660

Σύμφωνα με τον έλεγχο που έχει ως εναλλακτική υπόθεση το έλλειμμα ετεροζυγωτίας βρέθηκε ότι για τον μικροδορυφορικό τόπο **Sat-2** οι πληθυσμοί που παρουσιάζουν έλλειμμα ετεροζυγωτίας είναι οι πληθυσμοί του Βόρειου και Κεντρικού Νομού Ηρακλείου, οι πληθυσμοί της Δυτικής Μακεδονίας και οι πληθυσμοί των Ανατολικών Νησιών του Αιγαίου. Για τον μικροδορυφορικό τόπο **Sat-12** οι πληθυσμοί που παρουσιάζουν έλλειμμα είναι οι πληθυσμοί της Ανατολικής Μακεδονίας και της Κεφαλονιάς. Αντιθέτως το δείγμα της Λευκάδας εμφανίζουν

πλεόνασμα ετεροζυγωτίας. Τέλος, για τον μικροδορυφορικό τόπο **Sat-8** οι πληθυσμοί που παρουσιάζουν έλλειμμα ετεροζυγωτίας είναι οι πληθυσμοί του Νομού Λασιθίου, του Βόρειου Νομού Ρεθύμνης και Χανίων, των Ανατολικών Νησιών του Αιγαίου και της Κύπρου. Αντιθέτως οι πληθυσμοί της Κεφαλονιάς εμφανίζουν πλεόνασμα ετεροζυγωτίας για τον τόπο αυτό. Στο **Παράρτημα I** παρατίθενται αναλυτικά τα αποτελέσματα. Συνολικά αποτελέσματα από όλους τους τόπους παρέχουν ενδείξεις ότι οι πληθυσμοί του Βόρειου και Κεντρικού Ηρακλείου, του Λασιθίου, του Βόρειου Ρεθύμνου-Χανίων, της Ανατολικής Μακεδονίας, της Δυτικής Μακεδονίας, των Ανατολικών Νησιών του Αιγαίου και της Κεφαλονιάς παρουσιάζουν έλλειμμα ετεροζυγωτίας. Αντίθετα οι πληθυσμοί της Λευκάδας φαίνεται να παρουσιάζουν πλεόνασμα ετεροζυγωτίας. Τέλος και οι τρεις μικροδορυφορικοί τόποι εμφανίζουν έλλειμμα ετεροζυγωτίας στο σύνολο των πληθυσμών.

Συχνότητες Αλληλομόρφων

Με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου Excel κατασκευάστηκε ραβδόγραμμα κατανομής αλληλικών συχνοτήτων ανά πληθυσμό για κάθε μικροδορυφορικό τόπο (**Εικόνα 7**). Στην **Εικόνα 8** παρουσιάζονται: ο αριθμός των ατόμων ανά πληθυσμό, ο αριθμός των αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο και ο μέσος αριθμός αλληλομόρφων ανά πληθυσμό. Οι υπό μελέτη πληθυσμοί παρουσιάζουν υψηλή ποικιλότητα με αναμενόμενη ετεροζυγωτία $H_e = 0.6881$ και μέση τιμή αλληλομόρφων $A = 6.66$. Παρατηρήθηκε σημαντική γεωγραφική διαφοροποίηση (μέση τιμή $F_{ST} = 0.19$) ενδεικτική της μικρής γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών.

Για τον μικροδορυφορικό τόπο **Sat-2** παρατηρούνται συνολικά 39 αλληλόμορφα. Το αλληλόμορφο με τη μεγαλύτερη συχνότητα έχει μήκος 233bp (0.2489).

Για τον μικροδορυφορικό τόπο **Sat-12** παρατηρούνται συνολικά 13 αλληλόμορφα. Το αλληλόμορφο με τη μεγαλύτερη συχνότητα έχει μήκος 132bp (0.2357).

Τέλος, για τον τόπο **Sat-8** παρατηρούνται συνολικά 13 αλληλόμορφα. Το αλληλόμορφο με τη μεγαλύτερη συχνότητα έχει μήκος 98bp (0.5504).

Παραγοντική Ανάλυση των Αντιστοιχιών

Τα τρισδιάστατα γραφήματα που προέκυψαν από την AFC παρατίθενται στην **Εικόνα 9**. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το 33.49% της συνολικής διαφοροποίησης στον Ελλαδικό χώρο ερμηνεύεται από τους 10 άξονες ενώ οι τρεις πρώτοι ερμηνεύουν το 12.64% της διαφοροποίησης που παρατηρείται. Το σχετικά χαμηλό ποσοστό γενετικής ποικιλότητας που ερμηνεύεται από τους τρεις πρώτους άξονες παρουσία έντονης γεωγραφικής δομής της ποικιλότητας είναι φαινόμενο συνηθισμένο για μικροδορυφορικούς τόπους και είναι αποτέλεσμα της μεγάλης ποικιλότητάς τους, που αντανακλά υψηλούς μεταλλακτικούς ρυθμούς. Το φαινόμενο αυτό έχει

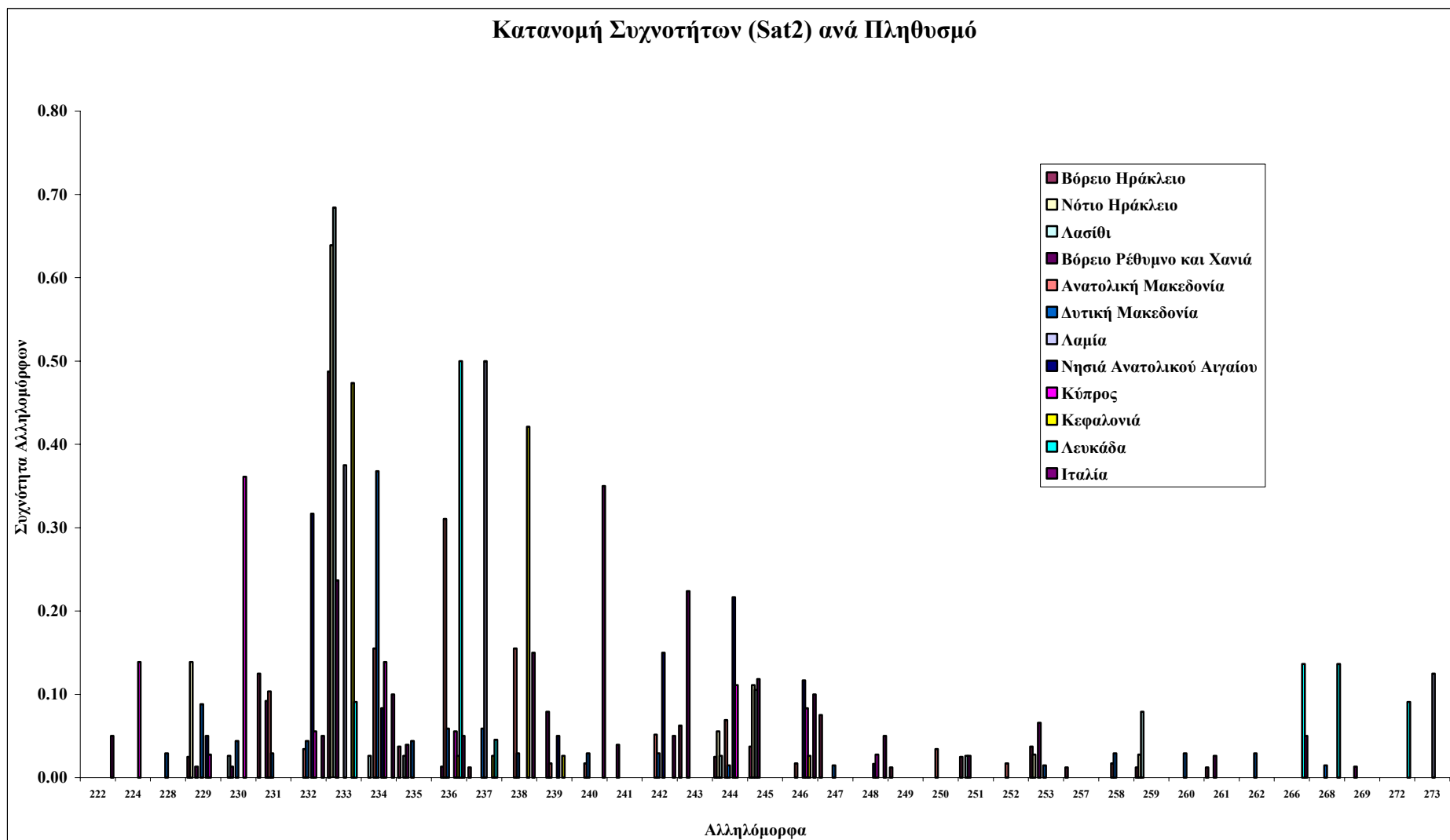
αντίστοιχό του στην γενική τάση των μικροδορυφορικών να δίνουν τιμές F_{ST} που υποεκτιμούν τις πραγματικές διαφορές (Balloux *et al.* 2002).

F-statistics

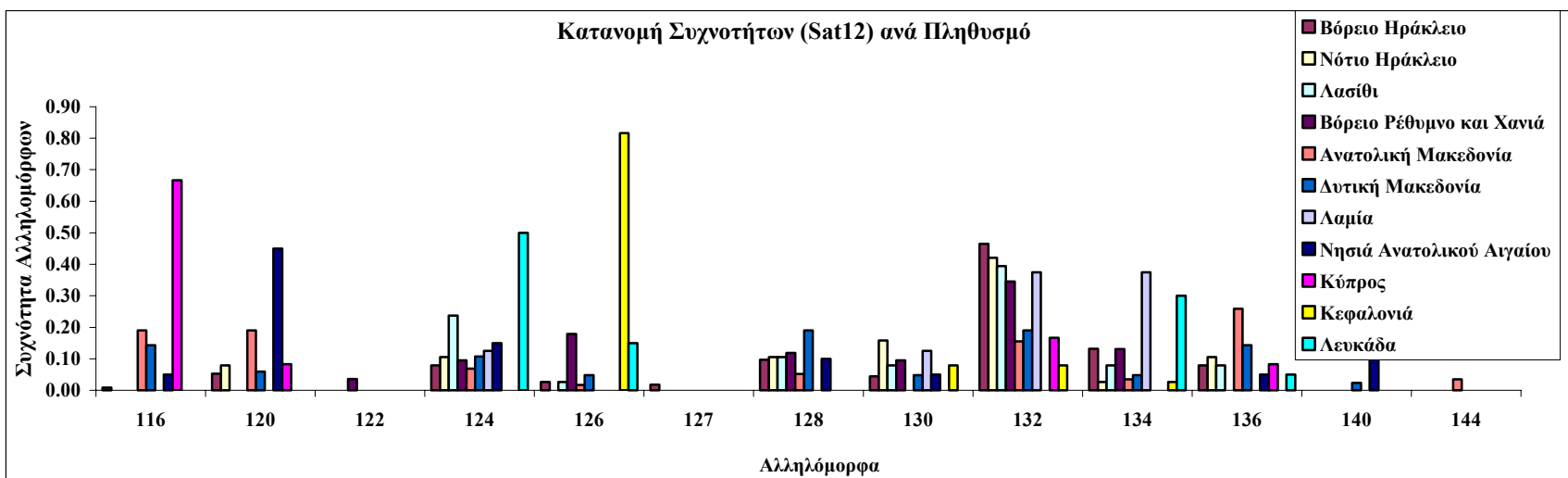
Οι τιμές F_{ST} καθώς και οι γενετικές αποστάσεις που προέκυψαν από τις αναλύσεις φαίνονται στον **Πίνακα 10**.

Η μεγαλύτερη τιμή F_{ST} παρατηρείται μεταξύ των πληθυσμών των νησιών του ανατολικού Αιγαίου και της Κεφαλονιάς (0.36283), ενώ η μικρότερη τιμή F_{ST} είναι μεταξύ των πληθυσμών του Βόρειου-Κεντρικού Ηρακλείου και του Νότιου Ηρακλείου (0.00662). Οι πληθυσμοί που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη γενετική απόσταση είναι αυτοί των Νησιών του Ανατολικού Αιγαίου με τους πληθυσμούς της Κεφαλονιάς (0.45071). Αντίστοιχα οι πληθυσμοί που παρουσιάζουν τη μικρότερη γενετική απόσταση είναι αυτοί του Βόρειου και Κεντρικού Ηρακλείου με τους πληθυσμούς του Νότιου Ηρακλείου.

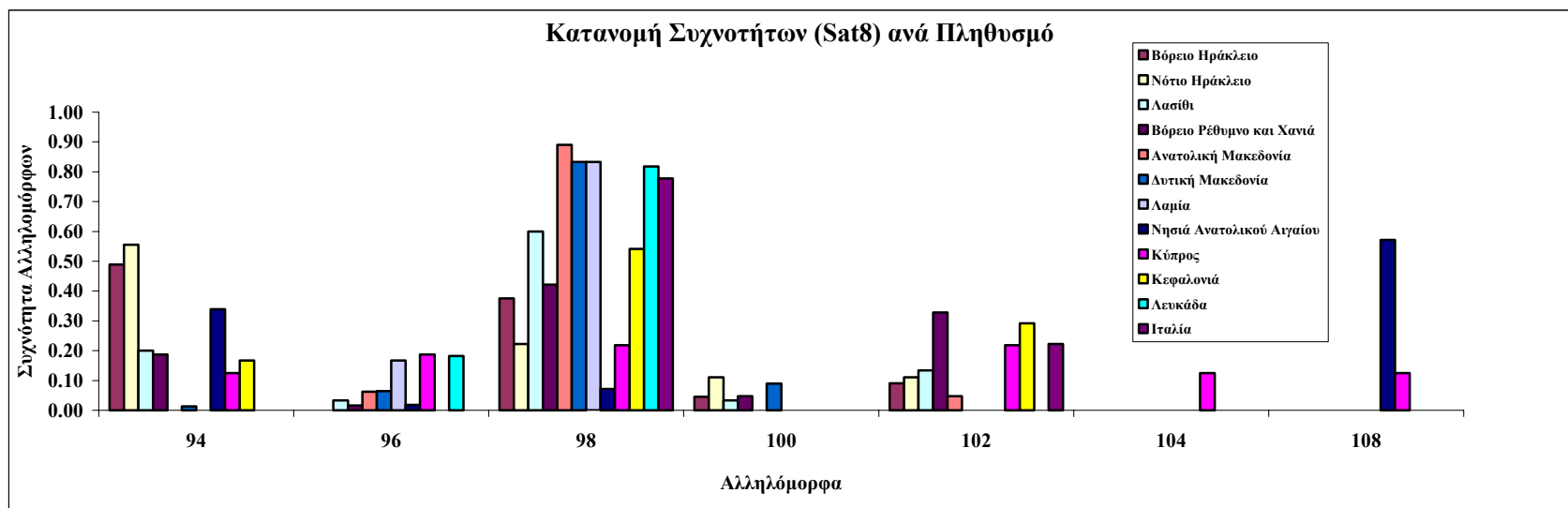
Το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με τη μέθοδο της σύνδεσης γειτόνων (Neighbour Joining), χρησιμοποιώντας ως εξωομάδα τον πληθυσμό της Ιταλίας, για τους 12 πληθυσμούς, όπως αυτοί ορίστηκαν από τον έλεγχο της αλληλικής διαφοροποίησης, δίνεται στην **Εικόνα 10**.



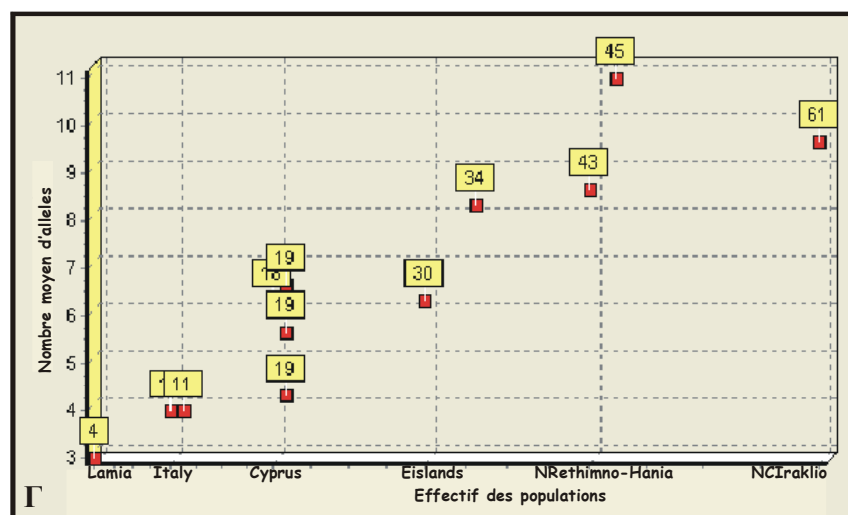
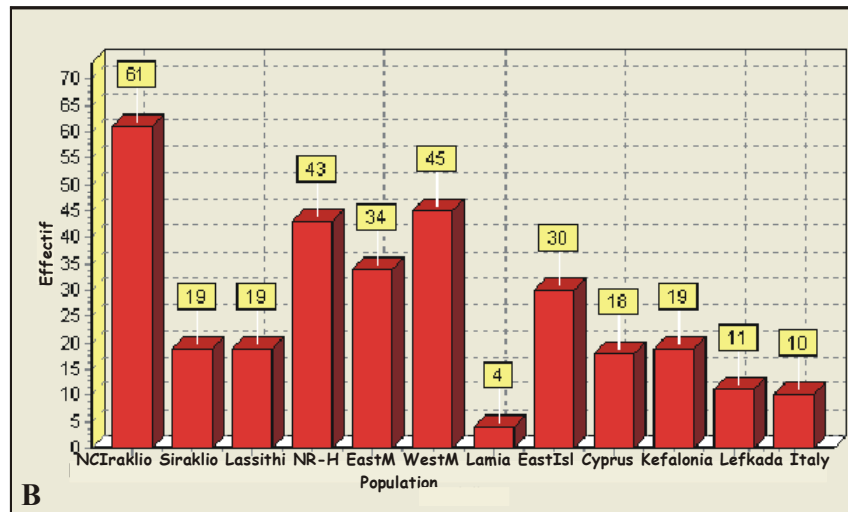
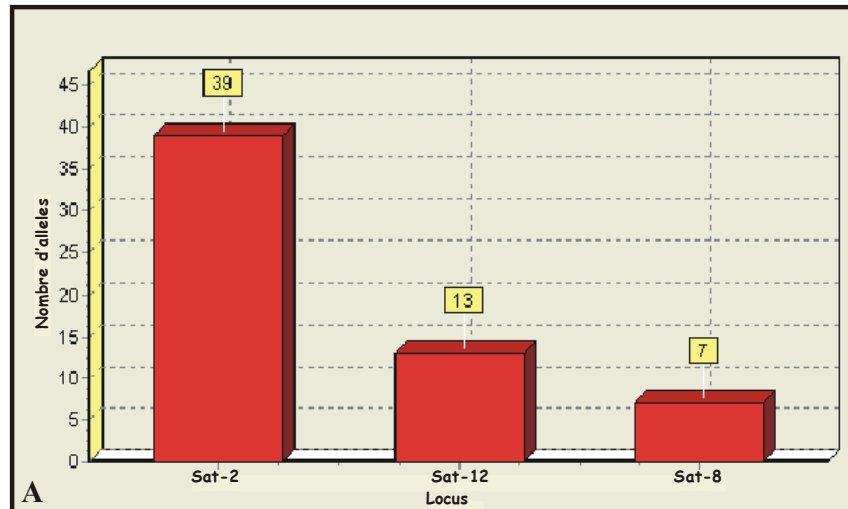
Εικόνα 7α: Κατανομή Συχνοτήτων του μικροδουροφορικού τύπου Sat-2 για κάθε πληθυσμό



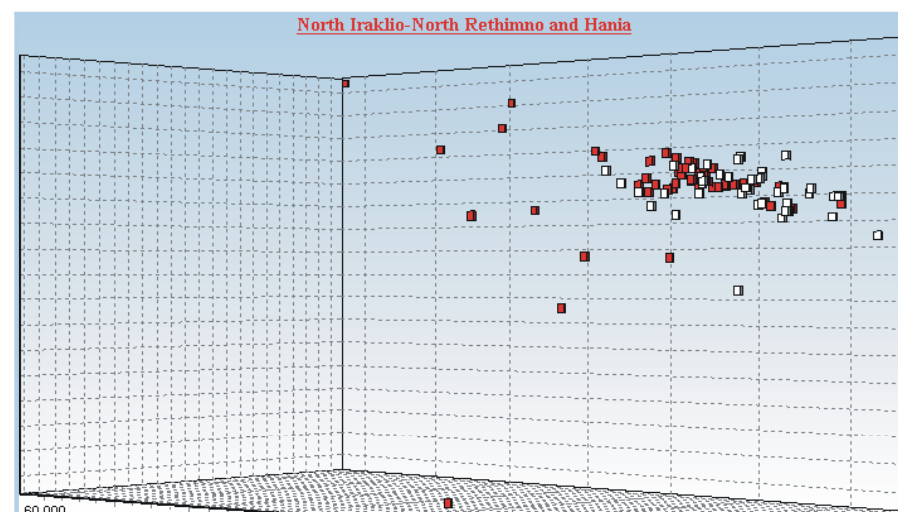
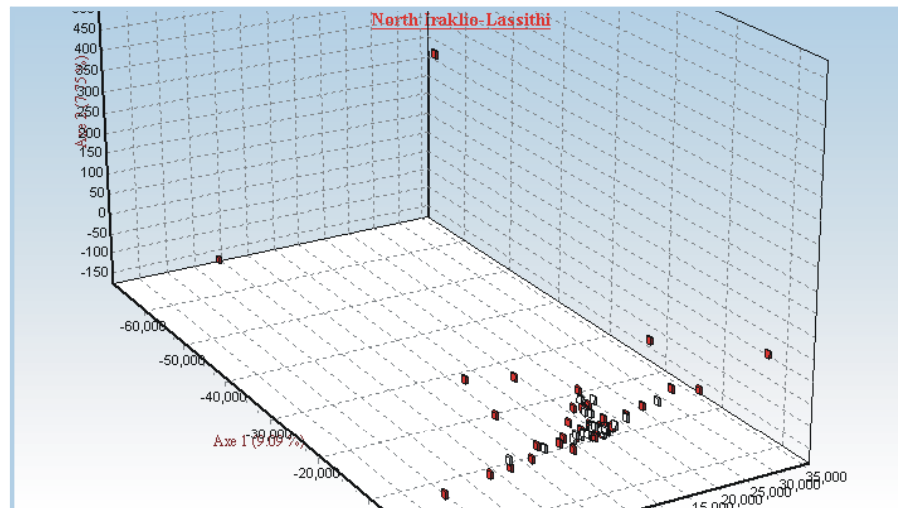
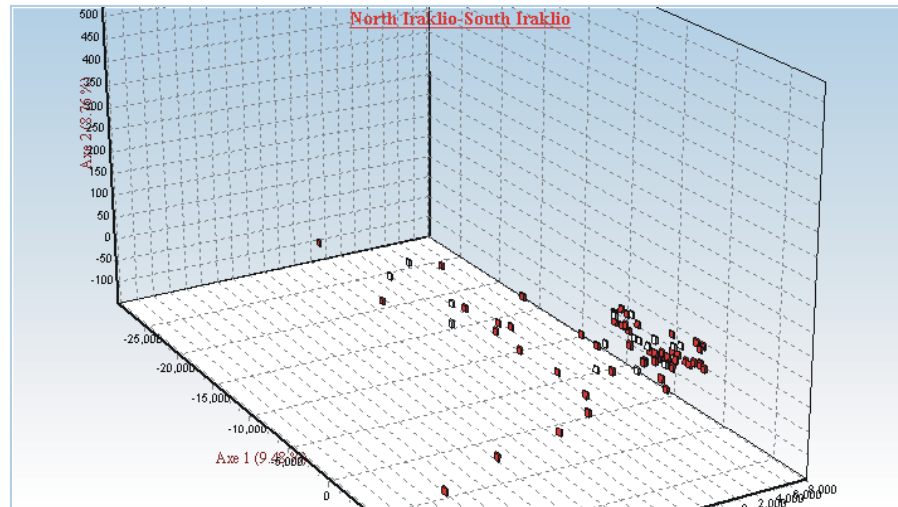
Εικόνα 7β: Κατανομή Συχνοτήτων του μικροδορυφορικού τύπου Sat-12 για κάθε πληθυσμό



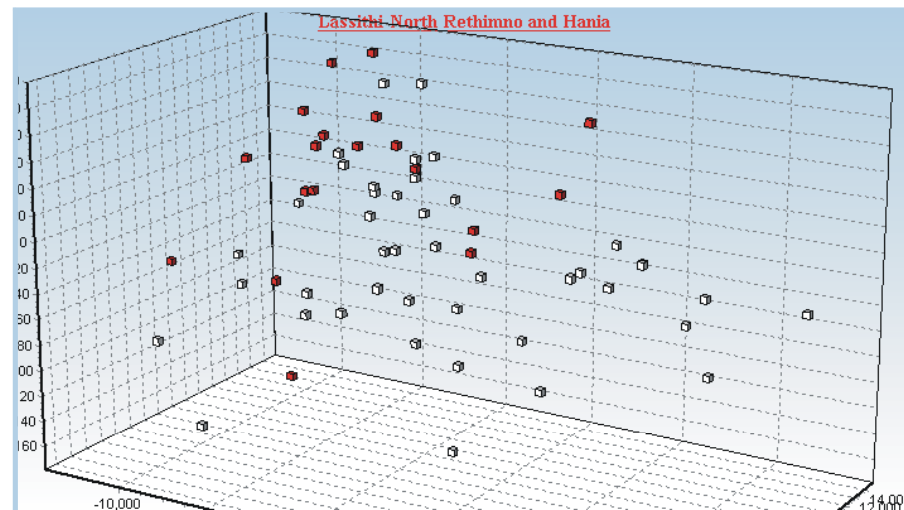
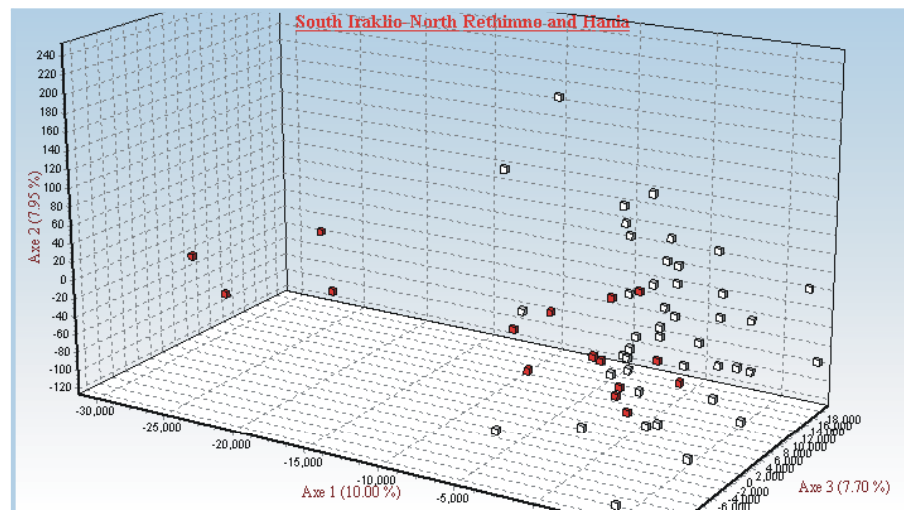
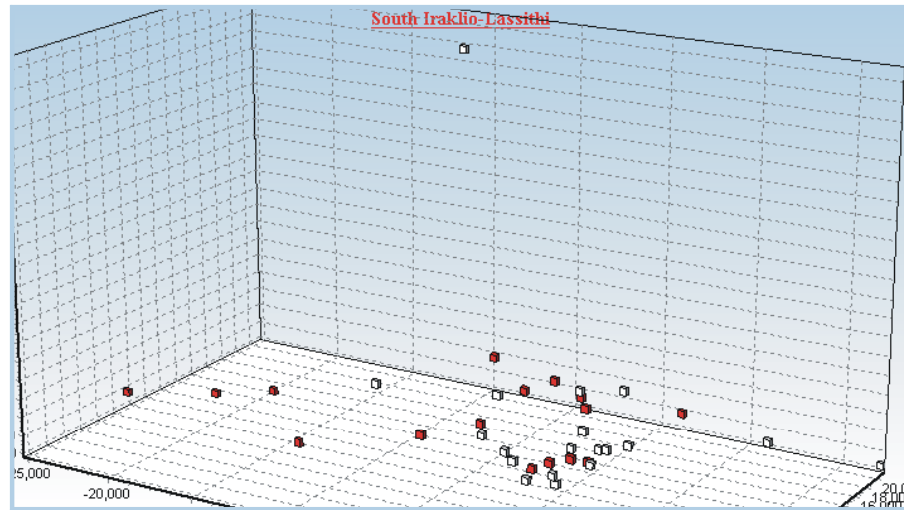
Εικόνα 7γ: Κατανομή Συχνοτήτων του μικροδορυφορικού τύπου Sat-8 για κάθε πληθυσμό



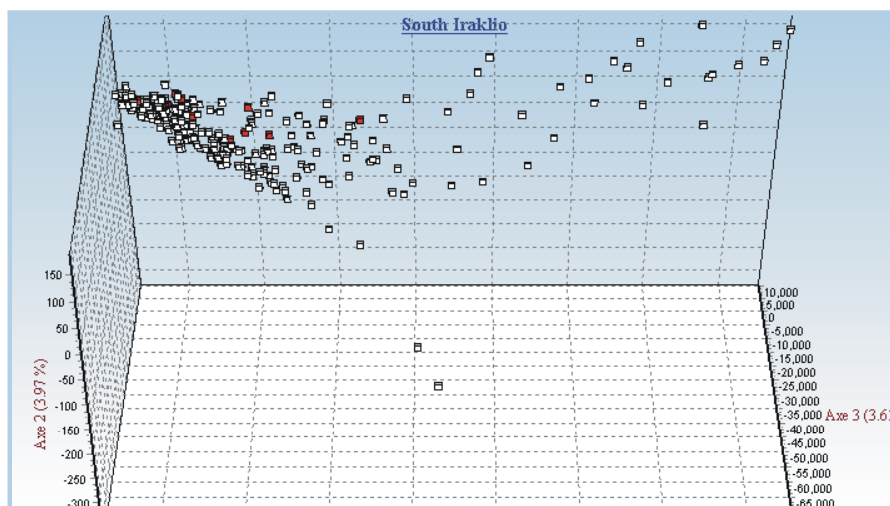
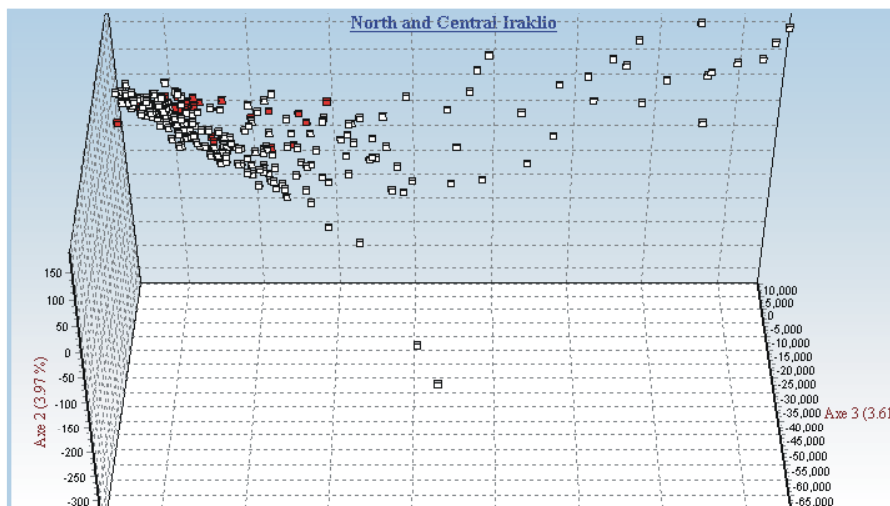
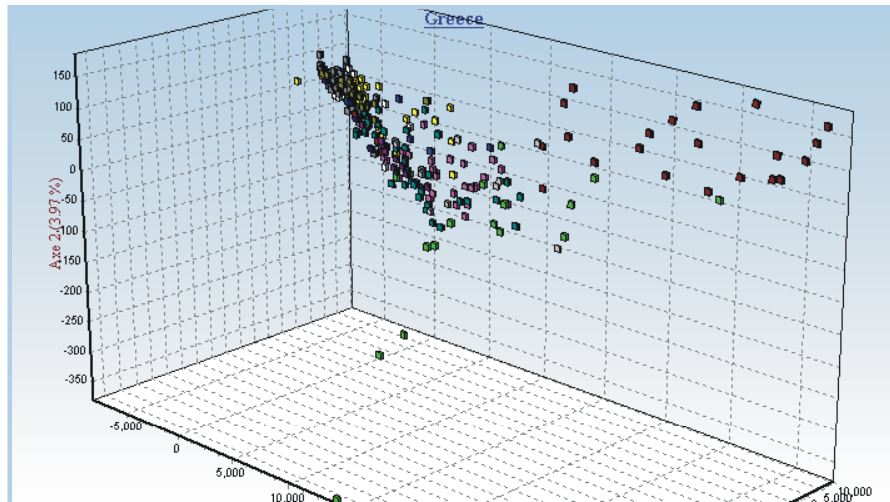
Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση του αριθμού αλληλομόρφων και του μεγέθους των υπό μελέτη πληθυσμών. Α. Αριθμός αλληλομόρφων που παρατηρήθηκε για κάθε μικροδουροφορικό τόπο, Β. Αριθμός ατόμων που περιλαμβάνονταν σε κάθε πληθυσμό που αναλύθηκε, Γ. Μέσος αριθμός αλληλομόρφων που παρατηρήθηκε για κάθε πληθυσμό.



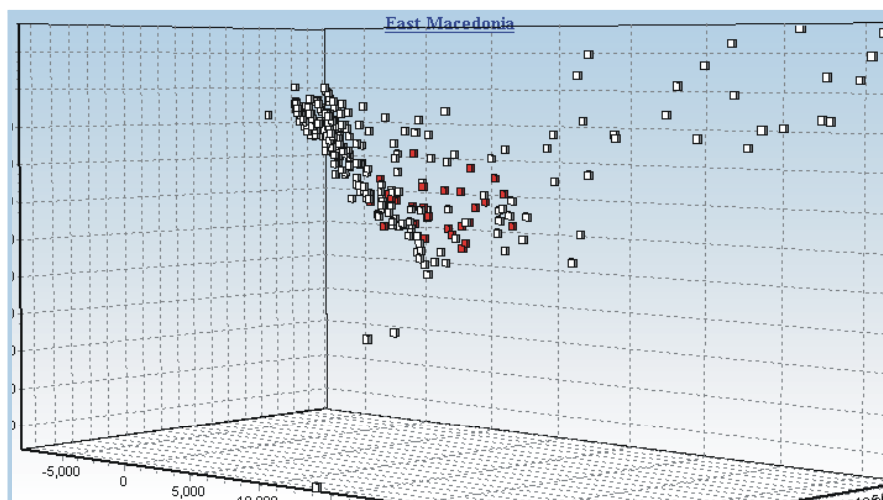
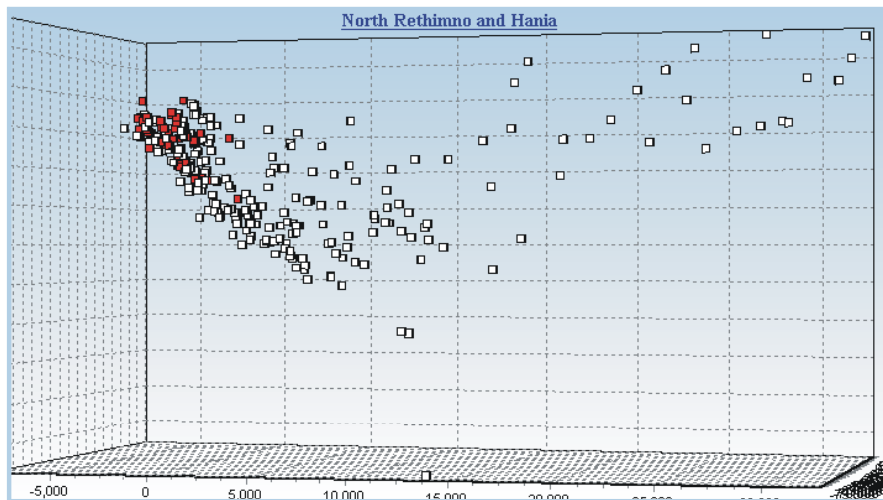
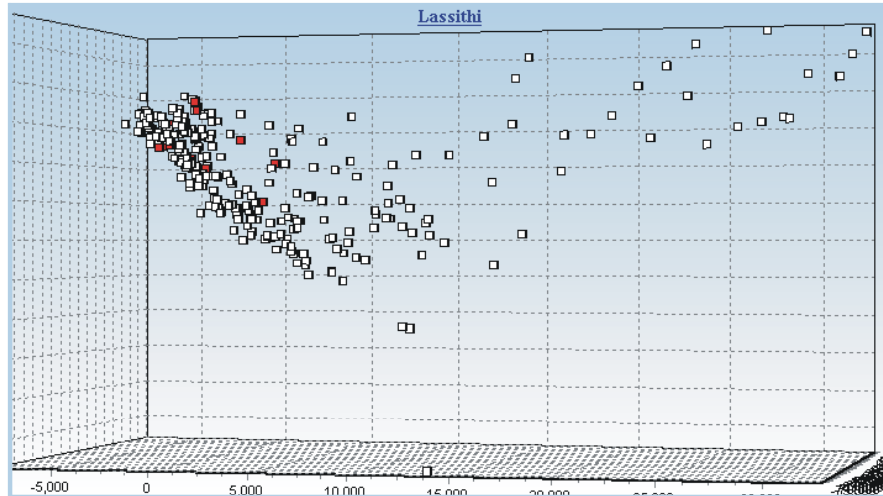
Εικόνα 9α: Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών (AFC). Στα γραφήματα παρουσιάζεται ανά ζεύγη σύγκριση των πληθυσμών της Κρήτης. Τα άτομα που φαίνονται με κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύουν τα άτομα των πληθυσμών που αναφέρονται πρώτοι στον τίτλο του κάθε γραφήματος.



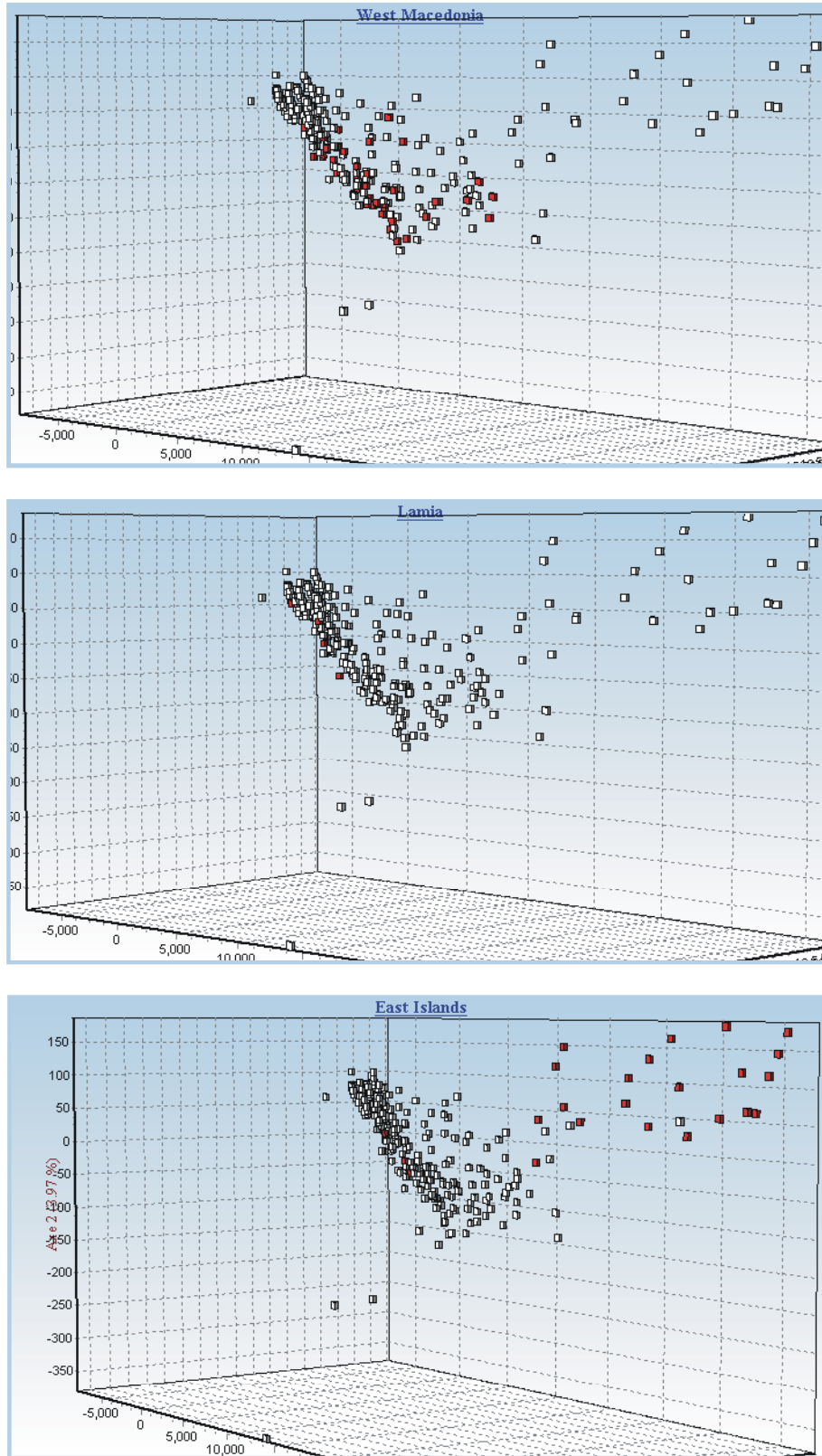
Εικόνα 9α: Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών (AFC). Στα γραφήματα παρουσιάζεται ανά ζεύγη σύγκριση των πληθυσμών της Κρήτης. Τα άτομα που φαίνονται με κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύουν τα άτομα των πληθυσμών που αναφέρονται πρώτοι στον τίτλο του κάθε γραφήματος.



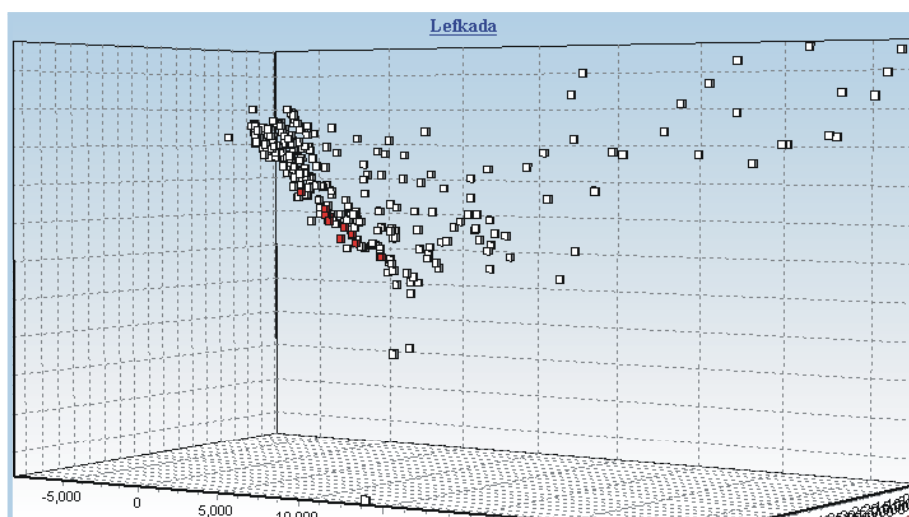
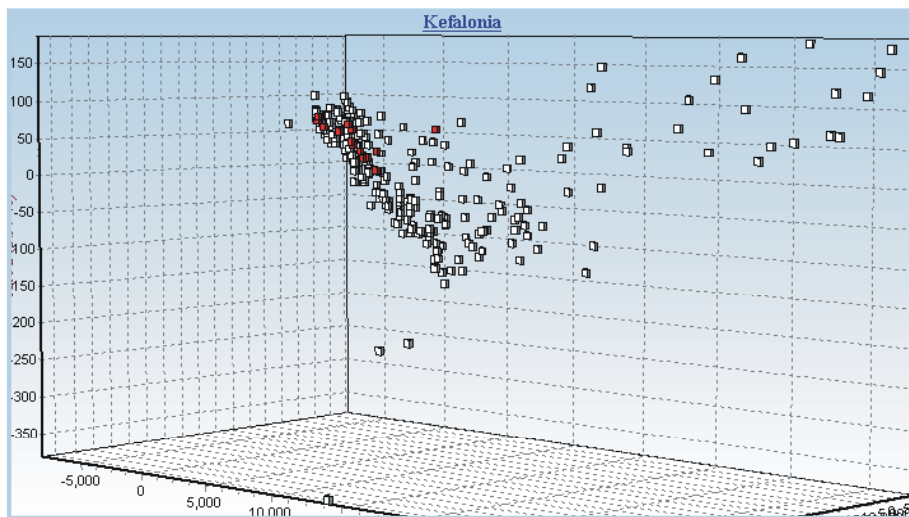
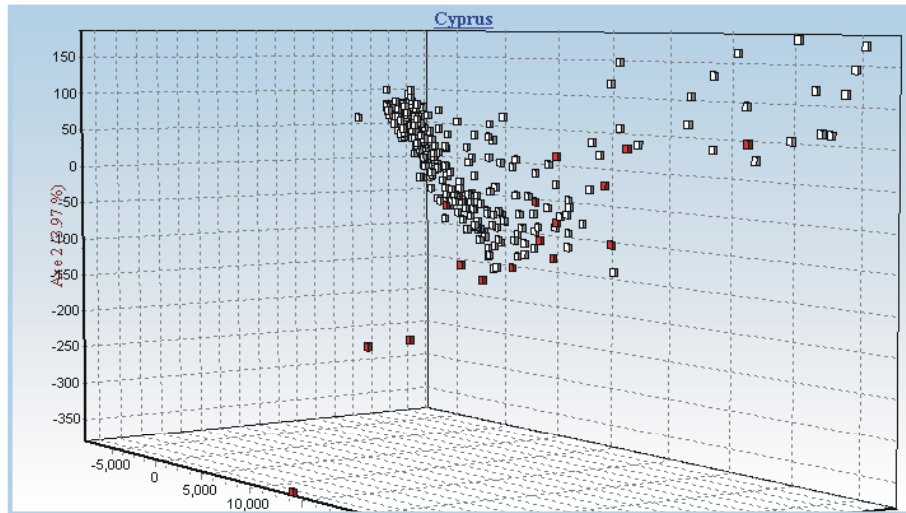
Εικόνα 9β: Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών (AFC). Στο πρώτο γράφημα παρουσιάζονται άτομα όλων των πληθυσμών της Ελλάδας που αναλύθηκαν με διαφορετικό χρώμα ο κάθε ένα. Στα επόμενα γραφήματα παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα τα άτομα από τους πληθυσμούς της Κρήτης που αναγράφονται στον τίτλο του γραφήματος σε σχέση με τα άτομα της υπόλοιπης Ελλάδας.



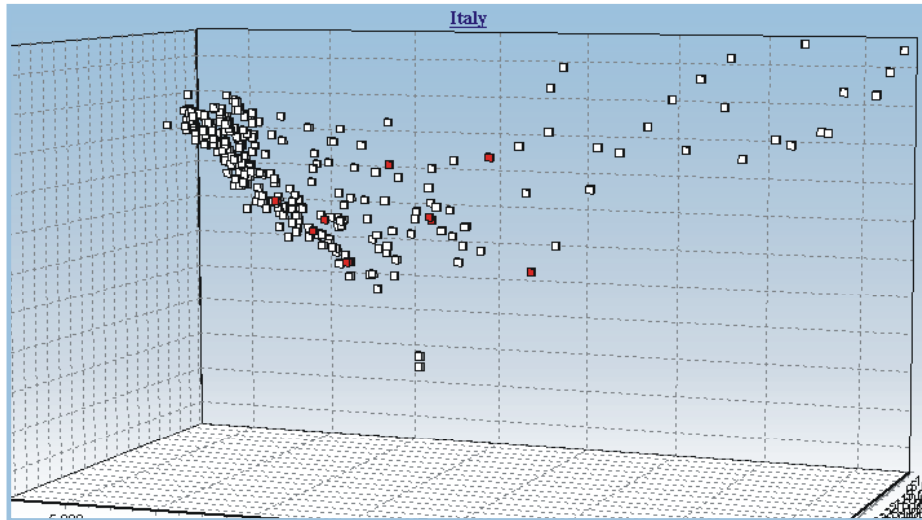
Εικόνα 9γ: Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών (AFC). Στα γραφήματα παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα τα άτομα από τους πληθυσμούς της Κρήτης που αναγράφονται στον τίτλο το γραφήματος σε σχέση με τα άτομα της υπόλοιπης Ελλάδας. Στο τελευταίο γράφημα παρουσιάζονται τα άτομα των πληθυσμών της Ανατολικής Μακεδονίας σε σχέση με τα άτομα υπόλοιπων πληθυσμών της Ελλάδας.



Εικόνα 9δ: Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών (AFC). Στα γραφήματα παρουσιάζονται τα άτομα πληθυσμών της Ελλάδας που αναλύθηκαν σε σχέση με τους υπόλοιπους πληθυσμούς της Ελλάδας. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα άτομα των πληθυσμών που αναφέρονται στον τίτλο του κάθε γραφήματος.



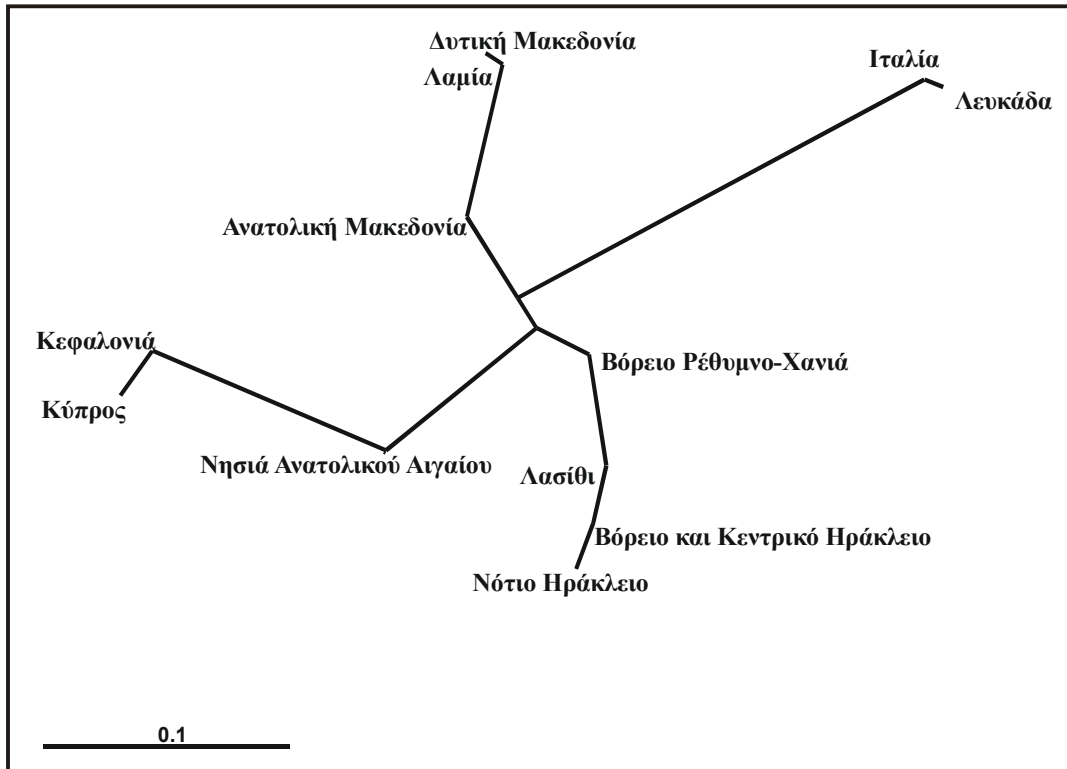
Εικόνα 9δ: Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών (AFC). Στα γραφήματα παρουσιάζονται τα άτομα πληθυσμών της Ελλάδας που αναλύθηκαν σε σχέση με τους υπόλοιπους πληθυσμούς της Ελλάδας. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται τα άτομα των πληθυσμών που αναφέρονται στον τίτλο του κάθε γραφήματος.



Εικόνα 9ε: Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών (AFC). Στο γράφημα παρουσιάζονται τα άτομα του δείγματος της Ιταλίας (κόκκινο χρώμα) σε σχέση με τα άτομα των πληθυσμών της υπόλοιπης Ελλάδας.

D \ θ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0.00662	0.03725	0.05328	0.20721	0.18315	0.11360	0.22511	0.20573	0.21975	0.24121	0.21984
2	0.00664	0	0.04591	0.08397	0.28056	0.24458	0.19001	0.22727	0.22249	0.26145	0.31663	0.31803
3	0.03796	0.04700	0	0.06114	0.18987	0.15927	0.05523	0.27436	0.22770	0.21496	0.20712	0.20368
4	0.05476	0.08771	0.06309	0	0.15291	0.12798	0.07612	0.20858	0.15260	0.14813	0.17018	0.10797
5	0.23220	0.32928	0.21056	0.16595	0	0.03905	0.13550	0.26291	0.18373	0.28155	0.11323	0.07063
6	0.20230	0.28048	0.17348	0.13695	0.03984	0	0.10019	0.24988	0.17190	0.26882	0.14001	0.07891
7	0.12059	0.21074	0.05681	0.07918	0.14561	0.10557	0	0.28762	0.22417	0.28745	0.16170	0.11649
8	0.25504	0.25782	0.32071	0.23392	0.30504	0.28753	0.33914	0	0.18913	0.36283	0.31305	0.29753
9	0.23033	0.25166	0.25838	0.16559	0.20302	0.18863	0.25382	0.20965	0	0.32073	0.27777	0.15496
10	0.24814	0.30307	0.24202	0.16032	0.33066	0.31310	0.33891	0.45071	0.38673	0	0.32230	0.14901
11	0.27604	0.38071	0.23208	0.18654	0.12017	0.15084	0.17638	0.37549	0.32541	0.38904	0	0.14074
12	0.24825	0.38277	0.22775	0.11426	0.07325	0.08220	0.12385	0.35316	0.16837	0.16136	0.15168	0

Πίνακας 10: Στον άνω τριγωνικό πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές θ (F_{ST}), ενώ στον κάτω τριγωνικό πίνακα οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών που αναλύθηκαν. Οι πληθυσμοί παρουσιάζονται με αριθμούς που αντιστοιχούν σε: 1=βόρειο και κεντρικό Ηράκλειο, 2=νότιο Ηράκλειο, 3=Λασιθί, 4=βόρειο Ρέθυμνο και Χανιά, 5=ανατολική Μακεδονία, 6=δυτική Μακεδονία, 7=Λαμία, 8=νησιά ανατολικού Αιγαίου, 9=Κύπρος, 10=Κεφαλονιά, 11=Λευκάδα και 12=Ιταλία.

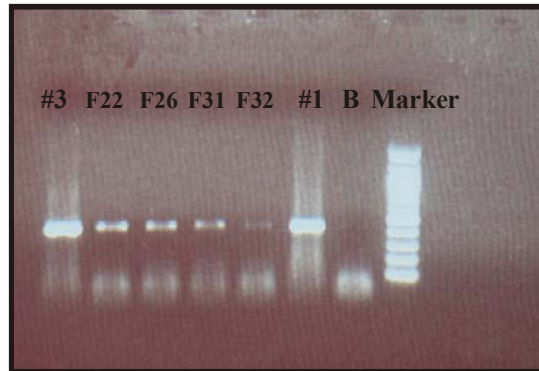


Εικόνα 10: Άρριζο ακτινωτό φυλογενετικό δέντρο με τη μέθοδο Σύνδεσης Γειτόνων (Neighbour Joining).

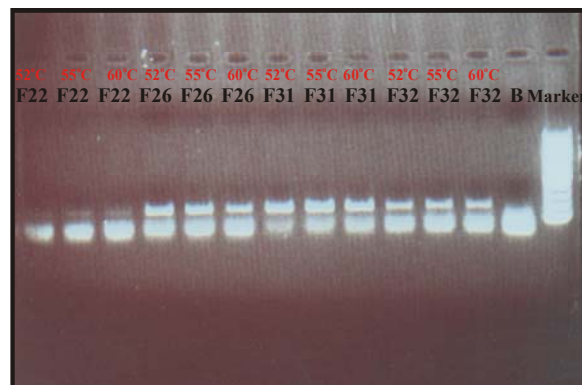
3.3 Αποτελέσματα από την ανάλυση των περιττωμάτων

Κατά τη διάρκεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού (PCR) είχαμε τον επιτυχή πολλαπλασιασμό τόσο του μιτοχondριακού DNA (D-loop) του λαγού (Εικόνα 11), όσο και του χλωροπλαστικού γονιδίου *rbcL* (Εικόνα 12). Η διαδικασία θα ολοκληρώνονταν με την κλωνοποίηση και αλληλούχηση αυτών των μορίων (είτε άμεσα για τη D-loop είτε μέσω κλωνοποίησης για το *rbcL*) και την εξαγωγή ύστερα από κατάλληλη ανάλυση, διαφόρων συμπερασμάτων που αφορούν τη φυλογένεση και ταυτοποίηση των λαγών, αλλά και τη διατροφή του. Ωστόσο, αυτό δεν αποτελούσε βασικό στόχο αυτής της μελέτης, όπως ήδη έχει διατυπωθεί στην εισαγωγή για το σκοπό αυτής της εργασίας, λόγω του περιορισμένου χρόνου. Παρόλα αυτά, είναι ένα εξαιρετικά σημαντικό γεγονός, αφού αφενός αποτελεί την πρώτη πετυχημένη προσπάθεια εξαγωγής και πολλαπλασιασμού DNA από τα περιττώματα στην Ελλάδα και αφετέρου ανοίγει τις προοπτικές για μια διαφορετική προσέγγιση της μελέτης των λαγών στην χώρα μας. Η προσέγγιση αυτή αφορά τόσο τη δυνατότητα εύκολης δειγματοληψίας, όσο και τη δυνατότητα που παρέχεται με τη χρήση της οικολογικής μεθόδου «σύλληψης-επανασύλληψης» για μελέτες πληθυσμιακών μεγεθών, αναπαραγωγικής συμπεριφοράς μέσω ταυτοποίησης σχέσεων γονέων-απογόνων, εκτίμηση βαθμού γενετικής συγγένειας σε συνάρτηση με το χώρο,

το ενδιαίτημα, τις εποχές κτλ. Τέλος θα καταστεί δυνατή η ακριβής μελέτη διατροφικών συνηθειών μέσω ποσοτικής εκτίμησης με τη βοήθεια της Real time PCR και τη χρήση γενικών εκκινητών χλωροπλαστικού DNA.



Εικόνα 11: Επιτυχής πολλαπλασιασμός mtDNA (D-loop) με ζεύγος ειδικών για το λαγό εκκινητών. Για τα άτομα #3 και #1 η εξαγωγή γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε από ιστό ενώ για τα άτομα F22, F26, F31 και F32 από περιττώματα λαγών που συλλέχθηκαν από την περιοχή Θραψανό του Νομού Ηρακλείου. Ο προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων έγινε με τη χρήση του μάρτυρα (Marker) Ladder 100bp. Το B αντιπροσωπεύει μία «τυφλή» αντίδραση (Blank), για τον έλεγχο πιθανής μόλυνσης των δειγμάτων.



Εικόνα 12: Επιτυχής πολλαπλασιασμός χλωροπλαστικού γονιδίου *rbcL* (υπομονάδα της RuBisCo) με ζεύγος γενικών εκκινητών. Η εξαγωγή DNA των ατόμων που παρουσιάζονται στο πήγμα πραγματοποιήθηκε από περιττώματα λαγών της περιοχής Θραψανό του Νομού Ηρακλείου. Για κάθε άτομο, πραγματοποιήθηκε PCR με διαβάθμιση θερμοκρασιών με σκοπό την διαπίστωση της βέλτιστη θερμοκρασίας για την παραγωγή του τμήματος DNA που επιλέχθηκε. Ο προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων έγινε με τη χρήση του μάρτυρα (Marker) Ladder 100bp. Το B αντιπροσωπεύει μία «τυφλή» αντίδραση (Blank), για τον έλεγχο πιθανής μόλυνσης των δειγμάτων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι δομή των φυσικών πληθυσμών αποτελεί αίτιο και αποτέλεσμα βραχυπρόθεσμων και μακροπρόθεσμων οικολογικών διαδικασιών. Τόσο οι περιβαλλοντικοί φραγμοί και οι ιστορικές διαδικασίες όσο και το πρότυπο ζωής των οργανισμών, μπορεί να διαμορφώσουν σε κάποιο βαθμό τη γενετική δομή των πληθυσμών. Επιπρόσθετα, οι γεωγραφικές κατανομές των ειδών καλύπτουν ευρύτερες γεωγραφικές αποστάσεις από αυτές που μπορούν να καλύψουν οι οργανισμοί με την ικανότητα διασποράς τους, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία διαφοροποιημένων πληθυσμών ως αποτέλεσμα της απομόνωσής τους λόγω απόστασης (Balloux *et al.* 2002, Burton *et al.* 2002).

Ο αριθμός των αλληλομόρφων που ανταλλάσσονται μεταξύ των πληθυσμών αντανακλάται στη γενετική δομή που εμφανίζουν. Το γεγονός αυτό έχει σημαντικές επιδράσεις στη γενετική σύσταση των ίδιων των ατόμων. Η ανταλλαγή γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών ομογενοποιεί τις αλληλικές συχνότητες μεταξύ αυτών και καθορίζει τις σχετικές επιδράσεις της επιλογής και της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης. Αυξημένη γονιδιακή ροή αποκλείει την εγκαθίδρυση αλληλομόρφων, που ευνοούνται κάτω από τις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες (τοπικές προσαρμογές) και αποτελεί εμπόδιο στις διαδικασίες προσαρμογής ειδογένεσης (Barton and Hewitt 1985). Από την άλλη πλευρά, η γονιδιακή ροή δημιουργεί καινούργιους πολυμορφισμούς στους πληθυσμούς και αυξάνει το τοπικό δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος. Αυτό προσδίδει στον πληθυσμό την ικανότητα αντίστασης σε τυχαίες αλλαγές των αλληλικών συχνοτήτων (αντίσταση στις διαδικασίες της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης), δημιουργώντας καινούργιους συνδυασμούς γονιδίων, πάνω στους οποίους μπορεί θεωρητικά να δράσει η φυσική επιλογή (Balloux *et al.* 2002).

4.1 Εύρος μεγέθους και αριθμός αλληλομόρφων

Το εύρος του μεγέθους των μικροδορυφορικών αλληλουχιών που πολλαπλασιάστηκαν παρουσιάζει κάποιες διαφορές σε σχέση με ήδη δημοσιευμένα δεδομένα. Πιο συγκεκριμένα οι τόποι Sat-2 και Sol-03 παρουσιάζουν μεγαλύτερο εύρος μεγέθους προϊόντος από αυτό που αναφέρεται στη βιβλιογραφία, σε διάφορες πληθυσμιακές μελέτες ειδών της οικογένειας Leporidae (Rico *et al.* 1994, Andersson *et al.* 1999, Surridge *et al.* 1999). Το γεγονός αυτό ίσως να αποτελεί ένδειξη μεγαλύτερου γενετικού πολυμορφισμού των πληθυσμών της Ελλάδας ιδιαίτερα για τον Sol-03, αφού τα δεδομένα για τον τόπο αυτό προέρχονται από τη γονοτύπηση μόνο ενός μικρού αριθμού των ατόμων της Ελλάδας. Για τους υπόλοιπους μικροδορυφορικούς τόπους, το εύρος που παρατηρείται είναι μεγαλύτερο από αυτό που παρατηρείται στα άτομα

λαγού της Ελλάδας. Στις αντίστοιχες μελέτες που αφορούν μόνο το γένος *Lepus* (Andersson *et al.* 1999, Fickel *et al.* 1999) το εύρος μεγέθους για τον τόπο Sat-2 και του Sat-8 είναι μικρότερο από αντίστοιχο που παρουσιάζουν οι πληθυσμοί της Ελλάδα, ενώ στις ίδιες μελέτες δεν δίνεται το αντίστοιχο εύρος για τον τόπο Sol-03, ώστε να μπορέσουμε να εξάγουμε ένα αντίστοιχο συμπέρασμα.

Όσον αφορά στον αριθμό αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο, τα βιβλιογραφικά δεδομένα σε επίπεδο οικογένειας (*Leporidae*) αποκαλύπτουν ότι αυτός είναι μεγαλύτερος στους πληθυσμούς της Ελλάδας μόνο για τους γενετικούς τύπους Sat-2 και Sat-12. Σε αντίστοιχα δεδομένα σε επίπεδο γένους (*Lepus*), οι γενετικοί τόποι για τους οποίους οι πληθυσμοί της Ελλάδας παρουσιάζουν μεγαλύτερο αριθμό αλληλομόρφων είναι οι Sat-2, Sat-12 και Sat-8 (Πίνακας 11).

Μικροδορυφορικοί τόποι	Βιβλιογραφικά δεδομένα	Δεδομένα παρούσας μελέτης
Sat-2	9	39
Sat-12	8	13
Sat-5	7	5
Sat-8	3	7
Sol-03	6	5
Sol-30	6	12

Πίνακας 11: Αριθμός αλληλομόρφων που παρατηρήθηκαν σε πληθυσμούς του γένους *Lepus* για τους 6 μικροδορυφορικούς τύπους που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη συγκριτικά με τα αντίστοιχα στοιχεία από τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Andersson *et al.* 1999, Fickel *et al.* 1999).

Τα δεδομένα αυτά δεν θα πρέπει να θεωρηθούν απόδειξη μεγαλύτερης ποικιλότητας των πληθυσμών της Ελλάδας έναντι αυτών της Γερμανίας και της Νότιας Σουηδίας (Andersson *et al.* 1999, Fickel *et al.* 1999), αφού τα πληθυσμιακά μεγέθη που μελετήθηκαν είναι κατά πολύ μικρότερα αυτών που μελετήθηκαν στην Ελλάδα.

4.2 Ομαδοποίηση των δεδομένων - Εκτίμηση πληθυσμιακών παραμέτρων

Οι πληθυσμοί που ομαδοποιήθηκαν στις τελικές αναλύσεις αποτελούν γεωγραφικές ενότητες τοπίου, γεγονός ενδεικτικό της συσχέτισης της απομόνωσης των πληθυσμών με τη γεωγραφική κατανομή τους. Ο ανεξάρτητος διαχωρισμός των μικροδορυφορικών τύπων, που αναλύθηκαν ενισχύει την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τη μελέτη του *L. europaeus* σε περιοχές της Γερμανίας (Fickel *et al.* 1999), η οποία

έλαβε χώρα με την ανάλυση μικροδορυφορικών τόπων και βάσει της οποίας δεν ήταν δυνατός ο διαχωρισμός των πληθυσμών της περιοχής.

Το έλλειμμα ετεροζυγωτίας που παρουσιάζεται συνολικά και στους τρεις μικροδορυφορικούς τόπους μπορεί να οφείλεται σε τέσσερις αιτίες. Η πρώτη είναι οι τόποι αυτοί να βρίσκονται κάτω από επιλογή γεγονός, όμως που είναι απίθανο να παρατηρηθεί για τρεις γενετικούς τόπους ταυτόχρονα. Η δεύτερη είναι η ύπαρξη μη πολλαπλασιαζόμενων, κατά την PCR, αλληλομόρφων (null alleles). Η ύπαρξη τέτοιου τύπου αλληλομόρφων είναι επιβεβαιωμένη για τον μικροδορυφορικό τόπο Sat-8 ενώ για του άλλους δύο τόπους (Sat-2, Sat-12) αποτελεί πιθανότητα. Επιπρόσθετα, η τεχνική της multiplex PCR ευνοεί την ύπαρξη null alleles (Broude *et al.* 2001) λόγω ανταγωνισμού. Οι άλλες δύο αιτίες είναι η ομομιξία εντός των πληθυσμών και η πληθυσμιακή υποδιαίρεση.

Αντίθετα, το πλεόνασμα ετεροζυγωτίας μπορεί να οφείλεται 1) σε φαινόμενα υπερκυριαρχίας (πλεονέκτημα του ετεροζυγώτη, overdominant selection), 2) στις συζεύξεις των ατόμων ενός πληθυσμού με άτομα άλλου πληθυσμού (outbreeding) και 3) σε φαινόμενου πληθυσμιακής στενωπού, δηλαδή σε πληθυσμούς που το δραστικό τους μέγεθος έχει μειωθεί πρόσφατα (στενωπός).

Η εξακρίβωση του ποιο από τα παραπάνω ενδεχόμενα ισχύει μπορεί να γίνει με επιπρόσθετα δεδομένα δημογραφίας.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, οι πληθυσμοί που εμφανίζουν έλλειμμα ετεροζυγωτίας (για όλους τους τόπους) είναι οι πληθυσμοί του Βόρειου και Κεντρικού Ηρακλείου, του Λασιθίου, του Βόρειου Ρεθύμνου-Χανίων, της Ανατολικής Μακεδονίας, της Δυτικής Μακεδονίας, των Ανατολικών Νησιών του Αιγαίου και της Κεφαλονιάς. Σύμφωνα με τα παραπάνω, το έλλειμμα αυτό μπορεί να οφείλεται στην υποδιαίρεση των πληθυσμών αυτών σε άλλους μικρότερους.

Πλεόνασμα ετεροζυγωτίας (για όλους τους τόπους) εμφάνισε μόνο ένας πληθυσμός, αυτός της Λευκάδας, γεγονός που πιθανά να οφείλεται στις συζεύξεις των ατόμων αυτών με άτομα διαφορετικών πληθυσμών, αφού σύμφωνα με πληροφορίες του Κυνηγετικού Συλλόγου του νησιού, υπάρχουν αναφορές για απελευθερώσεις λαγών στο νησί. Συγκεκριμένα υπάρχουν αναφορές απελευθέρωσης λαγών προερχόμενων από το Ζάγκρεμπ, αλλά και από εκτροφεία της Θεσσαλονίκης που κατά καιρούς έκαναν εισαγωγές από Ιταλία.

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με αντίστοιχη μελέτη πληθυσμών του *Lepus europaeus* και *Lepus timidus* (Andersson *et al.* 1999) στους οποίους παρατηρήθηκε έλλειμμα ετεροζυγωτίας, το οποίο αποδόθηκε στην παρουσία μηδενικών αλληλομόρφων (null alleles) εξαιτίας κάποιας μεταλλαγής στις θέσεις πρόσδεσης του εκκινητή.

Συχνότητες Αλληλομόρφων

Από την ανάλυση συχνότητων προέκυψαν αλληλόμορφα με μεγάλη συχνότητα, που είναι χαρακτηριστικά για ομάδες πληθυσμών, καθώς και ορισμένα μοναδικά αλληλόμορφα που εμφανίζουν κάποιοι πληθυσμοί (**Πίνακας 12**).

Πίνακας 12: Παρουσίαση αλληλομόρφων με τη μεγαλύτερη συχνότητα ανά πληθυσμό καθώς και των πληθυσμών που εμφανίζουν μοναδικά αλληλόμορφα. Οι αριθμοί που φαίνονται στις παρενθέσεις αντιπροσωπεύουν την συχνότητα των αλληλομόρφων εκφρασμένη σε ποσοστό.

Πληθυσμοί	Αλληλόμορφα με τη μεγαλύτερη συχνότητα			Μοναδικά αλληλόμορφα πληθυσμού		
	Sat-2	Sat-12	Sat-8	Sat-2	Sat-12	Sat-8
Βόρειο και Κεντρικό Ηράκλειο	233 (48.75%)	132 (46.49%)	94 (48.86%)	257 (1.25%)	127 (1.75%)	-
Νότιο Ηράκλειο	233 (63.89%)	132 (42.11%)	94 (55.56%)	-	-	-
Λασιίθι	233 (68.42%)	132 (39.47%)	98 (60%)	-	-	-
Βόρειο Ρέθυμνο-Χανιά	233 (23.68%)	132 (34.52%)	98 (42.19%)	241 (3.95%), 269 (1.32%)	122 (3.57%)	-
Ανατολική Μακεδονία	236 (31.03%)	136 (25.86%)	98 (89.06%)	250 (3.45%), 252 (1.72%)	144 (3.45%)	-
Δυτική Μακεδονία	234 (36.76%)	128 & 132 (19.05%)	98 (83.33%)	228 (2.94%), 260 (2.94%), 262 (2.94%), 268 (1.47%)	-	-
Λαμία	237 (50%)	132 & 134 (37.5%)	98 (83.33%)	273 (12.5%)	-	-
Νησιά Ανατολικού Αιγαίου	232 (31.67%)	120 (45%)	108 (57.14%)	-	-	-
Κύπρος	230 (36.11%)	116 (66.67%)	98 & 102 (21.88%)	224 (13.89%)	-	104 (12.5%)
Κεφαλονιά	233 (47.37%)	126 (81.58%)	98 (54.17%)	-	-	-
Λευκάδα	236 (50%)	124 (50%)	98 (81.82%)	272 (9.09%)	-	-

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι στις περισσότερες των περιπτώσεων είναι δυνατή η ομαδοποίηση των πληθυσμών της Κρήτης ως προς το αλληλόμορφο που εμφανίζουν με τη μεγαλύτερη συχνότητα.

Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών

Σύμφωνα με την Παραγοντική Ανάλυση Αντιστοιχιών παρατηρείται διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών. Κοιτάζοντας το τρισδιάστατο γράφημα (**Εικόνα 9**) της Ελλάδας μπορούμε να παρατηρήσουμε έναν σχηματισμό τύπου V. Σε τέτοιου είδους αναλύσεις, στις άκρες του σχηματισμού αυτού παρατηρούνται οι «πιο διαφοροποιημένες» μορφές πληθυσμών, ενώ στη βάση του οι ενδιάμεσες μορφές αυτών (Guttman effect Benzecri 1973). Στο δεξί άκρο διαφοροποίησης εμφανίζονται οι πληθυσμοί των Ανατολικών Νησιών του Αιγαίου και της Κύπρου ενώ στο αριστερό άκρο διαφοροποίησης οι πληθυσμοί της Κρήτης.

Υπάρχουν πληθυσμοί, μεταξύ των οποίων δεν εμφανίζονται ενδιάμεσα άτομα γεγονός ενδεικτικό της μεγάλης διαφοροποίησης που τους χαρακτηρίζει. Αντίθετα, υπάρχουν πληθυσμοί με μικρότερη διαφοροποίηση, με επικαλυπτόμενες κατανομές ατόμων. Πιο συγκεκριμένα, οι πληθυσμοί που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση, χωρίς να εμφανίζονται ενδιάμεσα άτομα, είναι αυτοί του βόρειου και κεντρικού Ηρακλείου με αυτούς της Λευκάδας, οι πληθυσμοί της Κύπρου με σχεδόν όλους τους υπόλοιπους πληθυσμούς, οι πληθυσμοί του νότιου Ηρακλείου με αυτούς της Λευκάδας, οι πληθυσμοί της Λαμίας με αυτούς της Ανατολικής Μακεδονίας, της Κεφαλονιάς και της Λευκάδας, οι πληθυσμοί της Κεφαλονιάς από αυτούς της Ιταλίας και τέλος οι πληθυσμοί των Νησιών του Ανατολικού Αιγαίου με αυτούς της Κεφαλονιάς και της Ιταλίας.

Όσον αφορά στα υπόλοιπα ζεύγη πληθυσμών, η ύπαρξη ατόμων μεταξύ τους μπορεί να αποτελεί είτε ένδειξη ανταλλαγής γενετικού υλικού, η οποία συμβαίνει στο παρόν ή συνέβη στο πρόσφατο παρελθόν, είτε συνέπεια πολύ παλαιότερης γονιδιακής ροής χωρίς να αποκλείεται η κοινή καταγωγή των πληθυσμών αυτών. Βέβαια, όσο μικρότερη είναι η διαφοροποίηση μεταξύ πληθυσμών, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των δεικτών που απαιτείται για τη σωστή κατάταξη των ατόμων σε σχέση με τον πληθυσμό προέλευσής του.

F-statistics

Η παράμετρος F_{ST} αποτελεί μέτρο της αρχής του Wahlund (**Wahlund 1928**) και αντιπροσωπεύει το έλλειμμα ετεροζυγωτίας που οφείλεται στην πληθυσμιακή υποδιαίρεση. Ο έλεγχος του κατά πόσο οι τιμές F_{ST} διαφέρουν σημαντικά από το μηδέν μπορεί να γίνει είτε με την εκτίμηση της τυπικής απόκλισης των τιμών αυτών είτε με exact tests γενετικής διαφοροποίησης.

Όσον αφορά τη βιολογική ερμηνεία που δίδεται στην παράμετρο F_{ST} έχουν υποβληθεί οι τιμές από 0 (0%) έως 0.05 (5%) ως ένδειξη μικρής γενετικής διαφοροποίησης, οι τιμές από 0.05(5%) έως 0.15 (15%) ενδεικτικές μέτριας διαφοροποίησης, οι τιμές από 0.15 (15%) έως 0.25 (25%) ενδεικτικές μεγάλης διαφοροποίησης και τέλος οι τιμές πάνω από 0.25 (25%) ως ένδειξη πολύ μεγάλης γενετικής διαφοροποίησης (Wright 1978, Hartl and Clark 1997). Ενώ τέτοιου είδους ερμηνείες μπορεί να αληθεύουν, υπάρχει ωστόσο η πιθανότητα να μην αντιπροσωπεύουν την πραγματική πληθυσμιακή διαφοροποίηση. Για παράδειγμα η αναμενόμενη τιμή της παραμέτρου F_{ST} κάτω από το καθεστώς ολοκληρωτικής απομόνωσης δεν είναι πάντα η μονάδα. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων δεν είναι 1 γιατί η επίδραση του ομοπλασιακού πολυμορφισμού (εξαιτίας των μεταλλαγών) έχει ως αποτέλεσμα την υποεκτίμηση των τιμών F_{ST} σε μεγάλο βαθμό (Wright 1978 από Balloux *et al.* 2002, Charlesworth 1998, Nagylaki 1998, Hedrick 1999). Επομένως ένα φαινομενικά χαμηλό F_{ST} της τάξεως του 0.05 (5%) μπορεί στην πραγματικότητα να είναι ένδειξη σημαντικής γενετικής διαφοροποίησης. Η άποψη αυτή έχει ήδη διατυπωθεί από τον Wright (1978), σύμφωνα με την οποία η διαφοροποίηση δεν είναι σε καμία περίπτωση αμελητέα όταν οι τιμές F_{ST} είναι μικρές, όπως η τιμή 0.05 (5%) ή ακόμα και μικρότερες από αυτή. Επιπλέον ο στατιστικός έλεγχος με τη μέθοδο Markow chain για τη σημαντικότητα των τιμών F_{ST} είναι τόσο πιο αποτελεσματικός όσο μεγαλύτερος είναι ο πολυμορφισμός με αποτέλεσμα και πολύ μικρές τιμές F_{ST} να αποδεικνύονται στατιστικά σημαντικές. Τέτοια περίπτωση αποτελούν οι μικροδορυφορικοί τόποι οι οποίοι επομένως επιτρέπουν να ξεχωρίσουμε την πολύ μικρή διαφοροποίηση από τη μηδενική διαφοροποίηση.

Η μέγιστη τιμή F_{ST} που παρατηρήθηκε μεταξύ των υπό εξέταση πληθυσμών των λαγών της Ελλάδας αφορούν στους πληθυσμούς της Κεφαλονιάς και της Λευκάδας (32.23%). Οι πληθυσμοί αυτοί σύμφωνα με τα παραπάνω, παρουσιάζουν μεγάλη διαφοροποίηση, με αποτέλεσμα το 1/3 περίπου της παρατηρούμενης γενετικής ποικιλότητας να οφείλεται στην έλλειψη γονιδιακής ροής μεταξύ τους. Αντίθετα οι πληθυσμοί που παρουσιάζουν την ελάχιστη τιμή F_{ST} είναι αυτοί του Βόρειου και Κεντρικού Ηρακλείου με αυτούς του Νοτίου Ηρακλείου (0.662%). Η μέση τιμή της παραμέτρου F_{ST} των πληθυσμών της Κρήτης με αυτούς της υπόλοιπης Ελλάδας παρουσιάζεται στον Πίνακα 13. Από τον πίνακα αυτό παρατηρούμε ότι οι πληθυσμοί που παρουσιάζουν τη μέγιστη διαφοροποίηση από αυτούς της Κρήτης είναι οι πληθυσμοί των Νησιών του Ανατολικού Αιγαίου γεγονός που ενισχύει την υπόθεση των δύο διαφοροποιημένων άκρων που το ένα αποτελούν οι πληθυσμοί της Κρήτης και το άλλο τα Νησιά του Ανατολικού Αιγαίου και κάποιοι πληθυσμοί της Κύπρου. Οι πληθυσμοί που παρουσιάζουν την ελάχιστη διαφοροποίηση με αυτούς της Κρήτης είναι οι πληθυσμοί της Λαμίας γεγονός που πιθανά οφείλεται στον μικρό αριθμό ατόμων της Λαμίας.

Πίνακας 13: Μέση τιμή του F_{ST} μεταξύ των πληθυσμών της Κρήτης και αυτών της υπόλοιπης Ελλάδας

Πληθυσμοί	Μέση τιμή F_{ST} σε σχέση με τους πληθυσμούς της Κρήτης
Ανατολική Μακεδονία	0.2076375
Δυτική Μακεδονία	0.178745
Λαμία	0.10874
Νησιά Ανατολικού Αιγαίου	0.23383
Κύπρος	0.20213
Κεφαλονιά	0.2110725
Λευκάδα	0.233785
Ιταλία	0.21238

Η διαφοροποίηση που παρατηρείται μεταξύ των πληθυσμών της Κρήτης αποτελεί πιθανώς συνέπεια της απομόνωσής τους, εξαιτίας των εμποδίων στη διασπορά τους που παρουσιάζουν οι τέσσερις ορεινοί όγκοι της Κρήτης στην ευρύτερη περιοχή των οποίων πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία. Τα Αστερούσια στο νότο του Νομού Ηρακλείου, που διαφοροποιούν τον πληθυσμό αυτών από τον αντίστοιχο του Βόρειου Ηρακλείου, η Δίκη για το Νομό Λασιθίου, Ο Ψηλορείτης για το Ρέθυμνο και τα Λευκά Όρη για τα Χανιά. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη μελέτη των [Burton et al.\(2002\)](#) σύμφωνα με την οποία τα φυσικά εμπόδια (βουνά $\cong 1200\text{m}$ υψόμετρο) της περιοχής μελέτης τους δεν αποτελούσαν εμπόδια για το λαγό, αφού η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε μεταξύ αυτών δεν ήταν σημαντική.

Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν πολύ μικρή γονιδιακή ροή σε σχέση με τη φυσική δυνατότητα διασποράς των ζώων, γεγονός που ισχύει γενικότερα στο ζωικό και φυτικό Βασίλειο ([Endler 1997](#)) στη συγκεκριμένη όμως περίπτωση φαίνεται πως πρόκειται για μια μάλλον ακραία περίπτωση αφού ακόμα και γειτονικοί μεταξύ τους πληθυσμοί χαρακτηρίζονται από σχετικά μικρή γονιδιακή ροή.

Γενικεύοντας τα αποτελέσματα για τον *Lepus europaeus* της Ελλάδας διαπιστώνουμε ότι εμφανίζει σχετικά υψηλό βαθμό ποικιλότητας, σε αντίθεση με την εικόνα που παρουσιάζεται στις εργασίες των [Andersson et al. \(1999\)](#) και [Burton et al. \(2002\)](#), όπου στην πρώτη μελέτη η ανάλυση μικροδορυφορικών αλληλουχιών παρουσιάζει χαμηλό επίπεδο ποικιλότητας μεταξύ των ειδών *Lepus timidus* και *Lepus europaeus*, ενώ στη δεύτερη μελέτη η μεταξύ των πληθυσμών του είδους *Lepus americanus* ποικιλότητα είναι και πάλι χαμηλότερη ($\theta = 0-0.06.2$). Το γεγονός της μεγαλύτερης διαφοροποίησης του Ευρωπαϊκού λαγού στη Βαλκανική χερσόνησο σε σχέση με την αντίστοιχη των χωρών της Βόρειας και Κεντρικής Ευρώπης επιβεβαιώνει το ρόλο της

Ελλάδας ως καταφύγιο κατά τη διάρκεια των Παγετώνων. Είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια των Παγετώνων οι λαγοί όπως και πολλοί άλλοι οργανισμοί έβρισκαν «καταφύγιο» στη Νότια Ευρώπη που ήταν λιγότερο επηρεασμένη από τους πάγους. Από εκεί είχαμε επανεποίηση της Βόρειας και Κεντρικής Ευρώπης μετά το λιώσιμο των πάγων. Το φαινόμενο αυτό αναμένουμε να δημιουργεί μια σημαντική πτώση της ποικιλομορφίας στους νέους πληθυσμούς συγκρινόμενος με τους προγονικούς πληθυσμούς (καταφύγιο) (Hewitt 1999).

Φυλογενετικό δέντρο

Τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν από το φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 10) βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της Παραγοντικής Ανάλυσης Αντιστοιχιών.

Η φυλογενετική ανάλυση των πληθυσμών, βάσει των τριών μικροδορυφορικών τόπων, αποκαλύπτει τη γεωγραφική τους απομόνωση. Οι νησιωτικοί πληθυσμοί παρουσιάζουν έντονη διαφοροποίηση σε σχέση με τους ηπειρωτικούς πληθυσμούς.

Τρεις είναι οι κύριοι κλάδοι που παρουσιάζονται στο φυλογενετικό δέντρο της Εικόνας 10. Ο πρώτος περιλαμβάνει τους πληθυσμούς της Κρήτης, ο δεύτερος τους πληθυσμούς των Νησιών του Ανατολικού Αιγαίου, της Κύπρου και της Κεφαλονιάς και ο τρίτος τους πληθυσμούς της ηπειρωτικής Ελλάδας.

Όσον αφορά στους νησιώτικους πληθυσμούς (πρώτος και δεύτερος κλάδος) έχουμε τη διάκριση δύο μεγάλων ομάδων. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει την Κύπρο που συνδέεται με την Κεφαλονιά και στη συνέχεια με τα Νησιά του Ανατολικού Αιγαίου και η δεύτερη ομάδα τους πληθυσμούς της Κρήτης. Εξάριση στην ομαδοποίηση των νησιωτικών πληθυσμών αποτελεί η περίπτωση της Λευκάδας, για την οποία υπάρχουν αναφορές όπως έχει ήδη αναφερθεί, απελευθερώσεων ατόμων από άλλες περιοχές της Ευρώπης (εκτός Ελλάδας).

Ένα από τα ερωτήματα που προκύπτουν είναι η προέλευση του πρόγονου των νησιωτικών πληθυσμών. Η απάντηση στο ερώτημα αυτό μπορεί να δοθεί με τον προσδιορισμό της ταυτότητας των νησιωτικών πληθυσμών (Κρήτη και άλλα νησιά του Αιγαίου) ως ανατολικού ή δυτικού τύπου. Αν για παράδειγμα προσδιοριστεί ότι οι λαγοί της Κρήτης είναι δυτικού τύπου, αυτομάτως θεωρούμε την προέλευση των λαγών της Κρήτης από προγονικούς δυτικού τύπου λαγούς που υπάρχουν στην ηπειρωτική Ελλάδα. Ωστόσο, η απάντηση στο ερώτημα αυτό είναι πολύ δύσκολο να δοθεί με βεβαιότητα από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης.

Σύμφωνα με τη μελέτη των *Kasapidis et al.* (υποβληθέντα δεδομένα), οι πληθυσμοί των Νησιών του Ανατολικού Αιγαίου, της Κύπρου και της Ανατολικής Μακεδονίας (Θράκης) περιέχουν λαγούς «ανατολικού τύπου» ως προς τον απλότυπο του μιτοχονδριακού τους DNA. Η θέση της Κεφαλονιάς στον κλάδο αυτό είναι πιθανή ένδειξη ύπαρξης λαγών «ανατολικού τύπου»

στο νησί ίσως από παλαιότερες μεταφορές. Η Κρήτη σύμφωνα με την ίδια μελέτη περιλαμβάνει λαγούς «δυτικού τύπου». Ωστόσο, έχοντας υπόψη μας την Εικόνα 9 όπου απεικονίζεται η παραγοντική ανάλυση συνιστωσών διαπιστώνουμε ότι η Κρήτη και τα ανατολικά καταλαμβάνουν τα δύο άκρα του V. Δεδομένης της παρουσίας του «ανατολικού τύπου» στα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου και των δύο τύπων στη Μακεδονία (στη βάση του V), μπορούμε να θεωρήσουμε την Κρήτη ως δυτικού τύπου, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της μελέτης των *Kasapidis et al.* (υποβληθέντα δεδομένα). Αναλόγως, η διαφοροποίηση της Δυτικής Μακεδονίας και της Στερεάς Ελλάδας από την Ανατολική Μακεδονία, πιθανώς να οφείλεται στην ύπαρξη λαγών «ανατολικού τύπου» στην περιοχή της Ανατολικής Μακεδονίας αν και αυτό αντιπροσωπεύει ένα πολύ μικρό ποσοστό στην περιοχή αυτή, τουλάχιστον με βάση το mtDNA.

Συμπερασματικά, από την ανάλυση των τριών μικροδορυφορικών δεν είναι δυνατός ο απόλυτος καθορισμός των πληθυσμών της Κρήτης σε μία ομάδα ανατολικού ή δυτικού τύπου. Μόνο κάποιες εικασίες μπορούν να γίνουν. Αυτό οφείλεται είτε στο γεγονός ότι οι τρεις μικροδορυφορικοί τόποι δεν είναι αρκετοί για να το καθορίσουν, είτε σε στοχαστικές διαδικασίες δειγματοληψίας στις οποίες δεν περιλαμβάνονταν άτομα που θα μπορούσαν να ταξινομηθούν στον «δυτικό τύπο» λαγών. Για να επιτευχθεί με βεβαιότητα αυτό χρειάζεται η ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού ατόμων συγχρόνως για mtDNA και μικροδορυφορικούς τόπους ώστε να διαπιστωθεί ο τρόπος που σχετίζονται οι δύο τύποι σημαντών. Μια τέτοια ανάλυση αποσκοπεί στην εύρεση ή όχι διαφοροποίησης των λαγών σε μικροδορυφορικό επίπεδο αντίστοιχης αυτής που προκύπτει από το μιτοχονδριακό επίπεδο.

Ωστόσο είναι δυνατός ο διαχωρισμός πληθυσμών διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης (ηπειρωτικής και νησιώτικης).

Ο βαθμός ποικιλομορφίας, όπως αυτός εκτιμήθηκε από τον αριθμό των αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο και η αναμενόμενη ετεροζυγωτία είναι συγκρίσιμα με αυτούς που αναφέρονται σε μικροδορυφορικές αλληλουχίες μικροθηλαστικών (*Crocidura russula* *Favre et al.* 1997, *Balloux et al.* 1998, *Oryctolagus cuniculus* *SurrIDGE et al.* 1999, *Clethrionomys glareolus* *Gerlach and Musof* 2000, *Dicrostonyx groenlandicus* *Ehrlich et al.* 2001) αν και η αξιοπιστία τέτοιων συγκρίσεων έχει αμφισβητηθεί διότι οι τόποι με χαμηλό πολυμορφισμό συνήθως δεν αναφέρονται (*Goossens et al.* 2000).

Το πρότυπο απομόνωσης λόγω απόστασης έχει επίσης παρατηρηθεί σε άλλα μικρά και μεσαίου μεγέθους θηλαστικά όπως στη μυγαλή (*Crocidura russula* *Favre et al.* 1997), την Αλπική μαρμότα (*Marmota marmota* *Goossens et al.* 2001), *Gulo gulo* (*Kyle and Strobeck* 2001), *Martes americana* (*Kyle et al.* 2000) τον σκίουρο *Spermophilus brunneus brunneus* (*Gavin et al.* 1999) και το οικιακό ποντίκι *Mus musculus* (*Dallas et al.* 1995). Αντιθέτως το φαινόμενο αυτό

δεν παρατηρήθηκε στο Ευρωπαϊκό κουνέλι (*Oryctolagus cuniculus* Fuller *et al.* 1996, 1997, Surridge *et al.* 1999).

4.3 Συμπεράσματα

1. Οι υπό μελέτη πληθυσμοί παρουσιάζουν σχετικά υψηλή ποικιλότητα με αναμενόμενη ετεροζυγωτία $H_e = 0.6881$ και μέση τιμή αλληλομόρφων $A = 6.66$.
2. Δεν παρατηρείται ομοιογένεια των αλληλικών συχνοτήτων, υπάρχει δηλαδή έντονη γενετική δομή, γεγονός που αντικατοπτρίζεται από τις υψηλές τιμές F_{ST} και ερμηνεύεται από τη μειωμένη ανταλλαγή αλληλομόρφων των υπό μελέτη πληθυσμών. Η διαφοροποίηση αυτή αντικατοπτρίζει τη γενετική απομόνωση των πληθυσμών που μελετήθηκαν.
3. Η μικρή γονιδιακή ροή που παρατηρείται πιθανά οφείλεται όχι μόνο σε απόλυτους φραγμούς (νησιά) αλλά τόσο στη γεωγραφική απόσταση όσο και σε δημογραφικούς παράγοντες. Το τελευταίο έχει ενδιαφέρον για ένα ζώο με τέτοια μεγάλη δυνατότητα διασποράς στο οποίο παρατηρούνται σημαντικές τιμές F_{ST} και μεταξύ κοντινών γεωγραφικά πληθυσμών, χωρίς να υπάρχει κάποιος εμφανής γεωγραφικός φραγμός. Επίσης ενδιαφέρον παρουσιάζει η απουσία ουσιαστικής γενετικής δομής για το ίδιο είδος, στην κεντρική και βόρεια Ευρώπη. Συμπεραίνουμε μετά από αυτό ότι επικρατούν διαφορετικοί δημογραφικοί παράμετροι στη Βαλκανική έναντι της κεντρικής και βόρειας Ευρώπης.
4. Η φυλογενετική ανάλυση των πληθυσμών ομαδοποιεί όλους τους νησιωτικούς πληθυσμούς έναντι των ηπειρωτικών κατά τρόπο που δεν μπορεί να εξηγηθεί εύκολα με την επίκληση ιστορικών παραγόντων και μόνο.
5. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με μελέτη πληθυσμών του είδους στην Ελλάδα με mtDNA (RFLPs, COI) (Mamuris *et al.* 2001, Kasapidis *et al.* υποβληθέντα δεδομένα). Στις μελέτες αυτές, η ύπαρξη αυξημένης ποικιλομορφίας σε σχέση με άλλους πληθυσμούς της Ευρώπης ενισχύει την υπόθεση ότι η Βαλκανική χερσόνησος λειτούργησε ως καταφύγιο για τους λαγούς κατά την περίοδο των Παγετώνων.
6. Τα δεδομένα μας σε συνδυασμό με δεδομένα από μιτοχονδριακό DNA δείχνουν ότι ο περιορισμός της γονιδιακής ροής αφορά και τα δύο φύλα σε αντίθεση με οικολογικές παρατηρήσεις διαφορικής διασποράς των δύο φύλων.

4.4 Προοπτικές

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, κρινόμενα ικανοποιητικά στο επίπεδο αυτό και ενθαρρυντικά για την συνέχειά του, μπορούν να θεωρηθούν ως το εναρκτήριο βήμα για την

ολοκλήρωση της μελέτης της γενετικής δομής και της φυλογένεσης του είδους *Lepus europaeus* στον Ελλαδικό χώρο. Στα μελλοντικά σχέδια περιλαμβάνεται η μελέτη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων τόσο για μεγαλύτερο αριθμό δεικτών μικροδορυφορικού DNA όσο και για αλληλουχίες μιτοχονδριακών γονιδίων. Για την αύξηση του αριθμού των δεικτών προβλέπεται να γίνει και ανάπτυξη ειδο-ειδικών μικροδορυφορικών τόπων, με την κατασκευή εμπλουτισμένης γενωμικής βιβλιοθήκης, και την ανάπτυξη δεικτών για το Υ χρωμόσωμα.

Η συνδυασμένη μελέτη των μικροδορυφορικών αλληλουχιών με το μιτοχονδριακό DNA του είδους θα συνεισφέρει τόσο στην οριοθέτηση των πληθυσμών της Ελλάδας όσο και της σχέσης τους με γειτονικούς πληθυσμούς, όπως αυτοί της Γιουγκοσλαβίας, της Βουλγαρίας και της Τουρκίας. Θα απαντήσει επίσης σε ερωτήματα σε σχέση με την πιθανή προέλευση των λαγών της χώρα μας.

Ο λαγός εξαιτίας της παρουσίας του σε ποικιλία ενδιαιτημάτων, αποτελεί ένα καταπληκτικό μοντέλο μελέτης των ειδικών προσαρμογών και των σχέσεων DNA και φαινοτύπου. Βρίσκεται σε στάδιο οργάνωσης η δημιουργία τράπεζας ιστών και ανάπτυξης μεγάλου αριθμού μοριακών δεικτών με στόχο τη μελέτη της κατανομής της ποικιλομορφίας σε σχέση με συγκεκριμένους τύπους ενδιαιτημάτων. Παράλληλη προσέγγιση αποτελεί η στοχευμένη μελέτη πολυμορφικών υποψήφιων γονιδίων (candidate genes) τα οποία χαρακτηρίζονται ως τέτοια από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στον άνθρωπο και στα ποντίκια.

Επιπρόσθετα, η δυνατότητα ανάκτησης γενετικού υλικού από τα περιττώματα λαγών θα αποτελέσει το εναρκτήριο βήμα ερευνών με στόχο τους την έμμεση παρακολούθηση (monitoring) τόσο των πληθυσμών του λαγού όσο και άλλων ειδών μικροθηλαστικών, η άμεση παρατήρηση των οποίων κρίνεται αδύνατη.

Σε μικρογεωγραφικό επίπεδο, η πυκνή δειγματοληψία κοπράνων και ιστών από καθορισμένες περιοχές και η ταυτόχρονη χρήση μεγάλου αριθμού δεικτών θα επιτρέψει την προσέγγιση ερωτημάτων που είναι δύσκολο να προσεγγισθούν διαφορετικά. Τα ερωτήματα αυτά αφορούν την κοινωνική οργάνωση στο χώρο (σε συνάρτηση με το βαθμό συγγένειας) χωριστά για το κάθε φύλο, καθώς και την εκτίμηση του *census* πληθυσμιακού μεγέθους βάσει της μεθόδου «σύλληψης – επανασύλληψης» δια της ταυτοποίησης ενός ατόμου σε διαφορετικές δειγματοληψίες μέσω της ταυτοποίησης των κοπράνων του. Η εκτίμηση του δραστικού μεγέθους του πληθυσμού μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους όπως αυτή της αναζήτησης του ποσοστού των ομοθαλών αδελφών με αποτέλεσμα την εκτίμηση του ελάχιστου πατρικού πληθυσμού (“minimum parental population”) (π.χ. [Herbinger et al. 1997](#)). Ο λόγος του δραστικού πληθυσμιακού μεγέθους έναντι του φυσικού (*census*) αποτελεί δείκτη της «υγείας»

του πληθυσμού (Frankham 1995) αποτελώντας χρήσιμο δείκτη διαχειριστικών αποφάσεων. Η απουσία από τη βιβλιογραφία δεδομένων σύγκρισης τόσο διαφορετικών ενδιαιτημάτων όσο της συνδυαστικής προσέγγισης τους με διαφορετικές πληθυσμιακές πυκνότητες καθιστά αναγκαία μια τέτοιου είδους προσέγγιση οι βάσεις της οποίας έχουν δρομολογηθεί από την παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα καθορίστηκαν δύο περιοχές μελέτης που παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα τόσο των πληθυσμιακών πυκνοτήτων όσο και προτιμήσεων ενδιαιτήματος.

Επιπρόσθετα, η ανάλυση τμήματος του Μέγιστου Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC) σε επίπεδο DNA, θα επιτρέψει την εξακρίβωση του κατά πόσο οι συζεύξεις που πραγματοποιούνται είναι τυχαίες ή καθορισμένες, καθώς η μη τυχαιότητα των συζεύξεων σε σχέση με τους γονότυπους στο σύστημα αυτό έχει παρατηρηθεί τόσο σε θηλαστικά όσο και σε ψάρια. Ένας μεγάλος αριθμός ερωτημάτων μπορεί να προσεγγιστεί με τη χρήση μικροδορυφορικών αλληλουχιών και την ανάλυση κοπράνων. Για παράδειγμα ένα ερώτημα που προκύπτει σε πληθυσμούς που αναπαράγονται καθόλη τη διάρκεια του χρόνου και σε περιπτώσεις πολλαπλών γεγονότων κυοφορίας (όπως στην Ελλάδα), είναι η «πιστότητα» ή μη των ζευγαριών που αναπαράγονται. Τέτοιου είδους πληροφορία κρίνεται πολύ σημαντική όσον αφορά στις συνέπειές της στο δραστικό μέγεθος και τη γενετική δομή των πληθυσμών. Τέτοιου είδους δεδομένα επιτρέπουν την κατανόηση επίδρασης επιμέρους δημογραφικών παραμέτρων (μηχανισμοί αναπαραγωγής, αναγνώριση οικείων) στην πληθυσμιακή δομή και εξέλιξη.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Akkaya, M.S., Bhagwat A.A. and Cregan, P.B. 1992. Length polymorphisms of simple sequences repeat DNA in Soybean. *Genetic.*, **132**: 1131-1139.
2. Alves, P.C. and Ferrand, N. 1999. Genetic variability in Portuguese populations of the Iberian hare, *Lepus granatensis*. *Folia Zool.*, **48** (Suppl. 1): 3-10.
3. Alves, P.C., Branco, M., Matias, O. and Ferrand, N. 2000. New genetic variation in European hares, *Lepus granatensis* and *L. europaeus*. *Biochemical Genetics*, **38** (3/4): 87-96.
4. Andersson, A-C, Thulin, C-G and Tegelström, H. 1999. Applicability of rabbit microsatellite primers for studies of hybridization between an introduced and a native species. *Hereditas*, **130**: 309-315.
5. Angermann, R. 1983. The taxonomy of Old World *Lepus*. *Acta Zoologica Fennica*, **174**: 17-21.
6. Angermann, R., Flux, J. and Smith, A. 1990. Lagomorph classification. In J., Chapman and J., Flux (eds.), *Rabbits, Hares and Pikas, Status Survey and Conservation Action Plan*, IUCN, Switzerland, p.7.
7. Arnold, H.R. 1993. Atlas of mammals in Britain. ITE research publ. No. 6. London, HMSO pp. 1-145.
8. Balloux, F. and Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* **11**: 155-165.
9. Bastin, C., B, Benzécri, J. P., Bourgarit, CH. And Cazes, P. 1980. Abrégé Théorique. Etudes de Cas Modèle. Paris: Dunod.
10. Beckmann, J.S. and Weber, J.L. 1992. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, **12**: 627-631.
11. Belkhir, K., Borsa, P., Goudet, J., Chikhi, L. and Bonhomme, F. 1996-1998: GENETIX, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, France*.
12. Benzécri, J. P. 1973. L'Analyse des Données: T.2, l'Analyse des correspondances. Paris: Dunod.
13. Biju-Duval, C., Ennafaa, H., Dennebouy, N., Monnerot, M., Mignotte, F., Soriguer, R. C., Gaaïed, A.E., Hili, A.E., and Mounolou, J-C. 1991. Mitochondrial DNA evolution in Lagomorphs: Origin of Systematic Heteroplasmy and Organization of diversity in European rabbits. *J.Mol.Evol.*, **33**: 92-102.
14. Bonhomme, F., Fernandez, J., Palacios, F., Catalan, L. and Machordon, A. 1986. Caractérisation biochimique du complexes d'espèces du genre *Lepus* en Espagne. *Mammalia*, **50**:

495-506.

15. **Boom,R., Sol,C., Beld,M., Weel,J., Goudsmit,J., van Dillen,W.P., 1999.** Improved Silica-Guanidiniumthiocyanate DNA Isolation Procedure Based on Selective Binding of Bovine Alpha-Casein to Silica Particles. *Journal of Clinical Microbiology*, **37(3)**: 615-619.
16. **Boom,R., Sol,C.J.A., Salimans,M.M.M., Jansen,C.L., Wertheim-vanDillen,P.M.E., Noordaa,J.v.d., 1990.** Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, **28(3)**: 495-503.
17. **Branco, M., Ferrand, N., and Monnerot, M. 2000.** Phylogeography of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in the Iberian Peninsula inferred from RFLP analysis of the cytochrome *b* gene. *Heredity*, **85**: 307-317.
18. **Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V. P., Thirion, J., Hudson, T., Sohn, R., Zemelman, B., Snell, R. G., Rundle, S. A., Crow, S., Davies, J., Shelbourne, P., Buxton, J., Jones, C., Juvonen, V., Johnson, K., Harper, P. S., Shaw D. J. and Housman, D.E. 1992.** Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, **68**: 799-808.
19. **Brooker, A.L., Cook, D., Bentzen, P.,Wright J.M. and Doyle, R.W. 1994.** Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **51(9)**: 1959-1966.
20. **Broude, N.E., Zhang, L., Woodward, K., Englert, D., and Cantor, C.R. 2001.** Multiplex allele-specific target amplification based on PCR suppression. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA*, **98(1)**: 206-211.
21. **Brown, T. A., & Brown, K. A. 1994.** Ancient DNA: Using molecular biology to explore the past. *BioEssays*, **16**: 719-726.
22. **Brown, W. M., George, M.jr., Wilson, A. C. 1979.** Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 1967-1971.
23. **Burton, C., Krebs,C.J., and Taylor, E.B. 2002.** Population genetic structure of the cyclic snowshoe hare (*Lepus americanus*) in southwestern Yukon, Canada. *Molecular Ecology*, **11**: 1689-1701.
24. **Burton, N.H. and Hewitt, G.M., 1985.** Analysis of hybrid zones. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **16**: 113-148.
25. **Buxton, J., Shelbourne, P., Davies, J., Jones, C., Van Tongeren, T., Aslanidis, C., Jong, P.,Jansen, G., Anvert, M., Riley, B., Williamson R. and Johnson, K. 1992.** Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature*, **355**: 547-

548.

26. **Chapman, J.A., and Flux, J.E.C. 1990.** Introduction and overview of the Lagomorphs. In J.A., Chapman and J.E.C., Flux (eds.) *Rabbits, Hares and Pikas, Status Survey and Conservation Action Plan*, IUCN, Gland, Switzerland, pp. 1-6.
27. **Charlesworth, B. 1998.** Measures of divergence between populations and the effect of forces that reduce variability. *Mol.Biol.Evol.*, **15**: 538-543.
28. **Condit, R. and Hubbell, S.P. 1991.** Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome*, **34**: 66-71.
29. **Constable, J.J., Packer, C., Collins, D.A. and Pusey, A.E. 1995.** Nuclear DNA from primate dung. *Nature*, **373**: 393.
30. **Corbet, G.B. 1983.** A review of the classification in the family Leporidae. *Acta Zool. Fennica*, **174**: 11-15.
31. **Crawford, A.M., Montgomery, G.W., Pierson, C.A., Brown, T., Dodds, K.G., Sunden, S.L.F., Henry, H.M., Ede, A.J., Swarbrick, P.A., Berryman, T., Penty, J. M. and Hill, D.F. 1994.** Sheep linkage mapping: nineteen linkage groups derived from the analysis of paternal half-sib families. *Genetics*, **137**: 573-579.
32. **Dallas, J.F. 1992.** Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mammal. Genome*, **3**: 452-456.
33. **Dallas, J.F., Dod, B., Boursot, P., Prager, E.M. and Bonhomme, F. 1995** Population subdivision and gene flow in Danish house mice. *Molecular Ecology*, **4**: 311–20.
34. **Dawson, M.R. 1958.** Later Tertiary Leporidae of North America. *Univ. Kansas Paleont. Contrib. Vertebrata*, **6**: 1-75.
35. **Dawson, M.R. 1981.** Evolution of the modern Lagomorphs. In K., Myers and C.D., MacInnes (eds.) *Proceedings of the World Lagomorph Conference*. University of Guelph Press. Guelph, Ontario, pp. 1-8.
36. **DeBlase, F.A., and Martin, E.R. 1981.** Chapter 24: The rabbits, hares and pikas *Order Lagomorpha*. In: A. F., DeBlase and R.E., Martin (eds.) *A Manual of Mammalogy with keys to families of the world* (second edition), WCB McGraw-Hill pp. 215-217.
37. **Deka, R., Jin, L., Shriver, M.D., Yu, L.M., DeCruo, S., Hudrieser, J., Bunker, C.H., Ferreli, R.E. and Chakraborty, R. 1995.** Population genetics of dinucleotide (dC-dA)_n. (dG-dT)_n polymorphisms in world populations. *Am. J. Hum. Genet.*, **56**: 461-474.
38. **Dice, L.R. 1929.** The phylogeny of Leporidae, with the description of a new genus. *J.Mammal.*, **10**: 340-344.
39. **Dietrich, W., Katz, H., Lincoln, S.E., Shin, H., Friedman, J., Dracopoli, N. and**

- Lander, E.S. 1992. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics*, **131**: 423-447.
40. Dixon, K.R., Chapman, J.A., Willner, G.R., Wilson, D.E., and Lopez-Forment, W. 1983. The New World jackrabbits and hares (genus *Lepus*). 2. Numerical taxonomic analysis. *Acta Zool. Fennica*, **174**: 53-56.
41. Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H.A. and Caskey, C.T. 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric repeat units. *Am. J. Hum. Genet.*, **49**: 746-756.
42. Edwards, A., Hammond, H.A., Jin, L., Caskey, C.T. and Chakraborty, R. 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, **12**: 241-253.
43. Edwards, P.J., Fletcher, M.R. and Berny, P. 2000. Review of the factors affecting the decline of the European brown hare, *Lepus europaeus* (Pallas, 1778) and the use of wildlife incident data to evaluate the significance of paraquat. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **79**: 95-103.
44. Ehrich, D. Jorde, P.E., and Krebs, C.J. 2001. Spatial structure of lemming populations (*Dicrostomys groenlandicus*) fluctuating in density. *Molecular Ecology*, **10**: 481-495.
45. Ellerman, J.R. and Morrison-Scott, T.C.S. 1951. Checklist of the Palaearctic and Indian Mammals 1758-1946. Trustees of the British Museum, London.
46. Endler, J.A. 1997. Geographic Variation, Speciation, and Clines. *Princeton University Press, New Jersey* pp. 1-246.
47. Estoup, A., Presa, P., Krieg, F., Vaiman, D. and Guyomard, R. 1993a. (CT)_n and (GT)_n microsatellites: A new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*, **71**(5): 488-496.
48. Estoup, A., Solignac, M., Harry, M. and Cornuet, J.-M. 1993b. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucl. Acids Res.*, **21**(6): 1427-1431.
49. Falconer, D.S. and Mackay, T.F.C. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman, New York, NY, 464pp.
50. Favre, L., Balloux, F., Goudet, J. and Perrin, N. 1997. Female-biased dispersal in the monogamous mammal *Crocodyrus russula*: evidence from field data and microsatellite patterns. *Proc.R.Soc. London*, **264**: 127-132.
51. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny inference package), version 3.5c Seattle: Department of Genetics, University of Washington, 1993.
52. Ferguson, M. 1994. The role of molecular genetic markers in the management of

cultured fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.*, **4**: 351-373.

- 53. Fickel, J., Lieckfeld, D., Pitra, C. 1999.** Analyse der genetischen Diversität und Structur in benachbarten Populationen des Feldhasen (*Lepus europaeus*, Pallas 1778). *Z. Jagdwiss.*, **45**: 230-237.
- 54. FitzSimmons, N.N., Moritz, C. and Moore, S.S. 1995.** Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine evolution. *Mol.Biol.Evol.*, **12(3)**: 432-440.
- 55. Flagstad, Ø. Røed, K., Stacy, J.E. and Jakobsen, K.S. 1999.** Reliable noninvasive genotyping based on excremental PCR of nuclear DNA purified with a magnetic bead protocol. *Molecular Ecology*, **8**: 879-883.
- 56. Flux, J.E.C. 1967.** Hare numbers and diet in an alpine basin in New Zealand. *Proc. N. Z. Ecol. Soc.*, **14**: 27-33.
- 57. Flux, J.E.C. 1981a.** Reproductive strategies in the genus *Lepus*. In Myers K. and MacInnes, C.D. (eds.) *Proceedings of the World Lagomorph Conference*. University of Guelph Press. Guelph, Ontario, pp. 155-174.
- 58. Flux, J.E.C. 1981b.** Field observation of the behaviour in the genus *Lepus*. In Myers K. and MacInnes, C.D. (eds.) *Proceedings of the World Lagomorph Conference*. University of Guelph Press. Guelph, Ontario, pp. 377-394.
- 59. Flux, J.E.C. 1983.** Introduction to taxonomic problems in hares. *Acta Zoologica Fennica*, **174**, 7-10.
- 60. Flux, J.E.C. and Angermann, R. 1990.** The Hares and Jackrabbits. In: J.A., Chapman and J.E.C., Flux (eds.), *Rabbits, Hares and Pikas. Status Survey and Conservation Action Plan*, IUCN/SSC Lagomorph Specialist Group, Gland, Switzerland, pp 61-94.
- 61. Flux, J.E.C. and Flux, M.M. 1983.** Taxonomy and distribution of East African hares. *Acta Zool. Fennica*, **174**: 41-43.
- 62. Foran, D.R., Crooks, K.R. and Minta, S.L. 1997.** Species identification from scat: an unambiguous genetic method. *Wildlife Society Bulletin*, **25**: 835-839.
- 63. Foran, D.S., Crooks, K.C. and Minta, S.C. 1997b.** DNA-based analysis of hair to identify species and individuals for population research and monitoring. *Wildlife Society Bulletin*, **25**: 840-847.
- 64. Foran, D.S., Minta, S.C. and Heinemeyer, K.S. 1997a.** Species identification from scat: an unambiguous genetic method. *Wildlife Society Bulletin*, **25**: 835-840.
- 65. Frankham, R. 1995.** Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genet. Res.* **66**: 95-107.
- 66. Frantzen, M.A.J., Silk, J.B., Ferguson, J.W.H., Wayne, R.K. and Kohn, M.H. 1998.**

- Empirical evaluation of preservation methods for fecal DNA. *Molecular Ecology*, **7**: 1423-1428.
67. **Frylestam, B. 1980.** Utilisation of farmland habitats by European hares, (*Lepus europaeus*, Pallas) in southern Sweden. *Swedish Wildlife Res.*, **11**: 271-284.
68. **Fuller, S.J., Mather, P.B. and Wilson, J.C. 1996.** Limited genetic differentiation among wild *Oryctolagus cuniculus* L. (rabbit) populations in arid eastern Australia. *Heredity*, **77**: 138-145.
69. **Fuller, S.J., Wilson, J.C. and Mather, P.B. 1997.** Patterns of differentiation among wild rabbit populations *Oryctolagus cuniculus* L. in arid and semiarid ecosystems of north-eastern Australia. *Molecular Ecology*, **6**: 145-153.
70. **Futuyma, D. J. 1991.** Εξελικτική Βιολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
71. **Gagneux P, Boesch, C. and Woodruff, D.S. 1997.** Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology*, **6**: 861-868.
72. **Galbusera, P., Volckaert, F.A., Hellemans, B. and Ollevier, F. 1996.** Isolation and characterization of microsatellite markers in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Molecular Ecology*, **5**: 703-705.
73. **Garcia de Leon, E.J., Dallas, J.F., Chatain, B., Canonne, M., Versini, J.J. and Bonhomme, F. 1993.** Development and use of microsatellite markers in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Perciformes: Serranidae). *Mol. Marine Biol. Biotech.*, **4(1)**: 62-68.
74. **Gavin, T.A., Sherman, P.W., Yensen, E., May, B. 1999.** Population genetic structure of the northern Idaho ground squirrel (*Spermophilus brunneus brunneus*). *Journal of Mammalogy*, **80**: 156-168.
75. **Georges, M., Lathrop, M., Hilbert, P., Marcotte, A., Schwers, A., Swillens, S., Vassart, G. and Hanset, R. 1990.** On the use of DNA fingerprints for linkage studies in cattle. *Genomics*, **6**: 461-474.
76. **Gerlach, G. Musolf, K. 2000.** Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. *Conservation Biology*, **14**: 1066-1074.
77. **Gerloff, U., Schlotterer, C., Rassmann, K. Rambold, I., Hohmann, G., Fruth, B. and Tautz, D. 1995.** Amplification of hypervariable simple sequence repeats (microsatellites) from excremental DNA of wild living Bonobos (*Pan paniscus*). *Molecular Ecology*, **4**: 515-518.
78. **Gillespie, J.H. 1998.** Nonrandom Mating. In: J.H., Gillespie (ed.) *Population Genetics A Concise Guide*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, pp. 85-101.
79. **Goff, D.J., Galvin, K., Katz, H., Westerfield, M., Lander, E.S. and Tabin, C.J. 1992.** Identification of polymorphic simple sequence repeats in the genome of the zebrafish. *Genomics*,

14: 200-202.

80. Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L. and Feldman, M.W. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, **139**: 463-471.
81. Gossens, B.L., Waits, P. and Taberlet, P.T. 1998. Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. *Molecular Ecology*, **7**: 1237-1241.
82. Graur, D., Duret, L., and Gouy, M. 1996. Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature*, **379**: 333-335.
83. Griffith, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M. 1996. An Introduction to Genetic Analysis. *W. H. Freeman and Company, (Fifth Edition)* 1-840.
84. Halanych, K.M. 1998. Lagomorphs misplaced by more characters and fewer taxa. *Syst. Biol.*, **47(1)**: 138-146.
85. Halanych, K.M. and Robinson, T.J. 1999. Multiple substitutions affect the phylogenetic utility of cytochrome *b* and 12S rDNA data: examining a rapid radiation in leporid (Lagomorpha) evolution. *J.Mol.Evol.* **48**: 369-379.
86. Halanych, K.M., Demboski, J.R., Jansen van Vuuren, B., Klein, D.R., Cook, J.A., 1999. Cytochrome *b* phylogeny of North American hares and jackrabbits (*Lepus* Lagomorpha) and the effects of saturation in outgroup taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **11**: 213-221.
87. Hamada, H. and Kakunaga, T. 1982. Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature*, **298**: 396-398.
88. Hamada, H., Petrino, M.G. and Kakunaga, T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 6465-6469.
89. Hansen, R.M. and Flinders, J.T. 1969. Food habits of North American hares. *Colorado State Univ., Science Ser., Range Sci.Dept.* **1**: 1-18.
90. Harrison, R.G. 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution*, **4**: 6-11.
91. Harrison, R.G. 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution*, **4(1)**: 6-11.
92. Hartl G.B, Suchentrunk F, Nadlinger K, Willing R 1993. An integrative analysis of genetic differentiation in the brown hare *Lepus europaeus* based on morphology, allozymes, and mitochondrial DNA. *Acta Theriologica*, **38**, 33-57.
93. Hartl G.B, Suchentrunk F, Willing, R and Grillitsch, M. 1989. Biochemisch-genetische Variabilität und Differenzierung beim Feldhasen (*Lepus europaeus*) in

Niederösterreich. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, **76**: 279-284.

- 94. Hartl G.B, Suchentrunk F, Willing, R and Petznek, R. 1995.** Allozyme heterozygosity and fluctuating asymmetry in the brown hare (*Lepus europaeus*): A test of the developmental homeostasis hypothesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **350**: 313-323.
- 95. Hartl G.B., Willing, R. and Nadlinger, K. 1994.** Allozymes in mammalian population genetics and systematics: indicative function of marker system reconsidered. In: Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G.P. and Desalle, R. (eds.), *Molecular ecology and evolution: approaches and applications*. *Birkhäuser Verlag Basel*, pp. 299-310.
- 96. Hartl, D.L., Clark, A.G. 1997.** Principles of population genetics. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.
- 97. Hartl, G. 1987.** Biochemical differentiation between the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.), the domestic rabbit, and the brown hare (*Lepus europaeus* Pallas). *Z. zoll. Syst. Evolut.-forsch.*, **25**: 309.
- 98. Hartl, G. 1991.** Genetic polymorphism of sorbitol dehydrogenase in the brown hare and the distribution of the variation in Central Europe. *Biochem. Genet.*, **29**: 49.
- 99. Hartl, G. and Ferrand, N. 1993.** Genetic polymorphism of transferrin (TF) and the haemoglobin alpha chain (HBA) in the brown hare (*Lepus europaeus*). *Anim. Genet.*, **24**: 439.
- 100. Hartl, G.B., Markowski, J., Kovacs, G., Grillitsch, M. and Willing, R. 1990.** Biochemical variation and differentiation in the brown hare (*Lepus europaeus*) of Central Europe. *Z. Säugetierkd.* **55**: 186-193.
- 101. Hartl, G.B., Markowski, J., Swiatecki, A., Janiszewski, T. and Willing, R. 1992.** Genetic diversity in the Polish brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778): implications for conservation and management. *Acta Theriol.*, **37**: 15-25.
- 102. Hedrick, P.W. 1999.** High variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, **53**: 313-318.
- 103. Herbinger, C.M., Doyle, R.W., Taggart, C.T., Lochmann, S.E., Brooker, A.L., Wright, J.M. and Cook, D. 1997.** Family relationships and effective population size in a natural cohort of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **54**(Suppl.): 11-18.
- 104. Hewitt G.M. 1999.** Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**, 87-112.
- 105. Hibbard, C. 1963.** The origin of the P3 pattern of *Sylvilagus*, *Caprolagus*, *Oryctolagus*, and *Lepus*. *J.Mammal.*, **44**: 1-15.
- 106. Higuchi,R., Bowman,B., Freiburger,M., Ryder,O.A., Wilson,A.C., 1984.** DNA

- sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, **312**: 282-284.
- 107. Hill, N.O. 1974.** Correspondence analysis: a neglected multivariate method. *Applied Statistics*, **23**: 340-354.
- 108. Hillis, D.M., Mable, B.K., and Moritz, C. 1996.** Applications of molecular systematics: The state of the field and a look to the future. In "Molecular Systematics" (D. M. Hillis, C. Moritz, and B. K. Mable, Eds.), pp. 515-543. Sinauer, Sunderland, MA.
- 109. Hoeschele, I., Uimari, P., Grignola, F.E., Zhang, Q. and Gage, K.M. 1997.** Advances in statistical methods to map quantitative trait loci in outbred populations. *Genetics*, **147**: 1445-1457.
- 110. Hoffmann, R.S. 1993.** Order Lagomorpha. In: Wilson, D.E. and Reeder, D.M. (eds.) *Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference*. Smithsonian Institution Press, London, pp. 807-827.
- 111. Hoffmann, R.S. 1998.** The trouble with *Lepus capensis*. *Euro-American Mammal Congress*, Universidad de Santiago de Compostela, Spain, July 19-24, pp.94.
- 112. Hospital, F. and Charcosset, A. 1997.** Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. *Genetics*, **147**: 1469-1485.
- 113. Höss, M. 1994.** More about the silica method. *Ancient DNA Newsletter*, **2(1)**: 10-12.
- 114. Höss, M., Kohn, M., Pääbo, S., Knauer, F. and Schroeder, W. 1992.** Excrement analysis by PCR. *Nature*, **359**: 199.
- 115. Höss, M., Pääbo, S. 1993.** DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucl. Acid Res.*, **21**: 3913-3914.
- 116. Huang, N. and Gall, G.A.E. 1990.** Correlation of body weight and reproductive characteristics in rainbow trout. *Aquaculture*, **86**: 191-200.
- 117. Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L. 1985a.** Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature*, **314**: 67-73.
- 118. Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L. 1985b.** Individual - specific "fingerprints" of human DNA. *Nature*, **316**: 76-79.
- 119. Johansson, M., Ellegren, H. and Andersson, L. 1992.** Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites. *J. Hered.*, **83**: 196-198.
- 120. Kasapidis, P., Suchntrunk, F., Magoulas, A. and Kotoulas, G. (submitted).** The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations.
- 121. Keightley, P.D., Hordge, T. May, L. and Bulfield, G. 1996.** A genetic map of

- quantitative trait loci for body weight in the mouse. *Genetics*, **142**: 227-235.
- 122. Knott, S.A. and Haley, C.S. 1992.** Maximum likelihood mapping of the quantitative trait loci using full-sib families. *Genetics*, **132**: 1211-1222.
- 123. Kohn, M., York, E.C., Kamaradt, D.A., Haught, G., Sauvajot, R.A. and Wayne, R.K. 1998.** Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London*, **266**: 657-663.
- 124. Kohn, M.H., Wayne, R.K., 1997.** Facts from feces revisited. *Trends in Ecology & Evolution*, **12(6)**: 223-227.
- 125. Kwock, S. and Higuchi, R. 1989.** Avoiding false positives with PCR. *Nature*, **339**: 237-238.
- 126. Kyle, C.J. and Strobeck, C. 2001.** Genetic structure of North American wolverine (*Gulo gulo*) populations. *Molecular Ecology*, **10**: 337-347.
- 127. Kyle, C.J., Davis, C.S. and Strobeck, C. 2000.** Microsatellite analysis of North American pine marten (*Martes Americana*) populations from the Yukon and Northwest Territories. *Canadian Journal of Zoology*, **78**: 1150-1157.
- 128. Lander, E.S. and Botstein, D. 1989.** Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, **121**: 185-199.
- 129. Lawlor, T.E. 1979.** Lagomorpha. In: T.E. Lawlor (ed.) *Handbook to the orders and families of living mammals* Mad River Press Second Edition, Eureka, California, pp. 144-147.
- 130. Lebart, L., Morineau, A., Fenelon, J.P. 1979.** Traitement des Données Statistiques : Méthodes et Programmes. Paris: Dunod.
- 131. Lebart, L., Morineau, A., Tabard, N. 1980.** Techniques de la Description Statistique: Méthodes et Logiciels pour l'Analyse des Grands Tableaux. Paris: Dunod.
- 132. Li, C.K., Wilson, R.W., Dawson, M.R. and Krishtalka, L. 1987.** The origin of Rodents and Lagomorphs. In: *Genoways H.H.(ed.) Current Mammalogy*. Plenum Press, New York pp. 97-108.
- 133. Litt, M. and Luty, J.A. 1989.** A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, **44**: 397-401.
- 134. Love, J.M., Knight, A.M., McAleer, M.A. and Todd, J.A. 1990.** Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. *Nucl. Acids Res.*, **18(14)**: 4123-4130.
- 135. Lucchini, V., Fabbri, E., Marucco, F., Ricci, S., Boitani, L. and Randi, E. 2002.** Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian

Alps. *Molecular Ecology*, **11**: 857-868.

136. MacDonald, D and Barrett, P. 1995. The Mammals of Britain and Europe. *Harper Collins, London*, pp.312.

137. Mamuris, Z., Sfougaris, A.I. and Stamatis, C. 2001. Genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP-PCR analysis: implications for conserving genetic diversity. *Biological Conservation*, **101**, 187-196.

138. Marboutin, E. and Peroux, R., 1995. Survival pattern of European hare in a decreasing population. *Journal of Applied Ecology*, **32**: 809-816.

139. Markowski, J., Osmulski, P., Duda, W., Dynier, E., Swiatecki, A., Ulanska, M. and Janiszewski, T. 1990. Relation between haptoglobin polymorphism and the health status of brown hare populations in Poland. *Acta Theriol.*, **35**: 215.

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

141. McConnell, S., L. Hamilton, D. Morris, D. Cook, D. Paquet, P. Bentzen and J. Wright, 1995. Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon. *Aquaculture*, **137(1-4)**: 19-30.

142. Meng, J., Wyss, A.R., Dawson, M.R. and Zhai, R. 1994. Primitive fossil rodent from inner Mongolia and its implications for mammalian phylogeny. *Nature*, **370**: 134-136.

143. Mitchell-Jones, A.J, Amori, G., Bogdanowicz, W., Krystufek, B., Reijnders, P.J.H., Spitzenberger, F., Stubbe, M., Thissen, J.B.M., Vohralik, V., Zima, J., 1999. The atlas of European mammals. Poyser Natural History. T & A.D. Poyser of the Societas Europaea Mammalogica. Academic Press, London.

144. Miyamoto, M.M. and Goodman, M. 1986. Biomolecular systematics of eutherian mammals: Phylogenetic patterns and classification. *Syst. Zool.*, **35**: 230-240.

145. Morin, P.A., Wallis, J., Moore, J.J. and Woodruff, D.S. 1994. Paternity exclusion in a community of wild chimpanzees using hypervariable simple sequence repeats. *Molecular Ecology*, **3**: 469-478.

146. Mougél, F., Mounolou, J.-C. and Monnerot, M. 1996. Nine polymorphic microsatellite loci in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Anim. Genet.*, **28**: 58-59.

147. Mowat, G., Paetkau, D., Proctor, M. and Strobeck, C. 1999. Using genetic tagging to estimate animal population parameters. **Draft**

148. Mullis K. B., & Faloona F. A. (1987). Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalysed Chain Reaction. *Methods in Enzymology*, **155**: 335-350.

149. Myers K. and MacInnes, C.D. 1981. *Proceedings of the World Lagomorph Conference.*

University of Guelph Press. Guelph, Ontario.

- 150. Nagylaki, T. 1998.** Fixation indices in subdivided populations. *Genetics*, **148**: 1325-1332.
- 151. Nei, M., 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**: 583-590.
- 152. Novacek, M.J. 1990.** Morphology, paleontology, and the higher clades of mammals. In: Genoways, H.H. (ed.) *Current mammalogy*. Plenum Press, New York, pp. 507-543.
- 153. Novacek, M.J. 1993.** Reflections on higher mammalian phylogenetics. *J. Mammal. Evol.*, **1**: 3-30.
- 154. Novacek, M.J., Wyss, A.R. and McKenna M.C. 1988.** The major groups of eutherian mammals. In M.J. Benton (ed.) *The phylogeny and classification of the tetrapods* Vol.2. Mammals, Systematics Association Special Volume No35B. Clarendon Press, Oxford, pp. 31-71.
- 155. O' Rourke D. H., Caryle S. W., Parr R. L. (1996).** Ancient DNA: Methods, Progress, and Perspectives. *American Journal of Human Biology*, **8**: 557-571.
- 156. Ondrias JC (1965).** Die Saugetiere Griechenlands. *Säugetierkundliche Mitteilungen*, **13**, 109-127.
- 157. Οντριας, Ι.Χ. 1996.** Τάξη Λαγόμορφα. In: Ι.Χ., Οντριας (ed.) *Συστηματική Ζωολογία τόμος τέταρτος* Αθανασόπουλος-Παπαδάμης, pp. 360-361.
- 158. Palacios, F. 1983.** On the taxonomic status of the genus *Lepus* in Spain. *Acta Zool. Fennica*, **174**: 27-30.
- 159. Palacios, F. 1996.** Systematics of the indigenous hares of Italy traditionally identified as *Lepus europaeus* Pallas, 1778 (Mammalia: Leporidae). *Bonner Zoologische Beitrage*n, **56**: 59-91.
- 160. Palacios, F. 1998.** Diversity of hares in Europe. In: Reig, S. (ed.) *Euro-American Mammal Congress, Abstracts*. Universidad de Santiago de Compostela, Spain, July 19-24 1988, p. 85.
- 161. Palsbøll, P.J., Allen, J., Berube, M., Clapham, J., Feddersen, T.P., Hammond, P.S., Hudson, R.R., Jørgensen, H., Katona, S., Larsen A.H., Larsen, F., Lien J., Mattlia, D.K., Sigurjonsson, J., Sears, R., Smith, T., Sponer, R., Stevick, P. and Oien, N. 1997.** Genetic tagging of humpback whales. *Nature*, **388**: 767-769.
- 162. Pardue, M.L., K. Lowenhaupt, A. Rich and A. Nordheim, 1987.** (dC-dA)_n(dG-dT)_n sequences have evolutionary conserved chromosomal locations in *Drosophila* with implications for roles in chromosome structure and function. *EMBO J.*, **6(6)**: 1781-1789.
- 163. Pearce, J.M., Fields, R.L. and Scribner, K.T. 1996.** Nest materials as a source of genetic material for avian ecological study. *Journal of Field Ornithology*, **68**: 471-481.

164. **Perez-Suarez G, Palacios F, Boursot P (1994).**; Speciation and parapatry in western mediterranean hares (*Lepus castroviejoi*, *L. europaeus*, *L. granatensis*, and *L. capensis*) revealed by mitochondrial DNA phylogeny. *Biochemical Genetics*, **32**, 423-436.
165. **Peter, F. 1961.** Elements d'une révision des lièvres européens et asiatiques du sous-genre *Lepus*. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, **26**: 30-40.
166. **Pierpaoli M, Riga F, Trocchi V, Randi E (1999).** Species distinction and evolutionary relationship of the Italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Ecology*, **8**, 1805-1817.
167. **Poinar, H.N., 1999a.** DNA from fossils: the past and the future. *Acta Paediatrica*, **433**:133-140.
168. **Poinar, H.N., Hofreiter, M., Spaulding, W.G., Martin, P.S., Stankiewicz, B.A., Bland, H., Evershed, R.P., Possnert, G., Pääbo, S., 1998.** Molecular Coproscopy: Dung and Diet of the Extinct Ground Sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science*, **281**:402-406
169. **Raphael, M.G. 1994.** Techniques for monitoring populations of fishers and American Martens. In: S.W. Buskirk, A.S. Harestad, M.G. Raphael & R.A Powell (eds.) Martens, Sables, and Fishers biology and conservation. Cornell University Press, Ithaca, New York, pp. 224-240.
170. **Raymond, M. and F. Rousset, 1995.** GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. *Journal of Heredity*, **86**: 248-249.
171. **Reed, J.Z., Tollit, D.J., Thompson, P.M. and Amos, W. 1997.** Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal feces. *Molecular Ecology*, **6**: 255-234.
172. **Reynolds J, Weir BS, Cockerham CC, 1983.** Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, **105**: 767-779.
173. **Richards, R.I. and G.R. Sutherland, 1992a.** Heritable unstable DNA sequences. *Nature Genetics*, **1**: 7-9.
174. **Richards, R.I. and G.R. Sutherland, 1992b.** Dynamic mutations: A new class of mutations causing human disease. *Cell*, **70**: 709-712.
175. **Rico, C., Rico, I., Webb, N., Smith, S., Bell, D. and Hewitt, G. 1994.** Four polymorphic microsatellite loci for the European wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Animal Genetics*, **25**: 367.
176. **Robinson, T.J 1980.** Comparative chromosome studies in the family Leporidae (Lagomorpha, Mammalia). *Cytogenet. Cell. Genet.*, **28**: 64-70.
177. **Robinson, T.J, Elder, F.F.B. and Chapman, J.A. 1983a.** Karyotypic conservatism in the genus *Lepus* (order Lagomorpha). *Can.J.Genet.Cytol.*, **25**: 540-544.

178. **Robinson, T.J, Elder, F.F.B. and Chapman, J.A. 1983b.** Evolution of chromosomal variation in cottontails, genus *Sylvilagus* (Mammalia: Lagomorpha): *S. aquaticus*, *S. floridanus*, and *S. transitionalis*. *Cytogenet. Cell. Genet.*, **35**: 216-222.
179. **Robinson, T.J, Elder, F.F.B. and Chapman, J.A. 1984.** Evolution of chromosomal variation in cottontails, genus *Sylvilagus* (Mammalia: Lagomorpha).II. *S. audubonii*, *S. idahoensis*, *S. nuttallii*, and *S.palustris*. *Cytogenet. Cell. Genet.*, **38**: 282-289.
180. **Robinson, T.J, Elder, F.F.B., Lopez-Formant,W. 1981.** Banding studies in the volcano rabbit, *Romerolagus diazi*, and Crawshay's hare *Lepus crawshayi*. Evidence of the leporid ancestral karyotype. *Can.J.Gene.Cytol.*, **23**: 469-474.
181. **Robinson, T.J. 1982.** Key to the South African Leporidae (Mammalia: Lagomorpha). *S. Afr. J. Zool.*, **17**: 220-222.
182. **Robinson, T.J. and Skinner, J.D. 1983.** Karyology of the riverine rabbit, *Bunolagus monticularis*, and its taxonomic implications. *J.Mammal.*, **64**: 678-681.
183. **Roy, M.S., E. Geffen, D. Smith, E.A. Ostrander and R.K. Wayne, 1994.** Patterns of differentiation and hybridization in North American wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci. *Mol. Biol. Evol.*, **11(4)**: 553-570.
184. **Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. (1988).** Primer-Directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491.
185. **Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. (1985).** Enzymatic Amplification of β -Globin Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*, **230**: 1350-1354.
186. **Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol.Biol.Evol.*, **4**: 406-425.
187. **Schneider, E. 1978.** Der Feldhase. Biologie, Verhalten, Hege und BLV Verlagsgesellschaft, Munich, p. 198.
188. **Schneider, E. and Leipoldt, M. 1983.** DNA relationship within the genus *Lepus* in S.W. Europe. *Acta Zool. Fennica* **174**: 31-41.
189. **She, J.X., Autem, M., Kotoulas, G., Pasteur, N. and Bonhomme, F. 1987.** Multivariate analysis of genetic exchanges between *Solea aegyptiaca* and *Solea senegalensis* (Teleosts, Soleidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **32**: 357-371.
190. **Slatkin, M., 1995.** A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**: 457-462.
191. **Stallings, R.L., A.F. Ford, D. Nelson, D.C. Torney, C.E. Hildebrand and R.K.**

- Mouzis, 1991.** Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*, **10**: 807-815.
- 192. Suchentrunk F, Jaschke C, Haiden A (2001).** Little allozyme and mtDNA variability in brown hares (*Lepus europaeus*) from New Zealand and Britain - A legacy of bottlenecks? *Mammalian Biology*, **66**: 48-59.
- 193. Suchentrunk F, Hartl, G.B., Flux, J., Parkes, J. Haiden, A. And Tapper, S. 1998.** Allozyme heterozygosity and fluctuating asymmetry in brown hares (*Lepus europaeus*) introduced to New Zealand: development homeostasis in populations with a bottleneck history. *Acta Theriologica Suppl.* **5**: 35-52.
- 194. Suchentrunk F, Michailov C, Markov G, Haiden A (2000).** Population genetics of Bulgarian brown hares *Lepus europaeus*: allozymic diversity at zoogeographical crossroads. *Acta Theriologica*, **45**, 1-12.
- 195. SurrIDGE, A.K., Bell, D.J., Ibrahim, K.M. and Hewitt, G.M. 1999.** Population structure and genetic variation of European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in East Anglia. *Heredity*, **82**: 479-487.
- 196. SurrIDGE, A.K., Bell, D.J., Rico, C. and Hewitt, G.M. 1997.** Polymorphic microsatellite loci in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) are also amplified in other lagomorph species. *Anim. Genet.*, **28**: 302-305.
- 197. Taberlet, P. and Bouvet, J. 1992.** Bear conservation genetics. *Nature*, **358**: 197.
- 198. Taberlet, P., Camarra, J.J., Griffin, S., Uhres, E., Hanotte, O., Waits, L.P., Dubois-Panagon, C. Burke, T. and Bouvet, J. 1997.** Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology*, **6**: 869-876.
- 199. Tautz, D. and M. Renz, 1984.** Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl. Acids Res.*, **12(10)**: 4127-4138.
- 200. Tautz, D., 1989.** Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res.*, **17**: 6463-6471.
- 201. Tegelström, H., Wyöni, P-I, Gelter, H. And Jaarola, M. 1988.** Concordant divergence in proteins and mitochondrial DNA between two vole species in the genus *Clethrionomys*. *Biochemical Genetics*, **26**: 223-237.
- 202. Thulin C-G, Jaarola M, Tegelström H (1997).** The occurrence of mountain hare mitochondrial DNA in wild brown hares. *Molecular Ecology*, **6**, 463-467.
- 203. Tsilfidis, C., A.E. MacKenzie, G. Mettler, J. Barcelo and R.G. Korneluk, 1992.** Correlation between CTG trinucleotide repeat length and frequency of severe congenital myotonic dystrophy. *Nature Genet.*, **1**: 192-195.

204. van der Loo, W., James, A., Schröder, J. 1981. Chromosome evolution in Leporids. In: Myers, K. and MacInnes, C.D. (eds.) *Proceedings of the World Lagomorph Conference*. University of Guelph Press, Guelph, Ontario, pp. 28-36.
205. Volle, M. 1981. Analyse des Données. Deuxième édition. Paris: Economica.
206. Waddell, P.J., Cao, Y., Hauf, J. and Hasegawa, M. 1999. Using Novel Phylogenetic Methods to evaluate mammalian mtDNA, including amino acid-invariant sites-logdet plus site stripping, to detect internal conflicts in the data, with special reference to the positions of hedgehog, armadillo, and elephant. *Syst. Biol.*, **48(1)**: 31-53.
207. Watson, J.S. and Taylor, R.H. 1955. Reingestion in the Hare *Lepus europaeus* Pallas. *Science*, **121**: 314.
208. Weber, J.L. and C. Wong, 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.*, **2**: 1123-1128.
209. Weber, J.L. and May, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am.J.Hum. Genet.*, **44**: 388-396.
210. Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the Analysis of population structure. *Evolution*, **38**: 1358-1370.
211. Whittaker, J.C., C.S. Haley and R. Thompson, 1997. Optimal weighting of information in marker-assisted selection. *Genet.Res.*, **69**: 137-144.
212. Wilson D.E., Reeder D.M., 1993. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. Second edition. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.
213. Wolfus, G.M., D.K. Garcia and A. Alcivar-Warren, 1997. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture*, **152**: 35-47.
214. Woods, J.G., Paetkau, D., Lewis, D., McLellan, B.N., Proctor, M. and Strobeck, C. 1999. Genetic tagging free ranging black and brown bears. *Wildl.Society Bull.*, **27(2)**:
215. Worthington-Wilmer, J., Moritz, C., Hall, L., Toop, J., 1994. Extreme population structuring in the threatened ghost bat *Macroderma gigas*: evidence from mitochondrial DNA. *Proceedings of Royal Society of London*, **257**: 193-198.
216. Wright, J.M., 1992. DNA fingerprinting of fishes. In: Hochachka and Mommsen (eds), *Biochemistry and molecular biology of fishes*, Vol. 2, Elsevier Science Publishers B.V.
217. Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations. The University of Chicago Press, Chicago.
218. Xu, S. and W.R. Atchley, 1995. A random model approach to interval mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, **141**: 1189-1197.

-
219. **Yang H. (1997).** Ancient DNA from Pleistocene fossils: Preservation, recovery, and utility of ancient genetic information for Quaternary research. *Quaternary Science Reviews*, **16**: 1145-1161.
220. **Yom-Tov, Y. 1967.** On the taxonomic status of the hares (genus *Lepus*) in Israel. *Mammalia*, **31**: 246-259.
221. **Zhang, W. and C. Smith, 1992.** Computer simulation of marker-assisted selection utilizing linkage disequilibrium. *Theor. Appl. Gen.*, **83**: 813-820.
222. **Zörner, H. 1977.** Ergebnisse der untersuchung über die Ernährung des Feldhasen-*Lepus europaeus* (Pallas 1778)- im Wildforschungsgebiet Hakel. *Beitr. Jagd.-u. Wildforsch.*, **10**: 255-266.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Πρωτόκολλο εξαγωγής γενωμικού DNA από ιστό

1. Πραγματοποιείται ξήρανση του ιστού στους 37°C για 15-24 ώρες περίπου
2. Λειοτριβούμε τον ιστό
3. Προσθέτουμε 700μl διαλύματος εξαγωγής (0.1M EDTA, 0.05M Tris-HCl pH=8.0)
4. Προσθέτουμε 87.5μl SDS 10%
5. Επωάζουμε σε υδατόλουτρο, στους 55 °C για 15 λεπτά
6. Προσθέτουμε 10μl πρωτεϊνάση K (10mg/ml) και αναδεύουμε ήπια
7. Επωάζουμε σε υδατόλουτρο, στους 55 °C για 15 τουλάχιστον ώρες
8. Προσθέτουμε 200μl κορεσμένου διαλύματος NaCl (C >6M)
9. Ανακατεύουμε επίμονα (Vortex) για 15 λεπτά
10. Φυγοκεντρούμε σε μέγιστη ταχύτητα (13000rpm) για 30 λεπτά
11. Αφαιρούμε το υπερκείμενο διάλυμα (όγκου περίπου 1ml) και το τοποθετούμε σε καινούργιο πλαστικό σωληνάκι όγκου 2ml
12. Προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφορμίου (CHCl₃) και αναδεύουμε ελαφρά με το χέρι
13. Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 13000 στροφές
14. Παίρνουμε το υπερκείμενο και το μεταφέρουμε σε ένα νέο πλαστικό σωληνάκι όγκου 2ml
15. Προσθέτουμε 1ml παγωμένης ισοπροπανόλης
16. Επωάζουμε στους -20°C για τουλάχιστον 1 ώρα
17. Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 13000 στροφές
18. Απομακρύνουμε την ισοπροπανόλη (υπερκείμενο)
19. Ξεπλένουμε την πελέτα με 0.5ml παγωμένης αιθανόλης 70%
20. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 13000 στροφές
21. Απομακρύνουμε την αιθανόλη και στεγνώνουμε την πελέτα του DNA σε θερμοκρασία δωματίου για 15-20 ώρες (είτε στους 37°C για 4-5 ώρες)
22. Επαναδιαλύουμε το DNA σε 50-100μl TE (0.01 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.001 M EDTA) και τοποθετούμε το διάλυμα στους 37°C για 4-5 ώρες.

Πρωτόκολλο εξαγωγής γενωμικού DNA από περιττώματα

1. 0,5-1gr κονιορτοποιημένου περιττώματος προστίθενται σε 180-700μl διαλύματος λύσης (**LB**, 0.1M EDTA pH=8.00, 0.05M Tris-HCl pH=6.4) και 25μl πρωτεΐνάσης K (20mg/ml)
2. Επώαση στους 60⁰C για 16-24 ώρες με σποραδική ανάδευση. Εάν υπάρχουν αδιάλυτα κομμάτια των περιττωμάτων γίνεται φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5min στις 13,000rpm.
3. Προσθήκη 200μl διαλύματος εξαγωγής (**EB**) (10M GuSCN, 0,1M Tris-HCL, pH=6,4, 0,2M EDTA, pH=8, 1,3% Triton X-100) και επώαση στους 70⁰C για 10min.
4. Προσθήκη 210μl αιθανόλης και έντονη ανάδευση.
5. Προσθήκη 40μl διαλύματος πυριτίου (SB, silica) και επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου με σποραδική ανάδευση. Είναι σημαντικό το pH των διαλυμάτων (λύσης και εξαγωγής) να είναι μικρότερο από 7.5, ειδάλλως το DNA δεν θα απορροφηθεί από τα σωματίδια πυριτίου.
6. Φυγοκεντρούμε για 5min στις 13.000 rpm και απομακρύνονται το υπερκείμενο.
7. Ξέπλυμα της πελέτας με 0.5ml διαλύματος ξεπλύματος (WB, 10M GuSCN, 0,1M Tris-HCL, pH=6,4). Φυγοκέντρηση για 5min στις 13.000rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
8. Επανάληψη του 7^ο σταδίου.
9. Ξέπλυμα της πελέτας με 1ml διαλύματος αιθανόλης (EtB,). Φυγοκέντρηση για 5min στις 13.000rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
10. Φυγοκέντρηση για 3min στις 13.000rpm, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της αιθανόλης.
9. Στέγνωμα της πελέτας με θέρμανση στους 56⁰C για 10min με ανοικτά τα καπάκια των erpendorfs.
10. Επαναδιάλυση της πελέτας σε 100μl προθερμασμένου στους 70⁰C διαλύματος έκλουσης (TE). Για καλύτερα αποτελέσματα προτείνεται το διάλυμα αυτό να είναι ελαφρώς αλκαλικό (pH=8.5). Επώαση για 2min στους 70⁰C και φυγοκέντρηση για 3min στις 13.000rpm.
11. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα erpendorfs και αποθήκευση στους -20⁰C. Τα erpendorfs αναταράσσονται ισχυρά και φυγοκεντρούνται για 2min στις 12.000*g και το υπερκείμενο, που περιέχει και τα νουκλεϊκά οξέα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω πειράματα

I) Προετοιμασία διαλύματος εξαγωγής (EB)

Παίρνουμε ένα σωλήνα των 50ml (Falcon tube) και προσθέτουμε

24gr GuSCN

20 ml 0,1M Tris-HCL pH=6,4

4,4 ml 0,2M EDTA pH=8 (η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH)

0,5 ml Triton X-100 (ή 0,52gr)

και αναμιγνύουμε με αναστροφές. Για να υποβοηθήσουμε τη διάλυση ζεσταίνουμε το σωλήνα σε υδατόλουτρο ή σε microwave oven στους 60⁰C έως 65⁰C,. Το διάλυμα αυτό διατηρείται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 3 εβδομάδες.

II) Προετοιμασία διαλύματος silica (SB)

Σε κυλινδρικό σωλήνα των 100 ml προσθέτουμε 12 gr **silica particles** και γεμίζουμε με **ddH₂O** μέχρι τελικού όγκου 100ml. Το καλύπτουμε με parafilm και ανακατεύουμε μέχρις ότου διαλυθεί η silica. Αφήνουμε τη silica σε θερμοκρασία δωματίου για 24h.

Απομακρύνουμε τα ανώτερα 86 ml και προσθέτουμε καθαρό νερό μέχρι τα 100 ml. Το αφήνουμε περίπου 5 ώρες για καθίζηση και μετά απομακρύνουμε τα ανώτερα 88ml και προσθέτουμε 120μl 10M **HCl**. Ανακατεύουμε ξανά μέχρι πλήρη διάλυση.

Χωρίζουμε το διάλυμα σε γυάλινους σωλήνες (4ml) και τα αποστειρώνουμε για 20min στους 121⁰C, ώστε να καταστραφεί κάθε ξένο νουκλεϊκό οξύ (μόλυνση).

Τέλος διαιρούμε το διάλυμα της silica σε eppendorf tubes (1.5ml), περίπου 500μl διαλύματος στο καθένα και τα φυλάσσουμε στο σκοτάδι (κλεισμένα με αλουμινόχαρτο) σε θερμοκρασία δωματίου (Διάρκεια ζωής έως 6 μήνες).

III) Προετοιμασία διαλύματος ξεπλύματος (WB)

Σε ένα σωλήνα των 50 ml προσθέτουμε

24gr GuSCN

20ml Tris HCl, pH=6.4

και αναμιγνύουμε με αναστροφές για να διαλυθούν. Για να υποβοηθήσουμε τη διάλυση ζεσταίνουμε το σωλήνα σε water bath ή σε microwave oven στους 60⁰C.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

H exp. = H calculée avec biais

H n.b. = H calculée sans biais (Nei 1978)

H obs. = H observée

P(0.95) = Polymorphisme au seuil 95%

P(0.99) = Polymorphisme au seuil 99%

Seuil 95%, 99% => que le locus est considéré comme polymorphe

si l'allèle le plus fréquent ne dépasse pas 95% (respectivement 99%)

Fis W&C = Fis selon Weir & Cockerham(1984)

R&H = Fis selon Robertson & Hill(1984)

N° Nom de la population

-
- 1 βόρειο και κεντρικό Ηράκλειο
 - 2 νότιο Ηράκλειο
 - 3 Λασιθι
 - 4 βόρειο Ρέθυμνο
 - 5 ανατολική Μακεδονία
 - 6 δυτική Μακεδονία
 - 7 Λαμία
 - 8 νησιά ανατολικού Αιγαίου
 - 9 Κύπρος
 - 10 Κεφαλονιά
 - 11 Λευκάδα
 - 12 Ιταλία

FREQUENCES ALLELIQUES POUR CHAQUE POPULATION

LOCUS	POPULATION											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sat2												
(N)	40	18	19	38	29	34	4	30	18	19	11	10
222	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500
224	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1389	0.0000	0.0000	0.0000
228	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0294	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
229	0.0250	0.1389	0.0000	0.0132	0.0000	0.0882	0.0000	0.0500	0.0278	0.0000	0.0000	0.0000
230	0.0000	0.0000	0.0263	0.0132	0.0000	0.0441	0.0000	0.0000	0.3611	0.0000	0.0000	0.0000
231	0.1250	0.0000	0.0000	0.0921	0.1034	0.0294	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
232	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0345	0.0441	0.0000	0.3167	0.0556	0.0000	0.0000	0.0500
233	0.4875	0.6389	0.6842	0.2368	0.0000	0.0000	0.3750	0.0000	0.0000	0.4737	0.0909	0.0000
234	0.0000	0.0000	0.0263	0.0000	0.1552	0.3676	0.0000	0.0833	0.1389	0.0000	0.0000	0.1000

235	0.0375	0.0000	0.0263	0.0395	0.0000	0.0441	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
236	0.0000	0.0000	0.0000	0.0132	0.3103	0.0588	0.0000	0.0000	0.0556	0.0263	0.5000	0.0500
237	0.0125	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0588	0.5000	0.0000	0.0000	0.0263	0.0455	0.0000
238	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1552	0.0294	0.0000	0.0000	0.0000	0.4211	0.0000	0.1500
239	0.0000	0.0000	0.0000	0.0789	0.0172	0.0000	0.0000	0.0500	0.0000	0.0263	0.0000	0.0000
240	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0172	0.0294	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3500
241	0.0000	0.0000	0.0000	0.0395	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
242	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0517	0.0294	0.0000	0.1500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500
243	0.0625	0.0000	0.0000	0.2237	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
244	0.0250	0.0556	0.0263	0.0000	0.0690	0.0147	0.0000	0.2167	0.1111	0.0000	0.0000	0.0000
245	0.0375	0.1111	0.1053	0.1184	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
246	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0172	0.0000	0.0000	0.1167	0.0833	0.0263	0.0000	0.1000
247	0.0750	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0147	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
248	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0167	0.0278	0.0000	0.0000	0.0500
249	0.0125	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
250	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0345	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
251	0.0250	0.0000	0.0263	0.0263	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
252	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0172	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
253	0.0375	0.0278	0.0000	0.0658	0.0000	0.0147	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
257	0.0125	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
258	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0172	0.0294	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
259	0.0125	0.0278	0.0789	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
260	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0294	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
261	0.0125	0.0000	0.0000	0.0263	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
262	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0294	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
266	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1364	0.0500
268	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0147	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1364	0.0000
269	0.0000	0.0000	0.0000	0.0132	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
272	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0909	0.0000
273	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
H exp.	0.7303	0.5556	0.5111	0.8556	0.8335	0.8365	0.5938	0.8044	0.8040	0.5956	0.6942	0.8200
H n.b.	0.7396	0.5714	0.5249	0.8670	0.8482	0.8490	0.6786	0.8181	0.8270	0.6117	0.7273	0.8632
H obs.	0.4750	0.4444	0.3684	0.7632	0.6552	0.6765	0.5000	0.4667	0.8889	0.5263	0.8182	0.6000

Sat12

(N)	57	19	19	42	29	42	4	10	6	19	10	0
116	0.0088	0.0000	0.0000	0.0000	0.1897	0.1429	0.0000	0.0500	0.6667	0.0000	0.0000	-----
120	0.0526	0.0789	0.0000	0.0000	0.1897	0.0595	0.0000	0.4500	0.0833	0.0000	0.0000	-----
122	0.0000	0.0000	0.0000	0.0357	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-----
124	0.0789	0.1053	0.2368	0.0952	0.0690	0.1071	0.1250	0.1500	0.0000	0.0000	0.5000	-----
126	0.0263	0.0000	0.0263	0.1786	0.0172	0.0476	0.0000	0.0000	0.0000	0.8158	0.1500	-----
127	0.0175	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-----
128	0.0965	0.1053	0.1053	0.1190	0.0517	0.1905	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	-----
130	0.0439	0.1579	0.0789	0.0952	0.0000	0.0476	0.1250	0.0500	0.0000	0.0789	0.0000	-----
132	0.4649	0.4211	0.3947	0.3452	0.1552	0.1905	0.3750	0.0000	0.1667	0.0789	0.0000	-----
134	0.1316	0.0263	0.0789	0.1310	0.0345	0.0476	0.3750	0.0000	0.0000	0.0263	0.3000	-----

136	0.0789	0.1053	0.0789	0.0000	0.2586	0.1429	0.0000	0.0500	0.0833	0.0000	0.0500	-----
140	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0238	0.0000	0.1500	0.0000	0.0000	0.0000	-----
144	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0345	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-----
H exp.	0.7390	0.7576	0.7576	0.7982	0.8270	0.8642	0.6875	0.7350	0.5139	0.3213	0.6350	-----
H n.b.	0.7455	0.7781	0.7781	0.8078	0.8415	0.8746	0.7857	0.7737	0.5606	0.3300	0.6684	-----
H obs.	0.8246	0.8947	0.7368	0.7857	0.6897	0.8333	0.7500	0.6000	0.5000	0.1053	0.9000	0.0000

Sat8

(N)	44	9	15	32	32	39	3	28	16	12	11	9
94	0.4886	0.5556	0.2000	0.1875	0.0000	0.0128	0.0000	0.3393	0.1250	0.1667	0.0000	0.0000
96	0.0000	0.0000	0.0333	0.0156	0.0625	0.0641	0.1667	0.0179	0.1875	0.0000	0.1818	0.0000
98	0.3750	0.2222	0.6000	0.4219	0.8906	0.8333	0.8333	0.0714	0.2188	0.5417	0.8182	0.7778
100	0.0455	0.1111	0.0333	0.0469	0.0000	0.0897	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
102	0.0909	0.1111	0.1333	0.3281	0.0469	0.0000	0.0000	0.0000	0.2188	0.2917	0.0000	0.2222
104	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000	0.0000	0.0000
108	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5714	0.1250	0.0000	0.0000	0.0000
H exp.	0.6103	0.6173	0.5800	0.6768	0.2007	0.2932	0.2778	0.5529	0.8223	0.5937	0.2975	0.3457
H n.b.	0.6173	0.6536	0.6000	0.6875	0.2039	0.2970	0.3333	0.5630	0.8488	0.6196	0.3117	0.3660
H obs.	0.5682	0.6667	0.2667	0.3125	0.2188	0.3333	0.3333	0.5000	0.6875	0.9167	0.3636	0.0000

Valeurs Fis

Sat2

222	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-0.000
224	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-0.133	-----	-----	-----
228	-----	-----	-----	-----	-----	-0.015	-----	-----	-----	-----	-----	-----
229	1.000	0.779	-----	-0.000	-----	0.283	-----	-0.036	-0.000	-----	-----	-----
230	-----	-----	-0.000	-0.000	-----	-0.031	-----	-----	-0.055	-----	-----	-----
231	0.552	-----	-----	-0.088	0.273	-0.015	-----	-----	-----	-----	-----	-----
232	-----	-----	-----	-----	-0.018	-0.031	-----	0.474	-0.030	-----	-----	-0.000
233	0.460	0.185	0.532	0.140	-----	-----	0.571	-----	-----	0.182	-0.053	-----
234	-----	-----	-0.000	-----	0.358	0.318	-----	0.360	-0.133	-----	-----	1.000
235	-0.026	-----	-0.000	-0.028	-----	0.660	-----	-----	-----	-----	-----	-----
236	-----	-----	-----	-0.000	0.371	-0.048	-----	-----	-0.030	-0.000	-0.228	-0.000
237	-0.000	-----	-----	-----	-----	0.480	0.143	-----	-----	-0.000	-0.000	-----
238	-----	-----	-----	-----	0.358	-0.015	-----	-----	-----	0.163	-----	0.640
239	-----	-----	-----	-0.072	0.000	-----	-----	-0.036	-----	-0.000	-----	-----
240	-----	-----	-----	-----	0.000	-0.015	-----	-----	-----	-----	-----	0.386
241	-----	-----	-----	-0.028	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
242	-----	-----	-----	-----	-0.037	-0.015	-----	0.873	-----	-----	-----	-0.000
243	0.791	-----	-----	0.629	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
244	1.000	-0.030	-0.000	-----	-0.057	-0.000	-----	0.521	-0.097	-----	-----	-----
245	-0.026	-0.097	0.463	-0.121	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
246	-----	-----	-----	-----	0.000	-----	-----	0.208	-0.063	-0.000	-----	-0.059
247	-0.068	-----	-----	-----	-----	-0.000	-----	-----	-----	-----	-----	-----

248	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-0.000	-0.000	-----	-----	-0.000
249	-0.000	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
250	-----	-----	-----	-----	-0.018	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
251	-0.013	-----	-0.000	-0.014	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
252	-----	-----	-----	-----	0.000	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
253	-0.026	-0.000	-----	-0.057	-----	-0.000	-----	-----	-----	-----	-----	-----
257	-0.000	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
258	-----	-----	-----	-----	0.000	1.000	-----	-----	-----	-----	-----	-----
259	-0.000	-0.000	-0.059	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
260	-----	-----	-----	-----	-----	-0.015	-----	-----	-----	-----	-----	-----
261	-0.000	-----	-----	-0.014	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
262	-----	-----	-----	-----	-----	-0.015	-----	-----	-----	-----	-----	-----
266	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-0.111	-0.000
268	-----	-----	-----	-----	-----	-0.000	-----	-----	-----	-----	-0.111	-----
269	-----	-----	-----	-0.000	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
272	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-0.053	-----
273	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.000	-----	-----	-----	-----	-----
Tous W&C	0.361	0.227	0.304	0.121	0.231	0.206	0.294	0.434	-0.077	0.143	-0.132	0.316
Tous R&H	0.238	0.131	0.079	0.017	0.084	0.131	0.264	0.282	-0.060	0.039	-0.084	0.201
Sat12												
116	-0.000	-----	-----	-----	-0.217	-0.155	-----	-0.000	0.333	-----	-----	-----
120	-0.047	-0.059	-----	-----	0.008	-0.051	-----	0.437	-0.000	-----	-----	-----
122	-----	-----	-----	-0.025	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
124	-0.077	-0.091	0.008	0.457	0.477	0.388	0.000	0.640	-----	-----	-0.565	-----
126	-0.018	-----	-0.000	-0.043	0.000	-0.038	-----	-----	-----	0.833	-0.125	-----
127	-0.009	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
128	-0.098	-0.091	-0.091	0.330	-0.037	0.239	-----	-0.059	-----	-----	-----	-----
130	-0.037	-0.161	-0.059	-0.093	-----	-0.038	0.000	-0.000	-----	0.654	-----	-----
132	-0.297	-0.271	0.036	-0.094	0.358	0.086	0.571	-----	-0.111	0.654	-----	-----
134	0.011	-0.000	-0.059	-0.139	-0.018	-0.038	-0.500	-----	-----	-0.000	-0.385	-----
136	0.164	-0.091	0.654	-----	0.563	-0.155	-----	-0.000	-0.000	-----	-0.000	-----
140	-----	-----	-----	-----	-----	-0.012	-----	-0.125	-----	-----	-----	-----
144	-----	-----	-----	-----	-0.018	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Tous W&C	-0.107	-0.155	0.054	0.028	0.183	0.048	0.053	0.234	0.118	0.687	-0.373	-----
Tous R&H	-0.029	-0.101	0.077	0.064	0.119	0.020	0.037	0.114	0.008	0.474	-0.226	-----
Sat8												
94	-0.035	-0.297	1.000	0.195	-----	-0.000	-----	-0.017	-0.111	-0.158	-----	-----
96	-----	-----	-0.000	0.000	-0.051	-0.056	-0.000	-0.000	-0.200	-----	-0.176	-----
98	0.187	0.407	0.472	0.813	-0.107	-0.187	0.000	0.476	0.118	-0.833	-0.176	1.000
100	-0.036	-0.067	-0.000	-0.033	-----	-0.086	-----	-----	-----	-----	-----	-----
102	0.186	-0.067	0.451	0.655	-0.033	-----	-----	-----	0.477	-0.375	-----	1.000
104	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.455	-----	-----	-----
108	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.143	0.455	-----	-----	-----
Tous W&C	0.080	-0.021	0.564	0.549	-0.074	-0.124	0.000	0.114	0.195	-0.513	-0.176	1.000
Tous R&H	0.079	0.027	0.367	0.266	-0.046	-0.054	0.000	0.168	0.210	-0.397	-0.183	1.125

HETEROZYGOTIE MOY. SUR LES LOCUS

	Hexp.	H n.b.	Hobs.	P(0.95)	P(0.99)	Nbre Moyen d'allèles/locus
ν.&κ.Ηράκλειο	0.6932	0.7008	0.6226	1.0000	1.0000	9.6667
Ecart-type :	0.0719	0.0724	0.1810			
N. Ηράκλ.1	0.6435	0.6677	0.6686	1.0000	1.0000	5.6667
Ecart-type :	0.1035	0.1041	0.2252			
Λασιίθι	0.6162	0.6343	0.4573	1.0000	1.0000	6.6667
Ecart-type :	0.1272	0.1300	0.2474			
B.Ρεθ-Χανι	0.7769	0.7874	0.6205	1.0000	1.0000	8.6667
Ecart-type :	0.0913	0.0915	0.2669			
A.Μακεδονα	0.6204	0.6312	0.5212	1.0000	1.0000	8.3333
Ecart-type :	0.3635	0.3701	0.2625			
Δ.Μακεδονα	0.6647	0.6736	0.6144	1.0000	1.0000	11.0000
Ecart-type :	0.3220	0.3263	0.2557			
Λαμία	0.5197	0.5992	0.5278	1.0000	1.0000	3.0000
Ecart-type :	0.2147	0.2364	0.2097			
Αν.Αιγαίοd	0.6975	0.7183	0.5222	1.0000	1.0000	6.3333
Ecart-type :	0.1299	0.1363	0.0694			
Κύπρος	0.7134	0.7455	0.6921	1.0000	1.0000	6.3333
Ecart-type :	0.1730	0.1605	0.1945			
Κεφαλονιά	0.5035	0.5204	0.5161	1.0000	1.0000	4.3333
Ecart-type :	0.1578	0.1649	0.4058			
Λευκάδα	0.5422	0.5691	0.6939	1.0000	1.0000	4.0000
Ecart-type :	0.2140	0.2249	0.2890			
Ιταλ.	0.5828	0.6146	0.3000	1.0000	1.0000	6.0000
Ecart-type :	0.7496	0.3515	0.5196			

Genepop (Version 3.2a), Genic differentiation for each population pair

Number of populations detected: **12**
 Number of loci detected: **3**

Markov chain parameters

Dememorisation: 1000
 Batches: 100
 Iterations per batch: 1000

Locus: Sat2

Sub-Pop. Alleles																																								
	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	34	35	36	37	38	39	Total
β&κΗράκλ.	0	0	0	2	0	10	0	39	0	3	0	1	0	0	0	0	0	5	2	3	0	6	0	1	0	2	0	3	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	80
νο.Ηρακλ.	0	0	0	5	0	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	36
Λασιίθι	0	0	0	0	1	0	0	26	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38
Β.Ρεθυμνο	0	0	0	1	1	7	0	18	0	3	1	0	0	6	0	3	0	17	0	9	0	0	0	0	0	2	0	5	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	76	
Α.Μακεδον	0	0	0	0	6	2	0	9	0	18	0	9	1	1	1	0	3	0	4	0	1	0	0	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	58	
Δ.Μακεδον	0	0	2	6	3	2	3	0	25	3	4	4	2	0	2	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	2	0	2	0	1	0	0	68	
Λαμία	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8
Αν.Αιγαίο	0	0	0	3	0	0	19	0	5	0	0	0	0	3	0	0	9	0	13	0	7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60
Κύπρος	0	5	0	1	13	0	2	0	5	0	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	36	
Κεφαλονιά	0	0	0	0	0	0	18	0	0	1	1	16	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38
Λευκάδα	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	2	0	22
Ιταλία	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	1	0	3	0	7	0	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	20
Total	1	5	2	18	18	25	27	129	47	10	38	11	30	11	10	3	15	22	27	20	14	7	3	1	2	5	1	10	1	3	5	2	3	2	4	4	1	2	1	540

Locus	Populations	Probability	S.E.	Locus	Populations	Probability	S.E.	Locus	Populations	Probability	S.E.
Sat2	Β&κΗρακλ. & Ν. Ηράκλ.	0.01777	0.00226	Sat2	Λασιίθι & Λαμία	0.00300	0.00121	Sat2	Δ.Μακεδον & Κεφαλονιά	0.00000	0.00000
Sat2	Β&κΗρακλ. & Λασιίθι	0.01450	0.00267	Sat2	Λασιίθι & Αν.Αιγαίο	0.00000	0.00000	Sat2	Δ.Μακεδον & Λευκάδα	0.00000	0.00000
Sat2	Β&κΗρακλ. & Β.Ρεθ-Χαν	0.00004	0.00004	Sat2	Λασιίθι & Κύπρος	0.00000	0.00000	Sat2	Δ.Μακεδον & Ιταλ.	0.00041	0.00031
Sat2	Β&κΗρακλ. & Α.Μακεδον	0.00000	0.00000	Sat2	Λασιίθι & Κεφαλονιά	0.00000	0.00000	Sat2	Λαμία & Αν.Αιγαίο	0.00000	0.00000
Sat2	Β&κΗρακλ. & Δ.Μακεδον	0.00000	0.00000	Sat2	Λασιίθι & Λευκάδα	0.00000	0.00000	Sat2	Λαμία & Κύπρος	0.00000	0.00000
Sat2	Β&κΗρακλ. & Λαμία	0.01786	0.00299	Sat2	Λασιίθι & Ιταλ.	0.00000	0.00000	Sat2	Λαμία & Κεφαλονιά	0.00080	0.00029
Sat2	Β&κΗρακλ. & Αν.Αιγαίο	0.00000	0.00000	Sat2	Β.Ρεθ-Χαν & Α.Μακεδον	0.00000	0.00000	Sat2	Λαμία & Λευκάδα	0.00032	0.00012
Sat2	Β&κΗρακλ. & Κύπρος	0.00000	0.00000	Sat2	Β.Ρεθ-Χαν & Δ.Μακεδον	0.00000	0.00000	Sat2	Λαμία & Ιταλ.	0.00000	0.00000
Sat2	Β&κΗρακλ. & Κεφαλονιά	0.00000	0.00000	Sat2	Β.Ρεθ-Χαν & Λαμία	0.00049	0.00033	Sat2	Αν.Αιγαίο & Κύπρος	0.00000	0.00000
Sat2	Β&κΗρακλ. & Λευκάδα	0.00000	0.00000	Sat2	Β.Ρεθ-Χαν & Αν.Αιγαίο	0.00000	0.00000	Sat2	Αν.Αιγαίο & Κεφαλονιά	0.00000	0.00000
Sat2	Β&κΗρακλ. & Ιταλ.	0.00000	0.00000	Sat2	Β.Ρεθ-Χαν & Κύπρος	0.00000	0.00000	Sat2	Αν.Αιγαίο & Λευκάδα	0.00000	0.00000
Sat2	Ν. Ηράκλ. & Λασιίθι	0.14187	0.00689	Sat2	Β.Ρεθ-Χαν & Κεφαλονιά	0.00000	0.00000	Sat2	Αν.Αιγαίο & Ιταλ.	0.00000	0.00000
Sat2	Ν. Ηράκλ. & Β.Ρεθ-Χαν	0.00000	0.00000	Sat2	Β.Ρεθ-Χαν & Λευκάδα	0.00000	0.00000	Sat2	Κύπρος & Κεφαλονιά	0.00000	0.00000
Sat2	Ν. Ηράκλ. & Α.Μακεδον	0.00000	0.00000	Sat2	Β.Ρεθ-Χαν & Ιταλ.	0.00000	0.00000	Sat2	Κύπρος & Λευκάδα	0.00000	0.00000
Sat2	Ν. Ηράκλ. & Δ.Μακεδον	0.00000	0.00000	Sat2	Α.Μακεδον & Δ.Μακεδον	0.00000	0.00000	Sat2	Κύπρος & Ιταλ.	0.00000	0.00000
Sat2	Ν. Ηράκλ. & Λαμία	0.00364	0.00078	Sat2	Α.Μακεδον & Λαμία	0.00000	0.00000	Sat2	Κεφαλονιά & Λευκάδα	0.00000	0.00000
Sat2	Ν. Ηράκλ. & Αν.Αιγαίο	0.00000	0.00000	Sat2	Α.Μακεδον & Αν.Αιγαίο	0.00000	0.00000	Sat2	Κεφαλονιά & Ιταλ.	0.00000	0.00000
Sat2	Ν. Ηράκλ. & Κύπρος	0.00000	0.00000	Sat2	Α.Μακεδον & Κύπρος	0.00000	0.00000	Sat2	Λευκάδα & Ιταλ.	0.00000	0.00000
Sat2	Ν. Ηράκλ. & Κεφαλονιά	0.00000	0.00000	Sat2	Α.Μακεδον & Κεφαλονιά	0.00000	0.00000				
Sat2	Ν. Ηράκλ. & Λευκάδα	0.00000	0.00000	Sat2	Α.Μακεδον & Λευκάδα	0.00000	0.00000				
Sat2	Ν. Ηράκλ. & Ιταλ.	0.00000	0.00000	Sat2	Α.Μακεδον & Ιταλ.	0.00000	0.00000				
Sat2	Λασιίθι & Β.Ρεθ-Χαν	0.00000	0.00000	Sat2	Δ.Μακεδον & Λαμία	0.00040	0.00025				
Sat2	Λασιίθι & Α.Μακεδον	0.00000	0.00000	Sat2	Δ.Μακεδον & Αν.Αιγαίο	0.00000	0.00000				
Sat2	Λασιίθι & Δ.Μακεδον	0.00000	0.00000	Sat2	Δ.Μακεδον & Κύπρος	0.00000	0.00000				

Locus: Sat8

Sub-Pop. Alleles

	1	2	3	4	5	6	7	Total
ΒέκΗρακλ.	43	0	33	4	8	0	0	88
Ν. Ηράκλ.	10	0	4	2	2	0	0	18
Λασίθι	6	1	18	1	4	0	0	30
Β. Ρεθ-Χαν	12	1	27	3	21	0	0	64
Α. Μακεδον	0	4	57	0	3	0	0	64
Δ. Μακεδον	1	5	65	7	0	0	0	78
Λαμία	0	1	5	0	0	0	0	6
Αν. Αιγαίο	19	1	4	0	0	0	32	56
Κύπρος	4	6	7	0	7	4	4	32
Κεφαλονιά	4	0	13	0	7	0	0	24
Λευκάδα	0	4	18	0	0	0	0	22
Ιταλ.	0	0	14	0	4	0	0	18
Total	99	23	265	17	56	4	36	500

Locus	Populations	Probability	S.E.	Locus	Populations	Probability	S.E.	Locus	Populations	Probability	S.E.
Sat8	ΒέκΗρακλ. & Ν. Ηράκλ.	0.40455	0.00515	Sat8	Λασίθι & Α.Μακεδον	0.00017	0.00010	Sat8	Δ.Μακεδον & Αν.Αιγαίο	0.00000	0.00000
Sat8	ΒέκΗρακλ. & Λασίθι	0.01624	0.00171	Sat8	Λασίθι & Δ.Μακεδον	0.00008	0.00006	Sat8	Δ.Μακεδον & Κύπρος	0.00000	0.00000
Sat8	ΒέκΗρακλ. & Β.Ρεθ-Χαν	0.00000	0.00000	Sat8	Λασίθι & Λαμία	0.42321	0.00608	Sat8	Δ.Μακεδον & Κεφαλονιά	0.00000	0.00000
Sat8	ΒέκΗρακλ. & Α.Μακεδον	0.00000	0.00000	Sat8	Λασίθι & Αν.Αιγαίο	0.00000	0.00000	Sat8	Δ.Μακεδον & Λευκάδα	0.19991	0.00411
Sat8	ΒέκΗρακλ. & Δ.Μακεδον	0.00000	0.00000	Sat8	Λασίθι & Κύπρος	0.00194	0.00041	Sat8	Δ.Μακεδον & Ιταλ.	0.00392	0.00074
Sat8	ΒέκΗρακλ. & Λαμία	0.00919	0.00103	Sat8	Λασίθι & Κεφαλονιά	0.55107	0.00607	Sat8	Λαμία & Αν.Αιγαίο	0.00000	0.00000
Sat8	ΒέκΗρακλ. & Αν.Αιγαίο	0.00000	0.00000	Sat8	Λασίθι & Λευκάδα	0.00699	0.00081	Sat8	Λαμία & Κύπρος	0.13602	0.00399
Sat8	ΒέκΗρακλ. & Κύπρος	0.00000	0.00000	Sat8	Λασίθι & Ιταλ.	0.16803	0.00488	Sat8	Λαμία & Κεφαλονιά	0.09101	0.00289
Sat8	ΒέκΗρακλ. & Κεφαλονιά	0.00533	0.00096	Sat8	Β.Ρεθ-Χαν & Α.Μακεδον	0.00000	0.00000	Sat8	Λαμία & Λευκάδα	1.00000	0.00000
Sat8	ΒέκΗρακλ. & Λευκάδα	0.00000	0.00000	Sat8	Β.Ρεθ-Χαν & Δ.Μακεδον	0.00000	0.00000	Sat8	Λαμία & Ιταλ.	0.16134	0.00255
Sat8	ΒέκΗρακλ. & Ιταλ.	0.00016	0.00011	Sat8	Β.Ρεθ-Χαν & Λαμία	0.06901	0.00269	Sat8	Αν.Αιγαίο & Κύπρος	0.00000	0.00000
Sat8	Ν. Ηράκλ. & Λασίθι	0.02140	0.00191	Sat8	Β.Ρεθ-Χαν & Αν.Αιγαίο	0.00000	0.00000	Sat8	Αν.Αιγαίο & Κεφαλονιά	0.00000	0.00000
Sat8	Ν. Ηράκλ. & Β.Ρεθ-Χαν	0.01390	0.00163	Sat8	Β.Ρεθ-Χαν & Κύπρος	0.00000	0.00000	Sat8	Αν.Αιγαίο & Λευκάδα	0.00000	0.00000
Sat8	Ν. Ηράκλ. & Α.Μακεδον	0.00000	0.00000	Sat8	Β.Ρεθ-Χαν & Κεφαλονιά	0.83329	0.00385	Sat8	Αν.Αιγαίο & Ιταλ.	0.00000	0.00000
Sat8	Ν. Ηράκλ. & Δ.Μακεδον	0.00000	0.00000	Sat8	Β.Ρεθ-Χαν & Λευκάδα	0.00000	0.00000	Sat8	Κύπρος & Κεφαλονιά	0.00678	0.00085
Sat8	Ν. Ηράκλ. & Λαμία	0.01000	0.00091	Sat8	Β.Ρεθ-Χαν & Ιταλ.	0.05401	0.00288	Sat8	Κύπρος & Λευκάδα	0.00004	0.00004
Sat8	Ν. Ηράκλ. & Αν.Αιγαίο	0.00000	0.00000	Sat8	Α.Μακεδον & Δ.Μακεδον	0.01777	0.00185	Sat8	Κύπρος & Ιταλ.	0.00109	0.00022
Sat8	Ν. Ηράκλ. & Κύπρος	0.00171	0.00042	Sat8	Α.Μακεδον & Λαμία	0.53119	0.00439	Sat8	Κεφαλονιά & Λευκάδα	0.00029	0.00014
Sat8	Ν. Ηράκλ. & Κεφαλονιά	0.00911	0.00109	Sat8	Α.Μακεδον & Αν.Αιγαίο	0.00000	0.00000	Sat8	Κεφαλονιά & Ιταλ.	0.14701	0.00274
Sat8	Ν. Ηράκλ. & Λευκάδα	0.00000	0.00000	Sat8	Α.Μακεδον & Κύπρος	0.00000	0.00000	Sat8	Λευκάδα & Ιταλ.	0.01359	0.00076
Sat8	Ν. Ηράκλ. & Ιταλ.	0.00007	0.00007	Sat8	Α.Μακεδον & Κεφαλονιά	0.00000	0.00000				
Sat8	Λασίθι & Β.Ρεθ-Χαν	0.26066	0.00635	Sat8	Α.Μακεδον & Λευκάδα	0.23948	0.00377				
				Sat8	Α.Μακεδον & Ιταλ.	0.07387	0.00232				
				Sat8	Δ.Μακεδον & Λαμία	0.47166	0.00520				

P-value for each locus pair across all populations (Fisher's method)

Locus pair	Chi2	df	P-value
Sat2 & Sat12	20.645	18	0.29769
Sat2 & Sat8	17.565	22	0.73143
Sat12 & Sat8	13.444	20	0.85755

Genepop (Version 3.2a) Option: Hardy-Weinberg test

Number of populations detected: 12
Number of loci detected: 3

Hardy-Weinberg exact tests for up to four alleles. (complete enumeration)

Estimation of exact P-values by the Markov chain method.

Markov chain parameters for all tests:

Dememorization: 1000
Batches: 100
Iterations per batch: 1000

Hardy Weinberg test when H1= heterozygote deficit

Results by locus

Locus: Sat2						Locus: Sat12						Locus: Sat8					
Fis:						Fis:						Fis:					
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.
Β&κΗρακλ.	.0000	.0000	+ .361	+ .238	-	Β&κΗρακλ.	.7733	.0196	- .107	- .029	-	Β&κΗρακλ.	.1610	/	+ .080	+ .079	6793
N. Ηράκλ.	.0919	.0086	+ .227	+ .131	-	N. Ηράκλ.	.9736	.0040	- .155	- .101	-	N. Ηράκλ.	.4120	/	- .021	+ .027	45
Λασιίθι	.0778	.0116	+ .304	+ .079	-	Λασιίθι	.1881	.0132	+ .054	+ .077	-	Λασιίθι	.0008	.0006	+ .564	+ .367	-
Β.Ρεθ-Χαν	.2936	.0294	+ .121	+ .017	-	Β.Ρεθ-Χαν	.1544	.0092	+ .028	+ .064	-	Β.Ρεθ-Χαν	.0032	.0007	+ .549	+ .266	-
Α.Μακεδον	.0305	.0098	+ .231	+ .084	-	Α.Μακεδον	.0275	.0055	+ .183	+ .119	-	Α.Μακεδον 1	/	/	- .074	- .046	13
Δ.Μακεδον	.0000	.0000	+ .206	+ .131	-	Δ.Μακεδον	.3140	.0196	+ .048	+ .020	-	Δ.Μακεδον 1	/	/	- .124	- .054	105
Λαμία	.4286	/	+ .294	+ .264	4	Λαμία	.6000	/	+ .053	+ .037	8	Λαμία	-	-	-	-	-
Αν.Αιγαίο	.0002	.0002	+ .434	+ .282	-	Αν.Αιγαίο	.1497	.0136	+ .234	+ .114	-	Αν.Αιγαίο	.0574	/	+ .114	+ .168	225
Κύπρος	.8884	.0130	- .077	- .060	-	Κύπρος	.5152	/	+ .118	+ .008	7	Κύπρος	.0408	.0039	+ .195	+ .210	-
Κεφαλονιά	.2907	.0242	+ .143	+ .039	-	Κεφαλονιά	.0006	/	+ .687	+ .474	24	Κεφαλονιά 1	/	/	- .513	- .397	31
Λευκάδα	.9300	.0067	- .132	- .084	-	Λευκάδα	.9945	/	- .373	- .226	49	Λευκάδα 1	/	/	- .176	- .183	3
Ιταλ.	.0062	.0033	+ .316	+ .201	-	Ιταλ.	-	-	-	-	-	Ιταλ.	.0118	/	+1	+1	3

Results by population

<p>Pop: ΒόκΗρακλ.</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.0000</td> <td>.0000</td> <td>+ .361</td> <td>+ .238</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.7733</td> <td>.0196</td> <td>- .107</td> <td>- .029</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.1610</td> <td>/</td> <td>+ .080</td> <td>+ .079</td> <td>6793</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.0000	.0000	+ .361	+ .238	-	Sat12	.7733	.0196	- .107	- .029	-	Sat8	.1610	/	+ .080	+ .079	6793	<p>Pop: Ν. Ηράκλ.</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.0919</td> <td>.0086</td> <td>+ .227</td> <td>+ .131</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.9736</td> <td>.0040</td> <td>- .155</td> <td>- .101</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.4120</td> <td>/</td> <td>- .021</td> <td>+ .027</td> <td>45</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.0919	.0086	+ .227	+ .131	-	Sat12	.9736	.0040	- .155	- .101	-	Sat8	.4120	/	- .021	+ .027	45	<p>Pop: Λασίθι</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.0778</td> <td>.0116</td> <td>+ .304</td> <td>+ .079</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.1881</td> <td>.0132</td> <td>+ .054</td> <td>+ .077</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.0008</td> <td>.0006</td> <td>+ .564</td> <td>+ .367</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.0778	.0116	+ .304	+ .079	-	Sat12	.1881	.0132	+ .054	+ .077	-	Sat8	.0008	.0006	+ .564	+ .367	-
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.0000	.0000	+ .361	+ .238	-																																																																					
Sat12	.7733	.0196	- .107	- .029	-																																																																					
Sat8	.1610	/	+ .080	+ .079	6793																																																																					
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.0919	.0086	+ .227	+ .131	-																																																																					
Sat12	.9736	.0040	- .155	- .101	-																																																																					
Sat8	.4120	/	- .021	+ .027	45																																																																					
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.0778	.0116	+ .304	+ .079	-																																																																					
Sat12	.1881	.0132	+ .054	+ .077	-																																																																					
Sat8	.0008	.0006	+ .564	+ .367	-																																																																					
<p>Pop: Β. Ρεθ-Χαν.</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.2936</td> <td>.0294</td> <td>+ .121</td> <td>+ .017</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.1544</td> <td>.0092</td> <td>+ .028</td> <td>+ .064</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.0032</td> <td>.0007</td> <td>+ .549</td> <td>+ .266</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.2936	.0294	+ .121	+ .017	-	Sat12	.1544	.0092	+ .028	+ .064	-	Sat8	.0032	.0007	+ .549	+ .266	-	<p>Pop: Α. Μακεδον.</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.0305</td> <td>.0098</td> <td>+ .231</td> <td>+ .084</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.0275</td> <td>.0055</td> <td>+ .183</td> <td>+ .119</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>1</td> <td>/</td> <td>- .074</td> <td>- .046</td> <td>13</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.0305	.0098	+ .231	+ .084	-	Sat12	.0275	.0055	+ .183	+ .119	-	Sat8	1	/	- .074	- .046	13	<p>Pop: Δ. Μακεδον.</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.0000</td> <td>.0000</td> <td>+ .206</td> <td>+ .131</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.3140</td> <td>.0196</td> <td>+ .048</td> <td>+ .020</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>1</td> <td>/</td> <td>- .124</td> <td>- .054</td> <td>105</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.0000	.0000	+ .206	+ .131	-	Sat12	.3140	.0196	+ .048	+ .020	-	Sat8	1	/	- .124	- .054	105
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.2936	.0294	+ .121	+ .017	-																																																																					
Sat12	.1544	.0092	+ .028	+ .064	-																																																																					
Sat8	.0032	.0007	+ .549	+ .266	-																																																																					
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.0305	.0098	+ .231	+ .084	-																																																																					
Sat12	.0275	.0055	+ .183	+ .119	-																																																																					
Sat8	1	/	- .074	- .046	13																																																																					
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.0000	.0000	+ .206	+ .131	-																																																																					
Sat12	.3140	.0196	+ .048	+ .020	-																																																																					
Sat8	1	/	- .124	- .054	105																																																																					
<p>Pop: Λαμία</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.4286</td> <td>/</td> <td>+ .294</td> <td>+ .264</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.6000</td> <td>/</td> <td>+ .053</td> <td>+ .037</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.4286	/	+ .294	+ .264	4	Sat12	.6000	/	+ .053	+ .037	8	Sat8	-					<p>Pop: Αν. Αιγαίο</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.0002</td> <td>.0002</td> <td>+ .434</td> <td>+ .282</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.1497</td> <td>.0136</td> <td>+ .234</td> <td>+ .114</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.0574</td> <td>/</td> <td>+ .114</td> <td>+ .168</td> <td>225</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.0002	.0002	+ .434	+ .282	-	Sat12	.1497	.0136	+ .234	+ .114	-	Sat8	.0574	/	+ .114	+ .168	225	<p>Pop: Κύπρος</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.8884</td> <td>.0130</td> <td>- .077</td> <td>- .060</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.5152</td> <td>/</td> <td>+ .118</td> <td>+ .008</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.0408</td> <td>.0039</td> <td>+ .195</td> <td>+ .210</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.8884	.0130	- .077	- .060	-	Sat12	.5152	/	+ .118	+ .008	7	Sat8	.0408	.0039	+ .195	+ .210	-
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.4286	/	+ .294	+ .264	4																																																																					
Sat12	.6000	/	+ .053	+ .037	8																																																																					
Sat8	-																																																																									
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.0002	.0002	+ .434	+ .282	-																																																																					
Sat12	.1497	.0136	+ .234	+ .114	-																																																																					
Sat8	.0574	/	+ .114	+ .168	225																																																																					
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.8884	.0130	- .077	- .060	-																																																																					
Sat12	.5152	/	+ .118	+ .008	7																																																																					
Sat8	.0408	.0039	+ .195	+ .210	-																																																																					
<p>Pop: Κεφαλονιά</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.2907</td> <td>.0242</td> <td>+ .143</td> <td>+ .039</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.0006</td> <td>/</td> <td>+ .687</td> <td>+ .474</td> <td>24</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>1</td> <td>/</td> <td>- .513</td> <td>- .397</td> <td>31</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.2907	.0242	+ .143	+ .039	-	Sat12	.0006	/	+ .687	+ .474	24	Sat8	1	/	- .513	- .397	31	<p>Pop: Λευκάδα</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.9300</td> <td>.0067</td> <td>- .132</td> <td>- .084</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.9945</td> <td>/</td> <td>- .373</td> <td>- .226</td> <td>49</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>1</td> <td>/</td> <td>- .176</td> <td>- .183</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.9300	.0067	- .132	- .084	-	Sat12	.9945	/	- .373	- .226	49	Sat8	1	/	- .176	- .183	3	<p>Pop: Ιταλ.</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.0062</td> <td>.0033</td> <td>+ .316</td> <td>+ .201</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.0118</td> <td>/</td> <td>+ 1</td> <td>+ 1</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.0062	.0033	+ .316	+ .201	-	Sat12	-					Sat8	.0118	/	+ 1	+ 1	3
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.2907	.0242	+ .143	+ .039	-																																																																					
Sat12	.0006	/	+ .687	+ .474	24																																																																					
Sat8	1	/	- .513	- .397	31																																																																					
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.9300	.0067	- .132	- .084	-																																																																					
Sat12	.9945	/	- .373	- .226	49																																																																					
Sat8	1	/	- .176	- .183	3																																																																					
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.0062	.0033	+ .316	+ .201	-																																																																					
Sat12	-																																																																									
Sat8	.0118	/	+ 1	+ 1	3																																																																					

Genepop (Version 3.2a) Option: Hardy-Weinberg test

Number of populations detected: 12 Hardy-Weinberg exact tests for up to four alleles. (complete enumeration)
 Number of loci detected: 3 Estimation of exact P-values by the Markov chain method.

Markov chain parameters for all tests:

Dememorization: 1000
 Batches: 100
 Iterations per batch: 1000

Hardy Weinberg test when H1= heterozygote excess

Results by locus

Locus: Sat2							Locus: Sat12							Locus: Sat8						
-----							-----							-----						
Fis:							Fis:							Fis:						
-----							-----							-----						
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr		POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.		POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	
-----							-----							-----						
Β&κΗρακλ.	1	.0000	+ .361	+ .238	-		Β&κΗρακλ.	.2251	.0185	- .107	- .029	-		Β&κΗρακλ.	.8433	/	+ .080	+ .079	6793	
N. Ηράκλ.	.9165	.0088	+ .227	+ .131	-		N. Ηράκλ.	.1037	.0088	- .155	- .101	-		N. Ηράκλ.	.6669	/	- .021	+ .027	45	
Λασιίθι	.9303	.0113	+ .304	+ .079	-		Λασιίθι	.8372	.0119	+ .054	+ .077	-		Λασιίθι	.9998	.0002	+ .564	+ .367	-	
Β.Ρεθ-Χαν	.7771	.0263	+ .121	+ .017	-		Β.Ρεθ-Χαν	.8468	.0102	+ .028	+ .064	-		Β.Ρεθ-Χαν	.9963	.0008	+ .549	+ .266	-	
Α.Μακεδον	.9745	.0089	+ .231	+ .084	-		Α.Μακεδον	.9678	.0066	+ .183	+ .119	-		Α.Μακεδον	.6935	/	- .074	- .046	13	
Δ.Μακεδον	1	.0000	+ .206	+ .131	-		Δ.Μακεδον	.7047	.0172	+ .048	+ .020	-		Δ.Μακεδον	.3018	/	- .124	- .054	105	
Λομιά	.9143	/	+ .294	+ .264	4		Λομιά	.7429	/	+ .053	+ .037	8		Λομιά	-					
Αν.Αιγαίο	.9991	.0008	+ .434	+ .282	-		Αν.Αιγαίο	.9141	.0100	+ .234	+ .114	-		Αν.Αιγαίο	.9525	/	+ .114	+ .168	225	
Κύπρος	.2188	.0179	- .077	- .060	-		Κύπρος	.8889	/	+ .118	+ .008	7		Κύπρος	.9556	.0040	+ .195	+ .210	-	
Κεφαλονιά	.8309	.0175	+ .143	+ .039	-		Κεφαλονιά	1	/	+ .687	+ .474	24		Κεφαλονιά	.0098	/	- .513	- .397	31	
Λευκάδα	.3136	.0148	- .132	- .084	-		Λευκάδα	.0804	/	- .373	- .226	49		Λευκάδα	.7218	/	- .176	- .183	3	
Ιταλ.	.9956	.0033	+ .316	+ .201	-		Ιταλ.	-						Ιταλ.	1	/	+1	+1	3	

Results by population

<p>Pop: Β&κΗρoκλ.</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>1</td> <td>.0000</td> <td>+ .361</td> <td>+ .238</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.2251</td> <td>.0185</td> <td>- .107</td> <td>- .029</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.8433</td> <td>/</td> <td>+ .080</td> <td>+ .079</td> <td>6793</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	1	.0000	+ .361	+ .238	-	Sat12	.2251	.0185	- .107	- .029	-	Sat8	.8433	/	+ .080	+ .079	6793	<p>Pop: Ν. Ηρoκλ.</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.9165</td> <td>.0088</td> <td>+ .227</td> <td>+ .131</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.1037</td> <td>.0088</td> <td>- .155</td> <td>- .101</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.6669</td> <td>/</td> <td>- .021</td> <td>+ .027</td> <td>45</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.9165	.0088	+ .227	+ .131	-	Sat12	.1037	.0088	- .155	- .101	-	Sat8	.6669	/	- .021	+ .027	45	<p>Pop: Λασιθι</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.9303</td> <td>.0113</td> <td>+ .304</td> <td>+ .079</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.8372</td> <td>.0119</td> <td>+ .054</td> <td>+ .077</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.9998</td> <td>.0002</td> <td>+ .564</td> <td>+ .367</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.9303	.0113	+ .304	+ .079	-	Sat12	.8372	.0119	+ .054	+ .077	-	Sat8	.9998	.0002	+ .564	+ .367	-
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	1	.0000	+ .361	+ .238	-																																																																					
Sat12	.2251	.0185	- .107	- .029	-																																																																					
Sat8	.8433	/	+ .080	+ .079	6793																																																																					
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.9165	.0088	+ .227	+ .131	-																																																																					
Sat12	.1037	.0088	- .155	- .101	-																																																																					
Sat8	.6669	/	- .021	+ .027	45																																																																					
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.9303	.0113	+ .304	+ .079	-																																																																					
Sat12	.8372	.0119	+ .054	+ .077	-																																																																					
Sat8	.9998	.0002	+ .564	+ .367	-																																																																					
<p>Pop: Β.Πεθ-Χοvimm</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.7771</td> <td>.0263</td> <td>+ .121</td> <td>+ .017</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.8468</td> <td>.0102</td> <td>+ .028</td> <td>+ .064</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.9963</td> <td>.0008</td> <td>+ .549</td> <td>+ .266</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.7771	.0263	+ .121	+ .017	-	Sat12	.8468	.0102	+ .028	+ .064	-	Sat8	.9963	.0008	+ .549	+ .266	-	<p>Pop: Α.Μακεδoνα</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.9745</td> <td>.0089</td> <td>+ .231</td> <td>+ .084</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.9678</td> <td>.0066</td> <td>+ .183</td> <td>+ .119</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.6935</td> <td>/</td> <td>- .074</td> <td>- .046</td> <td>13</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.9745	.0089	+ .231	+ .084	-	Sat12	.9678	.0066	+ .183	+ .119	-	Sat8	.6935	/	- .074	- .046	13	<p>Pop: Δ.Μακεδoνα</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>1</td> <td>.0000</td> <td>+ .206</td> <td>+ .131</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.7047</td> <td>.0172</td> <td>+ .048</td> <td>+ .020</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.3018</td> <td>/</td> <td>- .124</td> <td>- .054</td> <td>105</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	1	.0000	+ .206	+ .131	-	Sat12	.7047	.0172	+ .048	+ .020	-	Sat8	.3018	/	- .124	- .054	105
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.7771	.0263	+ .121	+ .017	-																																																																					
Sat12	.8468	.0102	+ .028	+ .064	-																																																																					
Sat8	.9963	.0008	+ .549	+ .266	-																																																																					
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.9745	.0089	+ .231	+ .084	-																																																																					
Sat12	.9678	.0066	+ .183	+ .119	-																																																																					
Sat8	.6935	/	- .074	- .046	13																																																																					
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	1	.0000	+ .206	+ .131	-																																																																					
Sat12	.7047	.0172	+ .048	+ .020	-																																																																					
Sat8	.3018	/	- .124	- .054	105																																																																					
<p>Pop: Λομια</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.9143</td> <td>/</td> <td>+ .294</td> <td>+ .264</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.7429</td> <td>/</td> <td>+ .053</td> <td>+ .037</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.9143	/	+ .294	+ .264	4	Sat12	.7429	/	+ .053	+ .037	8	Sat8	-					<p>Pop: Αv.Αιγαioδs</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.9991</td> <td>.0008</td> <td>+ .434</td> <td>+ .282</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.9141</td> <td>.0100</td> <td>+ .234</td> <td>+ .114</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.9525</td> <td>/</td> <td>+ .114</td> <td>+ .168</td> <td>225</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.9991	.0008	+ .434	+ .282	-	Sat12	.9141	.0100	+ .234	+ .114	-	Sat8	.9525	/	+ .114	+ .168	225	<p>Pop: Κυπρος</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.2188</td> <td>.0179</td> <td>- .077</td> <td>- .060</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.8889</td> <td>/</td> <td>+ .118</td> <td>+ .008</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.9556</td> <td>.0040</td> <td>+ .195</td> <td>+ .210</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.2188	.0179	- .077	- .060	-	Sat12	.8889	/	+ .118	+ .008	7	Sat8	.9556	.0040	+ .195	+ .210	-
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.9143	/	+ .294	+ .264	4																																																																					
Sat12	.7429	/	+ .053	+ .037	8																																																																					
Sat8	-																																																																									
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.9991	.0008	+ .434	+ .282	-																																																																					
Sat12	.9141	.0100	+ .234	+ .114	-																																																																					
Sat8	.9525	/	+ .114	+ .168	225																																																																					
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.2188	.0179	- .077	- .060	-																																																																					
Sat12	.8889	/	+ .118	+ .008	7																																																																					
Sat8	.9556	.0040	+ .195	+ .210	-																																																																					
<p>Pop: Κεφαλονια</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.8309</td> <td>.0175</td> <td>+ .143</td> <td>+ .039</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>1</td> <td>/</td> <td>+ .687</td> <td>+ .474</td> <td>24</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.0098</td> <td>/</td> <td>- .513</td> <td>- .397</td> <td>31</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.8309	.0175	+ .143	+ .039	-	Sat12	1	/	+ .687	+ .474	24	Sat8	.0098	/	- .513	- .397	31	<p>Pop: Λευκαδα</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.3136</td> <td>.0148</td> <td>- .132</td> <td>- .084</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>.0804</td> <td>/</td> <td>- .373</td> <td>- .226</td> <td>49</td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>.7218</td> <td>/</td> <td>- .176</td> <td>- .183</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.3136	.0148	- .132	- .084	-	Sat12	.0804	/	- .373	- .226	49	Sat8	.7218	/	- .176	- .183	3	<p>Pop: Ιταλ.</p> <p>-----</p> <p>Fis:</p> <p>-----</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>POP</th> <th>P-val</th> <th>S.E.</th> <th>W&C</th> <th>R&H</th> <th>Matr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sat2</td> <td>.9956</td> <td>.0033</td> <td>+ .316</td> <td>+ .201</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Sat12</td> <td>-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sat8</td> <td>1</td> <td>/</td> <td>+ 1</td> <td>+ 1</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.	Sat2	.9956	.0033	+ .316	+ .201	-	Sat12	-					Sat8	1	/	+ 1	+ 1	3
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.8309	.0175	+ .143	+ .039	-																																																																					
Sat12	1	/	+ .687	+ .474	24																																																																					
Sat8	.0098	/	- .513	- .397	31																																																																					
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.3136	.0148	- .132	- .084	-																																																																					
Sat12	.0804	/	- .373	- .226	49																																																																					
Sat8	.7218	/	- .176	- .183	3																																																																					
POP	P-val	S.E.	W&C	R&H	Matr.																																																																					
Sat2	.9956	.0033	+ .316	+ .201	-																																																																					
Sat12	-																																																																									
Sat8	1	/	+ 1	+ 1	3																																																																					

Hardy Weinberg test when H1= heterozygote excess

Results by population (test multi-locus)			Results by locus (test multi-pop)			Result for all locus and all populations		
Pop	P-val	S.E.	Locus	P-val	S.E.	P-val	S.E.	
ΒέκΗρακλ.	1	.0000						
Ν. Ηράκλ.	.5850	.0266						
Λασίθι	.9985	.0013						
Β.Ρεθ-Χαν	.9875	.0043						
Α.Μακεδον	.9962	.0032						
Δ.Μακεδον	.9923	.0035						
Λαμία	.8417	.0090						
Αν.Αιγαίο	1	.0000						
Κύπρος	.7634	.0298	Sat2	1	.0000			
Κεφαλονιά	.9836	.0031	Sat12	.9549	.0118			
Λευκάδα	.0340	.0064	Sat8	.9998	.0001			
Ιταλ.	1	.0000				1	.0000	

Nombre de loc. : 3
Sat2 Sat12 Sat8
 Nombre de pop. : 12
 N° Nom de la population
 1 ΒέκΗρακλ.
 2 Ν. Ηράκλ.
 3 Λασίθι
 4 Β.Ρεθ-Χαν
 5 Α.Μακεδον
 6 Δ.Μακεδον
 7 Λαμία
 8 Αν.Αιγαίο
 9 Κύπρος
 10 Κεφαλονιά
 11 Λευκάδα
 12 Ιταλία

Calcul de Theta (Fst de Weir et Cockerham, 1984) par paire de populations
 Calcul de RH (Estimation du Fst selon Robertson & Hill);
 Calcul de RH' RH corrigé Raufaste & Bonhomme (00) :
 $Fst(RH') = RH = WC$ lorsque nb. allèles = 2 ou $Fst > 0.2$
 $Fst(RH') = RH + (RH^2 / (nb\ pop * (nb\ allèles - 1))) * (somme[1/Pi] / (3 * nb\ allèles))$ qd nb. allèles > 2 et $Fst \leq 0.2$
 Calcul de Nm = $(1 - Fst) / 4 * Fst$ estimation du flux génique
 (Wright, 1969) entre paire de populations.
 Les valeurs 999999.00, proviennent de valeurs de theta < ou = 0 !
 Calcul de log(Nm) entre paires de populations.
 Les valeurs 999.00000, proviennent de valeurs de theta < ou = 0 !
 Calcul de D = $-\ln(1 - Fst)$.
 Distances génétiques entre paires de populations d'après
 Reynolds, Weir and Cockerham, 1983)
 Calcul de Fst/(1-Fst). Rousset F. 1997
 Les calculs de Nm, D, Fst/(1-Fst) utilisent le Theta de Weir et cockerham !!!

